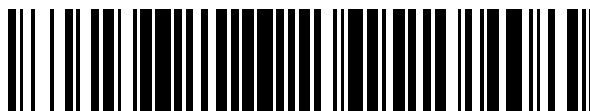


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 580**

51 Int. Cl.:
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07709622 .0**
96 Fecha de presentación: **05.01.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1982190**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.10.2008**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas y métodos para vacunar contra la candidiasis diseminada y otros agentes infecciosos**

30 Prioridad:
06.01.2006 US 327197

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.11.2012

73 Titular/es:
**LOS ANGELES BIOMEDICAL RESEARCH
INSTITUTE AT HARBOR-UCLA MEDICAL
CENTER (100.0%)
1124 WEST CARSON STREET
TORRANCE, CA 90502, US**

72 Inventor/es:
**EDWARDS, JOHN E., JR.;
FILLER, SCOTT G.;
IBRAHIM, ASHRAF;
FU, YUE;
SPELLBERG, BRAD J. y
YEAMAN, MICHAEL**

74 Agente/Representante:
PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 391 580 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

Composiciones farmacéuticas y métodos para vacunar contra la candidiasis diseminada y otros agentes infecciosos.

5 **Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a proteínas adhesinas de superficie de *Candida albicans* y a vacunas para la prevención y/o el tratamiento de una infección por *Staphylococcus aureus*.

10 En años recientes ha tenido lugar un aumento dramático en la incidencia de infecciones nosocomiales provocadas por especies de *Candida*. La incidencia de infecciones por *Candida* diseminadas hematógicamente aumentó 11 veces de 1980 a 1989. Esta incidencia creciente ha continuado en la década de 1990. Las infecciones por especies de *Candida* son actualmente la cuarta causa más común de septicemia nosocomial, igualan a la provocada por *Escherichia coli* y superan la incidencia provocada por especies de *Klebsiella*. Además, las especies de *Candida* son la causa más común de infecciones fúngicas arraigadas profundamente en pacientes que tienen quemaduras extensas. Hasta el 11 % de individuos que se han sometido a un trasplante de médula ósea y el 13 % de los que tienen un trasplante de hígado ortotópico desarrollarán una infección invasiva por *Candida*.

20 La *Candida albicans*, el patógeno principal de este género, puede variar entre dos morfologías: la fases de blastospora (levadura en formación) y filamentosa (hifa y pseudohifa). Se ha comunicado que los mutantes de *Candida* que son deficientes en genes que regulan la filamentación tienen una virulencia reducida en modelos animales. Esta virulencia reducida sugiere que la capacidad de cambiar de una blastospora a un filamento es un factor de virulencia clave de *C. albicans*. Hasta la fecha no se han identificado efectores esenciales de estas rutas de filamentación en *C. albicans*. Véase Caesar-TonThat, T.C. y J.E. Cutler, "A monoclonal antibody to *Candida albicans* enhances mouse neutrophil candidacidal activity," Infect. Immun. 65:5354-5357, 1997.

30 Las infecciones por *Staphylococcus aureus* son también comunes y dan como resultado de forma creciente una resistencia a fármacos antibióticos. Por ejemplo, el *S. aureus* es una causa común de infecciones de la piel y de la estructura de la piel, endocarditis y bacteremia en Estados Unidos y en todo el mundo. Las infecciones por *S. aureus* extrahospitalarias (CA-*S. aureus*) anteriores eran casi uniformemente susceptibles a beta lactamas resistentes a penicilinasas tales como cefazolina, oxacilina, metilicina, penicilina y amoxicilina. No obstante, durante la década pasada, las epidemias por infecciones por *S. aureus* resistente a beta-lactama (MRSA) se han observado en múltiples localizaciones en todo el mundo, especialmente la MRSA extrahospitalaria (CA-MRSA). En muchos sitios la MRSA se ha convertido en la cepa predominante de *S. aureus* que provoca infecciones extrahospitalarias. Un estudio reciente prospectivo basado en la población de tres estados de Estados Unidos estimó que la incidencia de infecciones por CA-MRSA es de 500 casos por cada población de 100.000 personas, lo que se traduce en aproximadamente 1,5 millones de casos sólo en Estados Unidos. La frecuencia creciente de infecciones por *S. aureus* resistente a fármacos destaca la necesidad de nuevas formas de prevención y tratamiento de estas infecciones.

40 La identificación de efectores en las rutas reguladoras del organismo que contribuyen a la virulencia ofrece la oportunidad de una intervención terapéutica con métodos o composiciones con un efecto superior a los agentes antifúngicos existentes. La identificación de proteínas de superficie celular que afectan una ruta reguladora implicada en la virulencia es particularmente prometedora debido a la caracterización de la proteína que permite técnicas inmunoterapéuticas con un efecto superior a los agentes antifúngicos existentes cuando se combate una infección por *Candida*.

50 La virulencia de *Candida albicans* está regulada por diversos factores de virulencia putativos de los que la adherencia a constituyentes del huésped y la capacidad para transformarse de levadura a hifa están entre los más críticos en la determinación de patogenidad. Aunque existen agentes antifúngicos potentes que son microbicidas para *Candida*, la mortalidad atribuible a candidemia es aproximadamente el 38 %, incluso con el tratamiento con agentes antifúngicos potentes tales como anfotericina B. Además, los agentes existentes tales como la anfotericina B tienden a mostrar una toxicidad no deseada. Aunque pueden desarrollarse agentes antifúngicos adicionales que son menos tóxicos que la anfotericina B, es improbable que se desarrollen agentes que sean más potentes. Por lo tanto, la inmunoterapia, bien pasiva o bien activa, para tratar o prevenir la candidiasis diseminada es una alternativa prometedora a la terapia antifúngica estándar.

60 Mamo y col. (Microbiol. Immunol. 2000;44(5):381-4) informa de la protección inducida en ratones vacunados con proteína de unión a colágeno recombinante (CnBP) y alfa-toxoide contra la infección provocada intramamariamente por *Staphylococcus aureus*.

Además, Sheppard y col., (J. Biol. Chem. 2004 Jul 16;279(29):30480-9) informa de la diversidad funcional y estructural en la familia de proteínas Als de *Candida albicans*.

65 Adicionalmente, Nilsson y col. (J. Clin. Invest. 15 de junio de 1998;101(12):2640-9) informa que la vacunación con un fragmento recombinante de adhesión a colágeno proporciona protección contra la muerte séptica mediada por

Staphylococcus aureus.

Por lo tanto, existe la necesidad de inmunógenos eficaces que proporcionen protección inmunitaria al huésped e inmunoprotección pasiva contra *Candida*, *S. aureus* y otros patógenos relacionados inmunógenamente. La presente invención satisface esta necesidad y proporciona también ventajas relacionadas.

Sumario de la invención

La invención proporciona una vacuna que incluye un miembro de la familia de proteínas Als que tiene actividad de adhesión celular, o un fragmento inmunógeno del mismo, opcionalmente con un coadyuvante en un medio farmacéuticamente aceptable.

El miembro de la familia de proteínas Als puede estar derivado de una cepa de *Candida* seleccionada del grupo que consta de *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* y *Candida parapsilosis* y el miembro de la familia de proteínas Als incluye Als1p, Als3p, Als5p, Als6p, Als7p o Als9p. También se proporciona un miembro aislado de la familia de proteínas Als de *Candida* que tiene adhesión celular, o un fragmento inmunógeno del mismo, para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección por *Staphylococcus aureus* en un organismo humano o animal. El método incluye administrar una cantidad inmunógena de una vacuna de un miembro de la familia de proteínas Als que tiene actividad de adhesión celular, o un fragmento inmunógeno del mismo, en un medio farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de las figuras

La figura 1A, 1B muestra la mediación de la adherencia de Als1p de *C. albicans* a células endoteliales de la vena umbilical humana. Los valores representan la media \pm DT de al menos tres experimentos independientes, cada una de ellos realizado por triplicado. (A) Adherencia de células endoteliales de mutantes complementados con *ALS1//als2 als1/als1* y *ALS1* y de CAI12(30) de tipo silvestre (B) Adherencia a células endoteliales del mutante P_{ADHI}-ALS1 que sobreexpresa *ALS1*, en comparación con *C. albicans* de tipo silvestre. El tratamiento estadístico se obtuvo mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon y se corrigió para comparaciones múltiples con la corrección de Bonferroni. **P*<0,001 para todas las comparaciones.

La figura 2A-D muestra la ubicación en la superficie celular de Als1p en filamentos de *C. albicans* mediante inmunofluorescencia indirecta. La filamentación de *C. albicans* se indujo incubando células de levadura en medio RPMI 1640 con glutamina durante 1,5 horas a 37 °C. Se detectó Als1p mediante incubación de organismos primeramente con anticuerpo monoclonal (mAb) de ratón anti-Als1p seguido de IgG anti-ratón de cabra etiquetada con FITC. La superficie celular de *C. albicans* se tiñó también con anticuerpo (Ab) policlonal anti-*C. albicans* conjugado con Alexa 594 (Molecular Probes, Eugene, OR, Estados Unidos). Las áreas con tinción amarilla representa la ubicación de Als1p. (A) *C. albicans* de tipo silvestre. (B) cepa mutante *als1/als1*. (C) *als1/als1* complementada con *ALS1* de tipo silvestre (D) mutante de sobreexpresión P_{ADHI}-ALS1.

Las figuras 3A, 3B muestran la mediación de Als1p sobre la filamentación de *C. albicans* en medio sólido. Se dispusieron blastosporas de *C. albicans* en placas con agar de Lee y se incubaron a 37 °C durante 4 días (A) o 3 días (B).

Las figuras 4A, 4B muestran el control de la expresión de *ALS1* y la mediación de la filamentación de *C. albicans* mediante la ruta reguladora de la filamentación de *EFG1*. (A) Análisis de inmunotransferencia (Northern) que muestra la expresión de *ALS1* en (i) mutantes deficientes de distintas rutas reguladoras de la filamentación. (ii) mutante *efg1/efg1* complementado bien con *EFG1* o bien con P_{ADHI}-ALS1. Se extrajo el ARN total de células cultivadas en medio RPMI 1640 + glutamina a 37 °C durante 90 minutos para inducir la filamentación. Las manchas se analizaron con *ALS1* y *TEF1*. (B) Fotomicrográficos del mutante *efg1/efg1* y del mutante *efg1/efg1* complementado con P_{ADHI}-ALS1 cultivado en placas con agar de Lee a 37 °C durante 4 días.

Las figuras 5A, 5B muestran la reducción de virulencia en el modelo murino de candidiasis diseminada hematógicamente por (A) a ratones Balb/C macho (n = 30 para cada cepa de levadura) se inyectaron blastosporas en fase estacionaria (10⁶ por ratón en 0,5 ml de PBS). Las curvas son los resultados compilados de tres experimentos replicados (n = 30 ratones para cada cepa). Los tiempos por duplicado de todas las cepas, cultivadas en YPD a 30 °C, variaron entre 1,29 y 1,52 horas y no fueron estadísticamente diferentes unos de otros. Se usó un análisis de inmunotransferencia (Southern) del ADN cromosómico total para comparar la identidad del genotipo de cepas de *C. albicans* recuperadas de órganos infectados con los de cepas de *C. albicans* usadas para infectar el ratón. El tratamiento estadístico se obtuvo mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon y se corrigió para comparaciones múltiples con la corrección de Bonferroni. **P*<0,002 para el mutante *als1/als1* frente a cada una de las otras cepas. (B) Micrográficos histológicos de riñones infectados con *C. albicans* de tipo silvestre, mutante nulo *als1* homocigótico o mutante complementado con *ALS1* heterocigótico. Se recogieron muestras de riñón 28 horas (a) o 40 (b) horas después de la infección, se fijaron en paraformaldehído y se tiñeron secciones con plata (magnificación X400). Las flechas denotan las células de *C. albicans*.

La figura 6 muestra el efecto profiláctico de anticuerpos anti-ALS contra candidiasis diseminada como función de animales supervivientes durante en periodo de 30 días para animales a los que se ha infundido polisueros anti-Als I p.

La figura 7 es un alineamiento de secuencias de polipéptidos de la porción N-terminal de polipéptidos ALS seleccionados dispuestos por fenotipo de adherencia. Las tres líneas de la parte superior son las secuencias de polipéptidos ALS1, 3 y 5 (SEC ID N°: 1-3, respectivamente) que se unen a células endoteliales. Las tres secuencias de la parte inferior de polipéptidos ALS6, 7 y 9 (SEC ID N°: 4-6, respectivamente) que no se unen a células endoteliales. La última línea representa la secuencia consenso de la familia de polipéptidos ALS (SEC ID N°:7).

La figura 8 muestra que las proteínas Als confieren propiedades de adherencia específicas de sustrato cuando se expresan heterológicamente en *Saccharomyces cerevisiae*. Cada panel muestra el porcentaje de adherencia de una cepa de expresión de Als_p (barras con relleno) a una diversidad de sustratos a los que se sabe que se adhiere *C. albicans*. La adherencia de *S. cerevisiae* transformada con el vector vacío (barras sin relleno) se incluye en cada panel como control negativo. Gel, gelatina; FN, fibronectina; LN, laminina; FaDU, células epiteliales FaDU; EC, células endoteliales. *, $p < 0,01$ cuando se comparan con el plásmido vacío de control mediante análisis del factor único de varianza. Los resultados son la media \pm D.T. de al menos tres experimentos realizados por triplicado.

La figura 9 muestra que el intercambio de dominios demuestra que la adherencia específica del sustrato se determina mediante la composición del dominio N-terminal de proteínas Als. Una representación del gen o constructo ALS que se está analizando se representa con una barra compuesta por secuencias de ALS5 (negro) o ALS6 (blanco). Las propiedades de adherencia de cada mutante se representan como un fotomicrográfico que ilustra la adherencia de *S. cerevisiae* transformada a perlas recubiertas con fibronectina y un gráfico que demuestra la adherencia a gelatina (barras negras) y células endoteliales (barras grises) tal como se han medido en el ensayo en placas de 6 pocillos. Los resultados son la media \pm D.T. de al menos tres experimentos, realizado cada uno por triplicado.

La figura 10 muestra que un subconjunto de proteínas Als media la invasión de células endoteliales cuando se expresan en *S. cerevisiae*. A, la adherencia a células endoteliales de cepas de *S. cerevisiae* que expresan proteínas Als o transformadas con el plásmido vacío (control). Los datos representan el número total de organismos asociados a células endoteliales y se expresan como células por campo de potencia alta. B, grado de invasión de células endoteliales de Als_p que expresa cepas de *S. cerevisiae* presentado como el número de organismos intracelulares por campo de potencia alta. *, $p < 0,01$ cuando se comparan con el plásmido vacío de control mediante análisis del factor único de varianza. Los resultados son la media \pm D.T. de al menos tres experimentos realizados por triplicado.

La figura 11 muestra que un alineamiento de la secuencia de aminoácidos N-terminal de proteínas Als de función conocida demuestra un patrón alternativo de CR y HVR. A, porcentaje de identidad de consenso entre las regiones N-terminales de proteínas Als de función conocida. Nótese que no se muestra la región del péptido de señal (aminoácidos 1-20). Las cajas abiertas indican las regiones denominadas HVR 1-7. B, alineamiento esquemático de proteínas Als (SEC ID N°:1-6, respectivamente) que muestra la composición de las HVR individuales. Las secuencias se disponen para comparar proteínas con una afinidad a múltiples sustratos a los que se une poco o sustratos no identificados. El número de aminoácidos en cada región conservada se indica en paréntesis.

La figura 12 muestra los espectros de CD y FTIR del dominio N-terminal de proteínas Als1. A, espectro de dicroísmo circular (CD) de Als1p 10 μ M en solución salina tamponada con fosfatos. B, espectro FTIR de autopelícula de Als1p hidratada con vapor de D₂O.

La figura 13 muestra una comparación de propiedades físico-químicas predichas de los dominios N-terminales entre la familia de proteínas Als. Las características hidrófobas, electrostáticas o de enlace de hidrógeno se proyectan en superficies accesibles a agua de cada dominio. Las hidrófobas se muestran como sigue: marrón, las más hidrófobas; azul, las más hidrófilas. Las electrostáticas (continuo espectral) se muestran como sigue: rojo, carga más positiva (+10 kcal/mol); azul, carga más negativa (-10 kcal/mol). El potencial de unión a hidrógeno (enlace de H) se muestra como sigue: rojo, donante; azul, aceptor. Las proteínas Als se pueden distinguir en tres grupos sobre la base del conjunto de estas propiedades. Por ejemplo, nótese los perfiles hidrófobos, electrostáticos y de enlace de hidrógeno similares entre proteínas Als del grupo A, Als1p, Als3p y Als5p. Por el contrario, los miembros del grupo B de Als, Als6p y Als7p, mostraron diferencias sorprendentes en características hidrófobas y electrostáticas de las del grupo A de Als. Además de los perfiles bioquímicos, nótese la diferencia en la estructura predicha entre estos dominios.

Figura 14. Modelo conceptual de relaciones estructurales-funcionales en proteínas de la familia Als. Las proteínas Als están compuestas por tres componentes generales: un dominio N-terminal, repeticiones en tándem y un dominio C-terminal rico en serina/treonina que contiene un anclaje de glucosilfosfatidilinositol que está interconectado con la pared celular de *C. albicans*. Tal como se ilustra, las proteínas Als contienen múltiples regiones de lámina β antiparalelas conservadas (CR1-n) que están interpuestas mediante separaciones extendidas, características de la superfamilia de inmunoglobulinas. La proyección a partir de dominios de lámina β son estructuras de bucle/hélice que contienen las HVR. Las propiedades físico-químicas tridimensionales de HVR de proteínas Als específicas gobiernan probablemente las interacciones con sustratos huésped que confieren funciones adhesivas e invasivas a

Candida. Por razones de ilustración, sólo se muestran tres dominios de lámina β /hélice y sus respectivos componentes CR/HVR. Nótese que esta proyección se observa en ángulos rectos con respecto a las imágenes estructurales mostradas en la figura 13.

- 5 Figura 15. La inmunización de ratones (de cría ya retirados) con rAls1p-N mejora la supervivencia durante la candidiasis diseminada subsiguiente. Supervivencia de ratones inmunizados con Als1p más coadyuvante. N = 16 ratones por grupo en experimentos realizados por duplicado en días diferentes; Coady. = coadyuvante. *p <0,05 frente a coadyuvante.
- 10 Figura 16. La inmunización con rAls1p-N mejora la supervivencia de ratones de cría ya retirados y de ratones jóvenes. La supervivencia de ratones de cría ya retirados (A) y jóvenes (B) infectados con un inóculo rápidamente fatal de 10^6 de *C. albicans*. N = 16 ratones por grupo en experimentos realizados por duplicado en días diferentes; Coady. = coadyuvante. *p <0,05 frente a coadyuvante.
- 15 Figura 17. Las valoraciones anti-rAls1p-N no se correlacionan con la supervivencia. Valoraciones de anticuerpos policlonales anti-rAls1p-N realizadas en ratones Balb/c inmunizados con dosis variables de rAls1p-N con o sin coadyuvante. Coady. = coadyuvante. *p \leq 0,005 para 200 μ g frente a todos los demás.
- 20 Figura 18. Sólo la dosis protectora de rAls1p-N induce un aumento de esplenocitos Th1 estimulados por *C. albicans*. Inducción de esplenocitos Th1 ($CD4^+IFN-\alpha^+IL-4$) y Th2 ($CD4^+TFN-\alpha^+IL-4^+$) mediante diferentes dosis de la vacuna de rAls1p-N. Los esplenocitos de ratones inmunizados (n = 9 por grupo) se estimularon durante 48 h con *C. albicans* pregerminada destruida térmicamente y después se analizaron mediante citometría de flujo en 3 colores. *p <0,03 frente a coadyuvante.
- 25 Figura 19. Sólo la dosis protectora de rAls1p-N induce un aumento de hipersensibilidad de tipo retardado estimulada por rAls1p-N. Hipersensibilidad de tipo retardado, evaluada mediante la inflamación de las almohadillas plantares en ratones (n = 9-12 por grupo) vacunados con rAls1p-N o CFA solo. Los ratones se inmunizaron con la cantidad indicada de rAls1p-N y después se les inyectaron 50 μ g de rAls1p-N en la almohadilla plantar. La inflamación de la almohadilla plantar se evaluó 24 horas después. *p < 0,05 frente a coadyuvante, 0,2 μ g y 200 μ g.
- 30 Figura 20. La vacuna de rAls1p-N requiere linfocitos T, pero no linfocitos B, para inducir inmunidad protectora. La supervivencia de ratones deficientes en linfocitos B, deficientes en linfocitos T (desnudos) y ratones control Balb/c de tipo silvestre congénitos (n = 7 u 8 por grupo) se evaluó simultáneamente después de la vacunación con rAls1p-N + coadyuvante o coadyuvante solo. *p < 0,04 frente a coadyuvante solo, *p = 0,003 frente a tratados con coadyuvante de tipo silvestre.
- 35 Figura 21. La vacunación SQ con rAls1p-N induce una respuesta DTH *in vivo* en ratones inmunocompetentes. La inflamación de las almohadillas se evaluó 24 h después de la inyección de 50 μ g de rAls1p-N en la almohadilla plantar de ratones BALB/c (n = 10 por grupo). Las medianas de los valores se representan como barras negras. *p = 0,002 frente a control mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon.
- 40 Figura 22. La vacuna de rAls1p-N mejora la supervivencia de ratones inmunocompetentes con candidiasis diseminada hematógicamente y reduce la carga fúngica en tejidos. A) Supervivencia de ratones BALB/c vacunados o control (n = 7 o 10 por grupo para 2,5 o 5×10^5 inóculos, respectivamente) infectados subsiguientemente a través de la vena de la cola con *C. albicans*. Cada experimento se terminó a los 30 días después de la infección con todos los ratones restantes que parecían estar bien. *p = 0,05 frente a control mediante la prueba de rango logarítmico. B) Carga fúngica en riñón en ratones BALB/c (n = 7 por grupo) infectados a través de la vena de la cola con 5×10^5 blastosporas de *C. albicans*. El eje y refleja el límite inferior de detección del ensayo. Las medianas de los valores se representan como barras negras. *p = 0,01 frente a control mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon.
- 50 Figura 23. La vacuna rAls1p-N induce una reacción DTH en ratones neutropénicos y mejora su supervivencia durante la candidiasis diseminada hematógicamente subsiguiente. La inflamación de las almohadillas se evaluó 24 h después de la inyección de 50 μ g de rAls1p-N en la almohadilla plantar de ratones BALB/c (n = 10 para el control n=8 para rAls1p-N). *p = 0,006 frente a control mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon. B) Supervivencia de ratones BALB/c neutropénicos (n = 16 por grupo a partir de 2 experimentos) infectados con $2,5 \times 10^4$ blastosporas de *C. albicans*. *p = 0,007 frente a control de coadyuvante mediante la prueba de rango logarítmico.
- 55 Figura 24. La vacuna de rAls1 p-N reduce la gravedad de lesiones fúngicas histopatológicas en las lenguas de ratones con candidiasis orofaríngea. N = 4 ratones por grupo. Los registros inflamatorios generados por un observador no enterado se describen en el texto. *p = 0,03 mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon.
- 60 La figura 25 muestra que la vacuna de rAls3p-N, pero no la de rAls1p-N, reduce la colonización fúngica de la vagina de ratones inoculados con *C. albicans* (*p=0,01 frente a ratones vacunados con CFA solo, mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon) N= 11 ratones por grupo.
- 65

La figura 26 muestra un mapa de homología de Als1p frente al factor de aglutinamiento A de *S. aureus* (cln67A). Los sitios funcionales de consenso de Als1p de *C. albicans* y CifA de *S. aureus* se cartografiaron en el modelo de homología de Als1p. Numerosos residuos del mapa de los extremos N-terminales de Als1p y CifA a un motivo de hendidura de consenso que es donde se une al sustrato se predice para que tenga lugar para ambas adhesinas.

5 La figura 27 muestra que las vacunas de rAls1p-N y rAls3p-N mejoran la supervivencia de ratones estafilocócemicos. (* $p < 0,003$ frente a ratones vacunados con CFA solo, mediante la prueba de rango logarítmico). N = 22 ratones por grupo.

10 La figura 28 muestra que la valoraciones de anticuerpos no se correlacionan con el grado de protección de ratones vacunados individualmente, pero distinguen ratones no vacunados de ratones vacunados. Se prepararon valoraciones de anticuerpos monoclonales anti-rAls1p-N o anti-rAls3p-N en ratones Balb/c inmunizados con CFA solo o CFA + 20 μg de rAls1 p-N o rAls3p-N, respectivamente. En general existe una correlación significativa entre valoraciones de anticuerpos y supervivencia ($\rho = 0,474$, $p = 0,0057$), indicando que las valoraciones de anticuerpos pueden usarse como marcador sustituto para la protección de vacuna. No obstante, cuando se excluyen los datos de ratones que recibieron CFA solo, no existe correlación entre valoraciones de anticuerpos y supervivencia de ratones vacunados con rAls1p-N o rAls3p-N ($\rho = 0,041143$, $p = 0,847$), indicando que es probable que los anticuerpos no sean el mecanismo predominante de protección de la vacuna.

20 La figura 29 muestra que la vacuna rAls1p-N protege ratones CD1 no consanguíneos de candidiasis diseminada hematógicamente. A) los ratones CD1 ($n = 8$ por grupo) se vacunaron SQ con rAls1p-N (20 μg) + CFA o CFA solo, y se infectaron a través de la vena de la cola con SC53-14 de *C. albicans* catorce días después del refuerzo. B) los ratones CD1 ($n = 8$ por grupo) se vacunaron SQ con rAls1p-N a diversas dosis con alumbre o con alumbre solo y se infectaron a través de la vena de la cola con SC53-14 de *C. albicans* catorce días después del refuerzo. * $p = 0,05$ frente a coadyuvante mediante el ensayo de rango logarítmico.

30 La figura 30 muestra que la vacuna rAls1 p-N mejora la supervivencia de ratones Balb/c infectados con una de las diversas cepas de *C. albicans*. Supervivencia de ratones Balb/c inmunizados con rAls1p-N más CFA frente a CFA solo e infectados a través de la vena de la cola con 15563 (7×10^5 blastosporas), 16240 (4×10^5 blastosporas) o 36082 (4×10^5 blastosporas) de *C. albicans* ($n = 8$ ratones por grupo). * $p = 0,05$ frente a coadyuvante control mediante la prueba de rango logarítmico.

35 La figura 31 muestra que la vacuna de rAls1p-N reduce la carga fúngica en tejidos en ratones Balb/c infectados con varias especies de *Candida no-albicans*. Los ratones Balb/c ($n = 5$ por grupo) se vacunaron con CFA o CFA + rAls1p-N (20 μg) y se infectaron a través de la vena de la cola con *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* o *C. tropicalis*. Los inóculos infecciosos se muestran en paréntesis debajo de los nombres de las especies. Se determinó la carga fúngica en riñón el día cinco después de la infección. El eje y refleja el límite inferior de detección del ensayo. * $p < 0,05$ frente a coadyuvante control mediante ensayo de Steel no paramétrico para comparaciones múltiples.

40 La figura 32 muestra que ratones inmunizados con rAls3p-N generaron anticuerpos que reaccionan de forma cruzada contra rAls1p-N. Las valoraciones de ratones individuales inmunizados con CFA solo, CFA + rAls1 p-N o CFA + rAls3p-N. N = 7 ratones por grupo para CFA y CFA + rAls3p-N; $n = 6$ ratones para CFA + rAls1p-N. * $p < 0,05$ frente a CFA solo; ** $p < 0,002$ frente a CFA solo y $p < 0,011$ frente a CFA + rAls1p-N mediante la prueba U de Mann Whitney. Las barras denotan medianas.

50 La figura 33 muestra que tanto rAls1p-N como rAls3p-N prepararon ratones para respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado *in vivo*. Los ratones ($n = 7$ por grupo para CFA y CFA + rAls3p-N; $n = 6$ para CFA + rAls1p-N) se vacunaron con CFA solo, CFA + rAls1p-N o CFA + rAls3p-N. La hipersensibilidad de tipo retardado *in vivo* se midió mediante inflamación de la almohadilla plantar. * $p < 0,05$ frente a CFA solo mediante la prueba U de Mann Whitney. Las barras denotan medianas.

55 La figura 34 muestra que las vacunas rAls1p-N y rAls3p-N mediaron una eficacia similar contra candidiasis diseminada hematógicamente murina. Supervivencia de ratones Balb/c ($n = 15$ por grupo a partir de 2 experimentos para CFA y CFA + rAls3p-N, y $n = 14$ a partir de 2 experimentos para CFA + rAls1p-N) infectados a través de la vena de la cola con 5×10^5 blastosporas de *C. albicans*. El experimento se terminó el día 28 con todos los ratones remanentes que parecían estar bien. * $p \leq 0,0001$ frente a CFA control mediante el ensayo de rango logarítmico.

60 La figura 35 muestra que la hipersensibilidad de tipo retardado *in vivo* se correlaciona con la supervivencia durante la candidiasis diseminada. Se midieron valoraciones de anticuerpos anti-rAls1p-N o anti-rAls3p-N y reacciones de inflamación de almohadilla plantar en ratones ($n = 7$ por grupo para CFA o CFA + rAls3p-N, $n = 6$ para CFA + rAls1p-N) dos días antes de la infección a través de la vena de la cola con *C. albicans*. Las correlaciones se determinaron con la prueba de suma de rangos de Spearman.

65 La figura 36 muestra que la vacuna de rAls3p-N reduce significativamente la carga fúngica en tejidos durante la candidiasis orofaríngea murina. La carga fúngica en la lengua en ratones ($n = 7$ para CFA y 8 para grupos

vacunados con rAls1 p-N o rAls3p-N) con candidiasis orofaríngea. El eje y refleja el límite inferior de detección del ensayo. *p < 0,005 frente a CFA mediante la prueba U de Mann Whitney.

La figura 37 muestra que rAls3p-N redujo la carga fúngica vaginal en comparación con CFA solo y CFA + rAls1p-N en vaginitis por *Candida* murina. Carga fúngica vaginal en ratones (n = 11 por grupo a partir de 2 experimentos) vacunados con CFA, CFA + rAls1p-N o CFA + rAls3p-N. El eje y refleja el límite inferior de detección del ensayo. *p ≤ 0,02 frente CFA y CFA + rAls1p-N mediante la prueba de Steel para comparaciones múltiples.

Descripción detallada de la invención

Candida albicans y *Staphylococcus aureus* son patógenos comunes de seres humanos. Por ejemplo, *C. albicans*; aunque normalmente un comensal inocuo, este organismo puede causar una diversidad de afecciones que varían de infección mucocutánea superficial tal como candidiasis vaginal y/o orofaríngea, a implicación orgánica profunda en candidiasis diseminada. Antes de provocar la enfermedad, el hongo coloniza el tracto gastrointestinal y en algunos casos la piel y las membranas mucosas. La adherencia a las superficies de la mucosa del huésped es un requisito previo clave para esta etapa inicial. Después de la colonización, la *C. albicans* penetra en el torrente sanguíneo a través de dispositivos intravasculares infectados o mediante transmigración a través de la mucosa gastrointestinal puesta en riesgo por quimioterapia o úlcera por estrés. Después, los organismos se diseminan a través del torrente sanguíneo, se unen al endotelio vascular y penetran en el mismo para salir desde el árbol vascular e invadir órganos profundos tales como hígado, bazo y riñón.

La identificación y caracterizaciones funcionales de una diversidad de ejemplos de miembros de la familia de proteínas Als descritos en el presente documento permiten que esta familia de proteínas se use eficazmente en el tratamiento de candidiasis. La actividad de unión específica a diversos sustratos y otras funciones de adhesión celular selectivas pueden explotarse en la producción de vacunas para la inmunización activa o pasiva, en la producción de péptidos, análogos de inhibidores miméticos de la adhesión celular para reducir o prevenir la infección inicial mediante la inhibición de la unión, la adhesión a una célula huésped o la invasión de la misma. Además, la unión diferencial y los perfiles de invasión permiten diseñar y usar la inhibición de amplio espectro o dirigida de actividades de miembros de la familia de proteínas Als. Adicionalmente, fragmentos funcionales que confieren actividad de unión y/o invasiva permiten la eliminación de secuencias de proteínas extrañas no deseadas, aumentando de este modo la eficacia de la vacuna o el inhibidor terapéutico de miembros de la familia de proteínas Als.

La naturaleza de la patogénesis de *C. albicans* por adherencia a células endoteliales se trata en el documento USP 5.578.309. Para una descripción de los genes ALS1 y las características de los mismos, incluida la caracterización del producto génico como una adhesina, véase Fu, Y., G. Rieg, W.A. Forzi, P.H. Belanger, J.E.J. Edwards y S.G. Filler. 1998. . Infect. Immun. 66:1783-1786; Hoyer, L.L. 1997. Fu Y, Ibrahim AS, Sheppard DC, Chen Y-C, French SW, Cutler JE, Filler SG, Edwards, JE, Jr. 2002. *Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the EFG1 filamentation pathway. Molecular Microbiology 44:61-72. Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, Phan QT, Fu Y, Ibrahim AS, Filler SG, Zhang M, Waring AJ, Edwards, Jr., JE 2004. Functional and Structural Diversity in the Als Protein Family of *Candida albicans*. Journal Biological Chemistry. 279: 30480-30489. The ALS gene family of *Candida albicans*. International Society for Human and Animal Mycology SALS1morge, Italy:(Abstract); Hoyer, L.L., S. Scherer, A.R. Shatzman, and G.P. Livi. 1995. *Candida albicans* ALS1: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif. Mol. Microbiol. 15:39-54.

A este respecto, el patógeno fúngico humano *Candida albicans* coloniza e invade una amplia serie de tejidos huésped. La adherencia a constituyentes del huésped tiene un papel importante en este proceso. Se ha encontrado que dos miembros de la familia de proteínas Als de *C. albicans* (Als1p y Als5p) median la adherencia y ejemplifican las actividades de unión, adhesión e invasión celular de miembros de la familia de proteínas Als. Tal como se ha descrito en el presente documento, se clonaron miembros de la familia de genes ALS y se expresaron en *S. cerevisiae* para caracterizar sus funciones individuales. Distintas proteínas Als confieren distintos perfiles de adherencia a diversos sustratos huésped. Usando constructos Als5p-Als6p quiméricos, las regiones que median la adherencia específica del sustrato se localizaron en los dominios N-terminales de proteínas Als. En particular, un subconjunto de proteínas Als también mediaron la invasión celular endotelial, una función de esta familia desconocida previamente. En consecuencia con estos resultados, el modelo de homología reveló que los miembros de Als contienen motivos de lámina β antiparalelos interperpetuados por regiones extendidas, homólogos a adhesinas o invasinas de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Este hallazgo se confirmó usando difracción circular y análisis espectrométrico de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) del dominio N-terminal de Als1p. Se encontraron regiones específicas de hipervariabilidad de aminoácidos entre los dominios N-terminales de proteínas Als, y modelos basados en energía predijeron similitudes y diferencias en los dominios N-terminales que probablemente gobiernen las diversas funciones de los miembros de la familia Als. En conjunto, estos resultados indican que la diversidad estructural y funcional dentro de la familia Als proporciona *C. albicans* con una serie de proteínas de pared celular capaz de reconocer e interactuar con un amplio abanico de constituyentes del huésped durante la infección.

La invención proporciona una vacuna que tiene un miembro de la familia de proteínas Als aislado que tiene actividad

de adhesión celular, o un fragmento inmunógeno del mismo, y opcionalmente un coadyuvante en un medio farmacéuticamente aceptable. La vacuna puede ser un miembro de la familia de proteínas Als derivado de una especie de *Candida* tal como *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* o *Candida parapsilosis*. El miembro de la familia de proteínas Als puede ser, por ejemplo, Als1p, Als3p, Als5p, Als6p, Als7p y Als9p, o un fragmento inmunógeno de los mismos. Pueden usarse de manera similar como vacuna de la invención todos los otros miembros de la familia de proteínas Als dentro de una especie de *Candida*.

La presente invención usa el producto génico de un miembro de la familia de proteínas de secuencia similar a aglutinina de *C. albicans* como vacuna para tratar, prevenir o aliviar candidiasis diseminada. La vacuna es eficaz contra distintas cepas de *C. albicans*, así como contra diferentes especies de *Candida*. El miembro de la familia de proteínas Als puede ser, por ejemplo, Als1p, Als3p, Als5p, Als6p, Als7p y Als9p. La invención aprovecha el papel de los productos génicos de ALS en la adherencia a células endoteliales y/o epiteliales y la invasión de las mismas por *C. albicans* y la susceptibilidad de la proteína de superficie expresada por el miembro de la familia de proteínas Als para su uso como una vacuna para retardar la patogénesis del organismo.

En conformidad con la presente invención, un gen miembro de la familia de ALS codifica una adhesina de superficie que se selecciona como la diana de una estrategia inmunoterapéutica contra *C. albicans*. Una demostración de que el producto de expresión del gen *ALS1*, la proteína Als1p, tiene características estructurales típicas de proteínas de superficie y se expresa, de hecho, en la superficie celular de *C. albicans*, es un criterio para proteínas que actúan como adhesinas en los tejidos del huésped. Los miembros de la familia de proteínas Als pueden caracterizarse estructuralmente para que tengan un péptido de señal en el extremo N-terminal, una secuencia de anclaje de glicosilfosfatidilinosina (GPI) en el extremo C-terminal y una región central que comprende repeticiones ricas en treonina y serina. Además, los miembros de la familia de proteínas Als tienen sitios de N- y O-glicosilación, típico de proteínas que se expresan en la superficie celular. La inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo monoclonal dirigido contra el extremo N-terminal de Als1p, por ejemplo, reveló que Als1p se expresa durante la fase logarítmica de blastosporas. La expresión de Als1p se incrementa durante la formación de hifas y se ubica en la unión en la que el elemento de hifa se extiende a partir de las blastosporas tal como se indica mediante tinción difusa de superficie. Además, este anticuerpo monoclonal bloqueó la adherencia potenciada del mutante de sobreexpresión de *C. albicans* a células endoteliales, estableciendo por lo tanto el principio para las aplicaciones de inmunoterapia que usan Als1p. Las características funcionales tal como se relacionan con la adhesión y la invasión celular de otros miembros de la familia Als se describen más adelante en el ejemplo VI.

Por lo tanto, según un aspecto, la invención proporciona una proteína de adhesión superficial miembro de la familia Als denominada, por ejemplo, Als1p, Als3p, Als5p, Als6p, Als7p y Als9p, o un fragmento, conjugado o análogo de la misma, que tenga propiedades útiles cuando se formula en una composición farmacéutica y se administra como vacuna con o sin un coadyuvante. Puede obtenerse un miembro de la familia de proteínas Als, combinación de dos o más miembros de la familia de proteínas Als o uno o varios fragmentos funcionales, análogos, conjugados o derivados del mismo, por ejemplo, de *Candida albicans*. Las moléculas adhesinas o invasinas similares o análogos o derivados de las mismas pueden ser de *Candida* y pueden obtenerse, por ejemplo, de especies pertenecientes al género *Candida*, por ejemplo *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* y *Candida tropicalis*. Puede obtenerse en forma aislada o purificada una proteína adhesina o invasina de superficie según la invención y, por lo tanto, según una realización de la invención, una proteína adhesina de superficie de *Candida* miembro de la familia de proteínas Als, o un fragmento funcional, fragmento inmunógeno, análogo, conjugado o derivado de la misma, se formula como una vacuna para provocar una respuesta inmunitaria en un paciente para facilitar una respuesta inmunitaria contra *Candida* y/o para bloquear la adhesión del organismo a las células endoteliales. Los fragmentos de miembros de la familia de proteínas Als que muestran una actividad de unión, adhesión o invasión similar a un miembro de la familia de proteínas Als se denominan en el presente documento fragmentos funcionales. Los fragmentos de miembros de la familia de proteínas que son capaces de facilitar o una respuesta inmunitaria a anticuerpo o celular contra especies de *Candida* se denominan en el presente documento fragmentos inmunógenos. Los ejemplos de fragmentos funcionales incluyen la región polipeptídica N-terminal del miembro de la familia de proteínas Als que se describe más adelante en el ejemplo VI. Los ejemplos de fragmentos inmunógenos incluyen la región polipeptídica N-terminal de Als, la región polipeptídica C-terminal de Als, así como cualquier otro fragmento de Als que sea suficiente para general una respuesta inmunitaria a anticuerpo, celular o tanto a anticuerpo como celular. Dichos fragmentos inmunógenos pueden ser tan pequeños como aproximadamente cuatro aminoácidos y tan grandes como el polipéptido intacto, e incluyen todas las longitudes de polipéptido entre dichas longitudes.

Puede identificarse y caracterizarse posteriormente usando los criterios descritos en el presente documento para un gen o producto génico miembro de la familia ALS un análogo o derivado de proteína de adhesión superficial según la invención. Por ejemplo, un mutante nulo del análogo o derivado compartiría una adhesión marcadamente reducida a células endoteliales en comparación con los controles. De forma similar, la sobreexpresión del análogo o derivado en un modelo apropiado mostraría una adherencia aumentada a células endoteliales en comparación con los controles y se confirmaría como una adhesina de superficie celular según los criterios descritos anteriormente. Además, los antisueros a un análogo o derivado pueden reaccionar de forma cruzada con anticuerpos anti-miembros de la familia de proteínas Als y pueden mostrar tiempos de supervivencia aumentados cuando se administran a un modelo murino de *candidiasis* diseminada tal como se divulga en el presente documento. La eficacia de las vacunas de la invención contra diferentes cepas de *Candida*, diferentes especies de *Candida*,

5 otras bacterias y agentes infecciosos y su amplio intervalo de actividad inmunitaria se describen más adelante y se ejemplifican en los ejemplos. Por ejemplo, el ejemplo V muestra que los anticuerpos anti-ALS son eficaces contra infecciones por *Candida* mucosales y diseminadas hematógicamente. El ejemplo VII muestra que la vacunación con rAls1 p-N mejora la supervivencia durante candidiasis diseminada murina potenciando la inmunidad mediada por células. El ejemplo VIII muestra que las vacunas de la invención reducen la carga fúngica y mejoran la supervivencia en ratones tanto inmunocompetentes como inmunocomprometidos. El ejemplo IX muestra la eficacia de las vacunas ALS de la invención contra infecciones por *S. aureus*. El ejemplo X ejemplifica que las vacunas de la invención son eficaces contra distintas cepas de *C. albicans* y contra distintas especies tales como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, así como la eficacia en diferentes modelos animales. El ejemplo XI también ejemplifica la eficacia de las distintas vacunas de la invención en distintos modelos animales y proporciona una comparación de las distintas respuestas facilitadas y la potencia de dos vacunas de ALS representativas.

15 La actividad de adhesión celular incluye la unión a gelatina, fibronectina, laminina, células epiteliales o células endoteliales y/o promueve la invasión celular.

20 Además, la invención también proporciona un miembro aislado de la familia de las proteínas Als de *Candida* que tiene actividad de adhesión celular, o un fragmento inmunógeno del mismo, para su uso en un método de tratamiento o prevención de una infección por *Staphylococcus aureus* en un organismo humano o animal. En particular, el método de tratamiento o prevención de infecciones por *Staphylococcus aureus* incluye administrar una cantidad inmunógena de una vacuna de un miembro de la familia de proteínas Als aislado que tenga actividad de adhesión celular, o un fragmento inmunógeno del mismo, en un medio farmacéuticamente aceptable.

25 Als1p y Als3p son particularmente eficaces debido a una homología significativa con proteínas de superficie celular de *S. aureus*. La secuencia y homología estructural de, por ejemplo, Als1p y Als3p, se describen más adelante en el ejemplo IX. Dadas las enseñanzas y los consejos que se proporcionan en el presente documento, los expertos en la técnica entenderán que las vacunas y métodos de la invención pueden aplicarse al tratamiento de infecciones por *Candida* y por *Staphylococcus* igualmente. De forma similar, dadas las enseñanzas y métodos descritos en el presente documento, los expertos en la técnica también entenderán que las vacunas y métodos de la invención también pueden aplicarse a otros patógenos que tengan polipéptidos de superficie celular con inmunogenicidad, secuencia y/o homología estructural similar a los miembros de la familia de proteínas Als descritos en el presente documento, incluidos hongos, bacterias y similares.

35 La estrategias inmunoterapéuticas y/o de inhibición de polipéptidos Als de adhesión o invasión celular contra la infección por *Candida* o *Staphylococcus* pueden operar al nivel de unión a las células endoteliales vasculares, así como a través de un efector corriente abajo de la ruta reguladora de filamentación. Una estrategia inmunoterapéutica o la inhibición de la unión usando un miembro de la familia de proteínas Als o un fragmento funcional es útil en este contexto debido a que: (i) la morbimortalidad asociada con candidiasis diseminada hematógicamente y otros patógenos infecciosos permanece inaceptablemente alta, incluso con la terapia antifúngica disponible actualmente; (ii) una incidencia creciente de resistencia antifúngica y antibacteriana está asociada con el uso creciente de agentes antifúngicos y antibacterianos, iii) la población de pacientes en riesgo de sufrir una infección grave por *Candida* y *Staphylococcus* está bien definida y es muy elevada, e incluye pacientes en proceso posoperatorio, pacientes con trasplante, pacientes de cáncer y recién nacidos con peso reducido; y iv) un alto porcentaje de los pacientes que desarrollan infecciones por *Candida* graves no son neutropénicos y, por lo tanto, pueden responder a una vacuna o un polipéptido competidor o compuesto inhibidor. Por estas razones, *Candida* y *Staphylococcus* son dianas fúngicas y bacterianas atractivas para la inmunoterapia pasiva, la inmunoterapia activa o una combinación de inmunoterapia activa o pasiva. Adicionalmente, *Candida* también es atractiva para la inhibición competitiva usando un polipéptido miembro de la familia de proteínas Als, un fragmento funcional del mismo y/o un compuesto o mimético del mismo que se una a uno o varios miembros de la familia Als y prevenga la unión de *Candida* a un receptor de la célula huésped.

45 Dadas las enseñanzas y los consejos que se proporcionan en el presente documento, los expertos en la técnica entenderán que pueden usarse métodos inmunoterapéuticos bien conocidos en la técnica con los miembros de la familia de proteínas Als de la invención, fragmentos inmunógenos, análogos, conjugados y/o derivados de los mismos, para usar uno o varias moléculas como inmunógeno en una composición farmacéuticamente aceptable administrada como vacuna con o sin un coadyuvante. Para los fines de la presente invención, el término "farmacéutico" o la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refieren a composiciones formuladas mediante técnicas conocidas que no sean tóxicas y, cuando se desee, se usen con vehículos o aditivos que puedan administrarse de forma segura a seres humanos. La administración puede realizarse usando vías bien conocidas que incluyen, por ejemplo, inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea. Dichas vacunas de la invención también pueden incluir tampones, sales u otros disolventes conocidos por los expertos en la técnica para conservar la actividad de la vacuna en solución. De forma similar, puede usarse cualquiera entre una amplia serie de coadyuvantes bien conocidos en la técnica con la vacuna de la invención para facilitar, promover o potenciar una respuesta inmunitaria terapéuticamente eficaz capaz de reducir o bloquear la unión, invasión y/o infección por *Candida* o *Staphylococcus* a una célula huésped susceptible de ello.

65 De forma similar, dadas las enseñanzas y los consejos que se proporcionan en el presente documento, los expertos

- en la técnica también entenderán que los métodos terapéuticos bien conocidos en la técnica para administrar y bloquear selectivamente la unión de moléculas de superficie celular a sus receptores cognados también pueden usarse con los miembros de la familia de proteínas Als de la invención, fragmentos funciones, análogos, conjugados y/o derivados de los mismos, mediante el uso de uno o varios miembros de la familia de proteínas Als como inhibidor
- 5 en una composición farmacéuticamente aceptable. Como con las formulaciones de vacuna, las formulaciones inhibitoras pueden administrarse de forma similar usando métodos bien conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea. Dichas composiciones inhibitoras que se unen a receptores de miembros de la familia Als y bloquean la unión a un miembro de la familia de proteínas Als también pueden incluir tampones, sales u otros disolventes conocidos por los expertos en la técnica para conservar
- 10 la actividad de la vacuna en solución. Además, puede usarse cualquiera entre una amplia serie de formulaciones bien conocidas en la técnica con las composiciones inhibitoras de la invención para dirigir y/o potenciar el suministro o absorción de modo que se reduzca o inhiba la unión de *Candida* o *Staphylococcus* a una célula huésped susceptible de ello, la invasión y/o infección de la misma.
- 15 Con respecto a la molécula usada como inmunógeno terapéutico y/o inhibidor de la unión a receptor en conformidad con la presente invención, los expertos en la técnica reconocerán que las moléculas miembros de la familia de proteínas Als pueden estar truncadas o fragmentadas sin perder las cualidades esenciales como vacuna inmunógena o inhibidor de la adhesión o invasión celular. Por ejemplo, un miembro de la familia de proteínas Als puede estar truncado para proporcionar un fragmento N-terminal mediante truncamiento del extremo C-terminal con
- 20 conservación de las propiedades funcionales descritas anteriormente y que se describen más adelante en los ejemplos. De forma similar, los fragmentos C-terminales pueden generarse mediante truncamiento del extremo N-terminal con conservación de sus propiedades funcionales. También pueden realizarse otras modificaciones según las enseñanzas y los consejos que se proporcionan en el presente documento en conformidad con la presente invención para crear otros fragmentos funcionales de miembros de la familia de proteínas Als, fragmentos
- 25 inmunógenos, análogos o derivados de los mismos, con el fin de lograr las propiedades terapéuticamente útiles descritas en el presente documento con la proteína nativa.

Un aspecto de la eficacia terapéutica de miembros de la familia de proteínas Als y métodos de la invención logra la interferencia con la regulación de filamentación, bloquear la adherencia del organismo a constituyentes del huésped

30 y potenciar la eliminación del organismo usando células inmunoefectoras y otros mecanismos fisiológicos. Debido a que las células endoteliales cubren la mayor parte de la vasculatura, las estrategias para bloquear la adherencia, invasión y/o ambas del organismo a células endoteliales usando anticuerpos, proteínas, polipéptidos o péptidos miembros de la familia Als, o cualquier combinación de los mismos, incluyen la realización útil de la presente invención. Tal como se ha descrito previamente, dichas terapias de bloqueo de la adherencia y/o invasión incluyen la

35 inmunoterapia activa o pasiva o la unión inhibitora dirigida contra las adhesinas, invasinas o receptores cognados de *Candida* descritos en el presente documento. Por lo tanto, por ejemplo, puede inyectarse cualquier huésped adecuado con proteína y/o el suero recogido para obtener el anticuerpo anti-adhesina deseado después de purificación y/o concentración apropiadas. Antes de la inyección, la proteína adhesina o invasina o una combinación de las mismas puede formularse en un vehículo adecuado, preferentemente un inmunoestimulante conocido tal

40 como un polisacárido, o en una formulación de administración tal como liposomas o composiciones de liberación retardada. Por lo tanto, según otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína adhesina o invasina de *Candida* junto con uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables en una formulación para su uso como vacuna o inhibidor del receptor de Als.

- 45 La invención proporciona la mejora y/o prevención de la infección por *Candida* o por *Staphylococcus* bloqueando la adherencia de *C. albicans* a las células endoteliales o epiteliales de un constituyente de un huésped o mediante, por ejemplo, la unión de anticuerpos al *Staphylococcus* y permitiendo que mecanismos inmunitarios eliminen el patógeno. Por lo tanto, según un aspecto de la invención, una composición farmacéutica que comprende una
- 50 proteína adhesina o invasina miembro de la familia de proteínas Als, un fragmento funcional o inmunógeno, derivado, análogo o conjugado de la misma, se formula como una vacuna o inhibidor del receptor de Als en una composición farmacéutica que contiene un vehículo biocompatible para inyección o infusión y se administra a un paciente. Además, la administración directa de antisuero obtenido contra proteínas miembros de la familia Als o
- 55 proteínas miembros de la familia Als aisladas o recombinantes puede usarse para bloquear la adherencia de *C. albicans* a un constituyente de huésped mamífero o efectuar la eliminación de un patógeno de *Staphylococcus*. Los antisueros contra proteínas adhesinas pueden obtenerse mediante técnicas conocidas, Kohler y Milstein, Nature 256: 495-499 (1975), y pueden humanizarse para reducir la antigenicidad, véase USP 5.693.762, o producirse en ratones transgénicos dejando un gen de inmunoglobulina humana no reordenada, véase el documento USP 5.877.397. De modo similar, también pueden producirse miembros de la familia de proteínas Als aislados o recombinantes usando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica incluidos, por ejemplo, la producción
- 60 recombinante descrita en los ejemplos más adelante.

Otro uso más de la invención, por ejemplo, es el uso de proteínas adhesinas o invasinas para desarrollar estrategias de vacuna para la prevención y/o mejora de infecciones por *Candida* o por *Staphylococcus*. Por lo tanto, según un aspecto de la invención, por ejemplo, pueden usarse técnicas inmunológicas estándar para construir una estrategia

65 de vacuna de varios componentes que pueda potenciar y/o facilitar la respuesta inmunitaria de un constituyente del huésped para bloquear la adherencia de *C. albicans* o para efectuar la eliminación de patógenos de *Staphylococcus*.

Otro uso más de la invención, por ejemplo, es desarrollar estrategias de vacuna de ADN. Por lo tanto, según un aspecto de la invención, por ejemplo, los polinucleótidos miembros de la familia ALS que codifican adhesinas o invasinas miembros de la familia de proteínas Als o un fragmento funcional de los mismos se administra según un protocolo diseñado para obtener una respuesta inmunitaria al producto génico. Véase, por ejemplo., Felgner, documento USP 5.703.055.

Otro uso más de la invención, por ejemplo, es desarrollar estrategias de vacunas de combinación. Por lo tanto, según un aspecto de la invención, por ejemplo, pueden usarse anticuerpos anti-miembros de la familia de proteínas ALS con anticuerpos en el tratamiento y/o prevención de infecciones por *Candida* o *Staphylococcus*. Véase USP 5.578.309.

Los ejemplos siguientes ilustran la utilidad inmunoterapéutica de la adhesina ALS I sobre la base de medidas preventivas o tratamiento de candidiasis diseminada. El ejemplo 1 describe la preparación de un mutante nulo de ALS I y una cepa de *C. albicans* caracteriza por la sobreexpresión de ALS1 para confirmar la mediación de adherencia a células endoteliales. El ejemplo 2 describe la ubicación de Als1p y la implicación de la ruta reguladora de la filamentación efg. El ejemplo 3 describe la purificación de proteína adhesina ALS1. El ejemplo 4 describe la preparación de anticuerpos policlonales de conejo formulados contra la proteína adhesiva de superficie ALS1 para su uso para demostrar el bloqueo de la proteína adhesina de superficie. El ejemplo 5 describe el bloqueo de adherencia *in vivo*, usando anticuerpos policlonales formulados contra proteínas de adhesión superficial ALS1 tal como se describe en el presente documento según la invención para proteger contra la candidiasis diseminada en un modelo murino. El ejemplo VI describe las características estructurales y funcionales de miembros de la familia de proteínas Als.

Los siguientes ejemplos se pretende que ilustren pero que no limiten la presente invención.

Ejemplo I

Adherencia mediada por Als1 de *C. albicans* a células endoteliales

Se usó la técnica URA blaster para construir un mutante nulo de *C. albicans* que carece de expresión de la Als1p. El mutante als1/als1 se construyó en la cepa de *C. albicans* CAI4 usando una modificación de la metodología Ura-blaster (Fonzi y Irwin, *Genetics* 134, 717 (1993)) tal como sigue: Se usaron dos constructos separados als1-hisG-IRA3-hisG-als1 para interrumpir los dos alelos diferentes del gen. Se generó una secuencia de codificación de Als1 de 4,9 kb con PCR de alta fidelidad (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, Estados Unidos) usando los cebadores: 5'-CCCTCGAGATGCTTCAACAATTTACATTGTTA-3' (SEC ID N°:8) y 5'-CCGCTCGAGTCACTAAATGAACAAGGACAATA-3' (SEC ID N°:9). Después, el fragmento PCR se clonó en el vector pGEM-T (Promega, Madison, WI, Estados Unidos), obteniendo de este modo pGEM-T-ALS1. El constructo hisG-URA3-hisG se liberó de pMG-7 mediante digestión con Kpn1 y Hind3 y se usó para reemplazar la porción de ALS1 liberada mediante la digestión con Kpn1 y Hind3 de pGEM-T-ALS1. El constructo als1-hisG-URA3-hisG-als1 final se liberó del plásmido por digestión con XhoI y se usó para interrumpir el primer alelo de ALS1 mediante transformación de la cepa CAI-4.

Se generó un segundo constructo als1-hisG-URA3-hisG-als1 en dos etapas. Primeramente, se clonó un fragmento Bgl2-Hind3 hisG-URA3-hisG de pMB7 en los sitios BamH1-Hind3 de pUC19, generando de este modo pYC2. Después, el pYC2 se digirió con Hind3, se cargó parcialmente con dATP y dGTP usando T4 DNA polimerasa, y después se digirió con Sma1 para producir un nuevo fragmento hisGURA3-hisG. En segundo lugar, para generar regiones flanqueantes complementarias de ALS1, se digirió pGEM-T-ALS1 con XbaI y después se cargó parcialmente con dCTP y dTTP. Este fragmento se digirió con Hpa1 para eliminar la porción central de ALS1 y después se enlazó al fragmento de hisG-URA3-hisG que genera pYC3. El plásmido se digirió después mediante XhoI para liberar un constructo que se usó para interrumpir el segundo alelo del ALS1. Se realizaron curvas de crecimiento a lo largo del experimento para asegurar que las mutaciones generadas no tuvieran efecto sobre las velocidades de crecimiento. Todas las integraciones se confirmaron mediante análisis de inmunotransferencia (Southern) usando una sonda específica de ALS1 de 0,9 kb generada por digestión de pYF5 con XbaI y HindIII.

El mutante nulo se comparó con CAI-12 de *C. albicans* (una cepa URA + revertiente) para evaluar su capacidad para adherirse *in vitro* a células endoteliales de la vena umbilical humana. Para los estudios de adherencia, se cultivaron en RPMI cultivos de células de levadura a partir de YPD (2 % de glucosa, 2 % de peptona y 1 % de extracto de levadura) realizados durante la noche con glutamina a 25 °C durante 1 hora para inducir la expresión de Als1p. Se añadieron 3 x 10² organismos en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) (Irvine Scientific, Irvine, CA, Estados Unidos) a cada pocillo de células endoteliales, después de lo cual la placa se incubó a 37 °C durante 30 minutos. El tamaño del inóculo se confirmó mediante cultivo cuantitativo en agar YPD. Al finalizar el periodo de incubación, los organismos no adherentes se aspiraron y las monocapas de células endoteliales se enjuagaron dos veces con HBSS de un modo estandarizado. Los pocillos se cubrieron con agar YPD y el número de organismos adherentes se determinó mediante el recuento de las colonias. El tratamiento estadístico se obtuvo mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon y se corrigió para comparaciones múltiples con la corrección de Bonferroni. P<0,001.

Con referencia a la figura 1, una comparación de las cepas ALS1/ALS1 y als1/als1 mostró que el mutante nulo ALS1 fue un 35 % menos adherente a células endoteliales que el CAI-12 de *C. albicans*. Para reducir la adherencia de fondo, la adherencia de la cepa de tipo silvestre cultivada en condiciones que no expresan ALS1 se comparó con un mutante que expresa autónomamente Als1p. Este mutante se construyó integrando una tercera copia de ALS1 con el control del promotor ADH1 constitutivo en el tipo silvestre de *C. albicans*. Para lograr la expresión constitutiva del ALS1 en *C. albicans*, un gen URA3 generado mediante PCR de extremo romo se unió a un sitio Bg12 de lados romos del vector pOCUS-2 (Novagen, Madison, WI, Estados Unidos), proporcionando pOU-2. Un fragmento de Not1-Stu1 de 2,4 kb, que contenía el promotor y el terminador del gen de alcohol deshidrogenasa (ADH1) de *C. albicans* (aislado de pLH-ADHpt, y proporcionado gentilmente por A. Brown, Aberdeen, Reino Unido), se clonó en pOU-2 después de la digestión con Not1 y Stu1. El nuevo plásmido, denominado pOAU-3, tenía sólo un sitio Bg12 entre el promotor y el terminador de ADH1. El ALS1 que codifica la secuencia flanqueada por sitios de enzima de restricción BamHI se generó mediante PCR de alta fidelidad usando pYF-5 como plantilla y los cebadores siguientes: 5'-CGGGATCCAGATGCTTCA-ACAATTTACATTG-3' (SEC ID N°:10) y 5'-CGGGATGCTCACTAATGAACAAGGACAATA-3' (SEC ID N°:11). Este fragmento PCR se digirió con BamHI y después se clonó en el sitio Bg12 compatible de pOAU-3 para generar pAU-1. Finalmente, pAU-1 se linearizó usando XbaI antes de transformar CAI-4 de *C. albicans*. La integración dirigida al sitio se confirmó usando un análisis de inmunotransferencia (Southern). Con referencia a la figura 1B, la sobreexpresión de ALS1 en esta cepa P_{ADHI}-ALS1 dio como resultado un aumento del 76 % en la adherencia a células endoteliales en comparación con *C. albicans* de tipo silvestre. En la comparación de la adherencia a células endoteliales del tipo silvestre con la del mutante sobreexpresado, se cultivaron células de levadura durante la noche en YPD a 25 °C (Als1p en condición no inducida). La expresión de Als1p no se indujo para reducir la adherencia de fondo del tipo silvestre, magnificando de este modo el papel de Als1p en la adherencia a través del gen híbrido P_{ADHI}-ALS1. El ensayo de adherencia se llevó a cabo tal como se ha descrito anteriormente. El tratamiento estadístico se obtuvo mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon y se corrigió para comparaciones múltiples con la corrección de Bonferroni. P<0,001.

Se preparó un anticuerpo IgG murino anti-Als1p contra un extremo N-terminal purificado y truncado de Als1p (aminoácido N° 17 al N° 432) expresado usando el sistema de expresión de levaduras Clontech YEXpress[™] (Palo Alto, CA, Estados Unidos). La capacidad de bloquear la adherencia de estos anticuerpos anti-Als1p monoclonales se evaluó incubando células de *C. albicans* con bien anticuerpos anti-Als1 o bien IgG de ratón (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos) a una dilución 1:50. Después de ello, las células de levadura se usaron en el ensayo de adherencia tal como se ha descrito anteriormente. El tratamiento estadístico se obtuvo mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon y se corrigió para comparaciones múltiples con la corrección de Bonferroni. P<0,001. Los resultados revelaron que la adherencia de la cepa P_{ADHI}-ALS1 se redujo de 26,8 % ± 3,5 % a 14,7 % ± 5,3 %. Por lo tanto, los efectos de la delección y sobreexpresión de ALS1 demostraron que Als1p media la adherencia de *C. albicans* a células endoteliales.

Ejemplo II

40 Ubicación de Als1p

Para que el Als1p funcione como una adhesina, debe estar localizado en la superficie celular. La ubicación en la superficie celular de Als1p se verificó usando inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo monoclonal anti-Als1p. La tinción difusa se detectó en la superficie de blastosporas durante el crecimiento exponencial. Esta tinción no fue detectable en blastosporas en la fase estacionaria. Con referencia a la figura 2A, cuando se indujeron blastosporas para producir filamentos, se observó una tinción intensa que estaba localizada exclusivamente en la base del filamento emergente. No se observó inmunofluorescencia con el mutante als1/als1, confirmando la especificidad de este anticuerpo por Als1p. Véase la Figura 2B. Estos resultados establecen que la Als1p es una proteína de superficie celular.

Esta ubicación específica de Als1p en la unión blastospora-filamento implica a Als1p en el proceso de filamentación. Para determinar el mecanismo se analizó el fenotipo de filamentación de los mutantes de ALS1 de *C. albicans*. Con referencia a la figura 3A, el mutante als1/als1 no formó filamentos después de una incubación de 4 días en medio sólido de Lee, mientras que las cepas ALS1/ALS1 y ALS1/als1, así como el mutante complementado con ALS1 habían producido abundantes filamentos en este punto temporal. El mutante als1/als1 fue capaz de formar filamentos después de periodos de incubación más prolongados. Además, la sobreexpresión de ALS1 aumentó la filamentación: la cepa P_{ADHI}-ALS1 formó filamentos profusamente después de una incubación de 3 días, mientras que la cepa de tipo silvestre había producido escasos filamentos en este punto temporal. Véase la Figura 3B. Para confirmar adicionalmente el papel de Als1p en la filamentación, se proporcionó un control negativo usando un mutante similar al mutante de sobreexpresión de ALS1, excepto en que la secuencia codificante del ALS1 se insertó en la orientación opuesta. Se demostró que el fenotipo de filamentación de la cepa resultante era similar al de la cepa de tipo silvestre. Las propiedades de Als1p que inducen la filamentación son específicas de células cultivadas en medios sólidos, porque todas las cepas descritas anteriormente formaron filamentos de forma comparable en medios líquidos. Los datos demostraron que Als1p promueve la filamentación e implica la expresión de ALS1 en la regulación de las rutas de control de filamentación. Se realizaron análisis de inmunotransferencia (Northern) de la expresión de ALS1 en mutantes con defectos en cada una de estas rutas, incluidos los mutantes efg1/efg1,

cph1/cph1, efg1/efg cph1/cph1, tup1/tup1 y cla4/cla4. Con referencia a la figura 4A, los mutantes en los que ambos alelos de EFG1 habían sido interrumpidos no expresaron ALS1. La introducción de una copia de EFG1 de tipo silvestre en el mutante efg1/efg1 restauró la expresión de ALS1, aunque a un nivel reducido. Véase la Figura 4B. Además, tal como se observa en la figura 4A, ninguna de las otras mutaciones reguladoras de la filamentación alteró significativamente la expresión de ALS 1 (Fig. 4A). Por lo tanto, se requiere Efg1p para la expresión de ALS1.

Si Efg1p estimula la expresión de ALS1, que a su vez induce la filamentación, la expresión de ALS1 en la cepa efg1/efg1 restaura la filamentación. Se integró un alelo funcional de ALS1 bajo el control del promotor ADH1 en la cepa efg1/efg1. Para investigar la posibilidad de que el producto génico de ALS1 pueda complementar el defecto de filamentación en mutantes nulos de efg1, se transformó un mutante nulo de Ura efg1 con pAU-1 linearizado. Los clones Ura⁺ se seleccionaron y la integración en la tercera copia de ALS1 se confirmó mediante PCR usando los cebadores: 5'-CCGTTTATACCATCCAATC-3' (SEC ID N°:13) y 5'-CTACA TCCTCCAATGATATAAC-3' (SEC ID N°:14). La cepa resultante expresó ALS1 autónomamente y recuperó la capacidad de formar filamentos en agar de Lee. Véanse las figuras 4B y C. Por lo tanto, Efg1p induce la filamentación a través de la expresión de ALS1.

Debido a que la filamentación es un factor de virulencia crítico en *C. albicans*, la delineación de una ruta que regule la filamentación tiene implicaciones importantes para la patogenicidad. Antes de ALS1, no se había identificado ningún gen que codificara un efector corriente abajo de estas rutas reguladoras. La interrupción de otros dos genes que codifican proteínas de superficie celular, HWP1 y INT1, dio como resultado mutantes con defectos de filamentación. Aunque la expresión de HWP1 también está regulada por Efg1p, la expresión autónoma de HWP1 en el mutante efg1/efg1 no pudo restaurar la filamentación. Por lo tanto, el Hwp1p solo no funciona como efector de filamentación corriente abajo de EFG1. Además, los elementos reguladores que controlan la expresión de INT1 no son conocidos. Por lo tanto, la Als1p es la primera proteína de superficie celular identificada que funciona como efector de filamentación corriente abajo, sugiriendo por lo tanto un papel esencial de esta proteína en la virulencia de *C. albicans*.

La contribución de Als1p a la virulencia de *C. albicans* se analizó en un modelo de candidiasis diseminada hematógicamente, A.S. Ibrahim y col., Infect. Immun. 63, 1993 (1995). Con referencia a la figura 5A, los ratones infectados con el mutante nulo als1/als1 sobrevivieron un periodo significativamente más largo que los ratones infectados con la cepa ALS1/ALS1, el mutante ALS1/als1 o el mutante complementado con ALS1. Después de 28 horas de infección, los riñones de ratones infectados con el mutante als1/als1 contenían significativamente menos organismos ($5,70 \pm 0,46 \log_{10}$ CFU/g) ($P < 0,0006$ para ambas comparaciones). No se detectó ninguna diferencia en los recuentos de colonias de organismo recuperados del bazo, los pulmones o el hígado de ratones infectados con cualquiera de las cepas en cualquiera de los puntos temporales analizados. Estos resultados indican que Als1p es importante para el crecimiento de *C. albicans* y la persistencia en el riñón durante las primeras 28 horas de la infección. Con referencia a la figura 5B, el examen de los riñones de ratones después de 28 horas de infección reveló que el mutante als1/als1 produjo filamentos significativamente más cortos y facilitó una respuesta inflamatoria más débil que cualquiera de las cepas de tipo silvestre complementadas con ALS1. No obstante, a 40 horas de infección, la longitud de los filamentos y el número de leucocitos que los rodeaban fue similar para las tres cepas.

El defecto de filamentación del mutante als1/als1 observado en histopatología fue paralelo a los ensayos de filamentación *in vitro* en medios sólidos. Este mutante mostró filamentación defectuosa en puntos temporales tempranos *in vivo* e *in vitro*. Este defecto se resolvió eventualmente con infección/incubación prolongada. Estos resultados sugieren que una ruta reguladora de la filamentación que sea independiente de ALS1 puede ser operativa en puntos temporales tardíos. La activación de esta ruta de filamentación alternativa tras 40 horas de infección es probablemente la razón de por qué los ratones infectados con el mutante als1/als1 murieron en los siguientes 2-3 días.

En conjunto estos datos demuestran que el ALS1 de *C. albicans* codifica una proteína de superficie celular que media tanto la adherencia a células endoteliales como la filamentación. El Als1p es el único efector identificado corriente abajo de cualquier ruta reguladora de filamentación conocida en *C. albicans*. Adicionalmente, el Als1p contribuye a la virulencia en la infección hemotógena por *Candida*. La localización en la superficie celular y la funcionalidad dual de Als1p lo hace una diana atractiva para terapias basadas en fármacos o inmunitarias.

55 Ejemplo III

Purificación de proteína adhesina ALS1

La proteína ALS1 sintetizada por *E. coli* es adecuada como inmunógeno. No obstante, las proteínas eucarióticas sintetizadas por *E. coli* pueden no ser funcionales debido a un plegamiento impropio o la falta de glucosilación. Por lo tanto, para determinar si la proteína ALS1 puede bloquear la adherencia de *C. albicans* a células endoteliales, la proteína, preferentemente, se purifica a partir de *C. albicans* producida mediante ingeniería genética.

Se usó una PCR para amplificar un fragmento de ALS1 a partir de los nucleótidos 52 a 1296. Este fragmento de 1246 pb abarca el extremo N-terminal de la proteína ALS1 predicha desde el extremo del péptido señal hasta el comienzo de las repeticiones en tándem. Esta región de ALS1 se amplificó debido a que probablemente codifica el

sitio de unión de la adhesina, sobre la base de su homología con la región de unión del producto génico Aga1 de *S. cerevisiae*. Además, esta porción de la proteína ALS1 predicha tiene pocos sitios de glucosilación y su tamaño es apropiado para la expresión eficiente en *E. coli*.

5 El fragmento de ALS1 se enlazó a pQE32 para producir pINS5. En este plásmido la proteína se expresa con el control del promotor *lac* y tiene una etiqueta 6-his condensada a su extremo N-terminal de tal modo que puede purificarse por afinidad. Transformamos *E. coli* con pINS5, la cultivamos en condiciones inducidas (en presencia de IPTG) y después lisamos las células. El lisado celular se pasó a través de una columna de Ni²⁺-agarosa para purificar por afinidad la proteína de fusión ALS1-6His. Este procedimiento proporcionó cantidades sustanciales de
10 ALS1-6His. La proteína de fusión se purificó adicionalmente por SDS-PAGE. La banda que contenía la proteína se eliminó del gel de forma que se pudo preparar anticuerpo de conejo policlonal contra la misma. Un experto en la técnica apreciará que la proteína adhesina de superficie según la invención puede prepararse y purificarse usando una diversidad de métodos conocidos. La secuencia de Als1p se indica en la figura 7.

15 **Ejemplo IV**

Preparación de antisueros policlonales contra la proteína ALS1

Para determinar si los anticuerpos contra la proteína ALS I bloquean la adherencia de *Candida albicans* a células endoteliales y epiteliales, y al constituyente del huésped seleccionado *in vitro*, se inocularon conejos con *S. cerevisiae* transformada con proteína ALS1. El protocolo de inmunización usado fue la dosis y el programa usados por Hasenclever y Mitchell para la producción de antisueros que identificaron la relación antigénica entre varias especies de *Candida*. Hasenclever, H. F. y W. O. Mitchell. 1960. Antigenic relationships of *Torulopsis glabrata* and seven species of the genus *Candida*. J. Bacteriol. 79:677-681. También se produjeron antisueros control contra *S. cerevisiae* transformada con el plásmido vacío. Todas las células de levadura se cultivaron en galactosa para inducir la expresión de los genes ALS. Antes de analizarlo en los experimentos de adherencia, el suero se inactivó térmicamente a 56 °C para eliminar toda actividad complementaria.

Los sueros de conejos inmunizados se absorbieron con células completas de *S. cerevisiae* transformadas con plásmido vacío para eliminar anticuerpos que fueran reactivos con componentes de la levadura distintos de la proteína ALS1. La valoración de los antisueros se determinó mediante inmunofluorescencia usando *S. cerevisiae* que expresa el gen ALS1. Se adquirieron anticuerpos anti-conejo etiquetados con FITC de fuentes comerciales (Southern Biotechnology, Inc). Los anticuerpos secundarios purificados por afinidad fueron esenciales debido a que muchos sueros disponibles comercialmente contenían anticuerpos reactivos con glucano y manano de levadura. Los anticuerpos secundarios se analizaron previamente usando *Candida albicans* y *S. cerevisiae* transformada con el plásmido y se absorbieron tal como se necesitara para eliminar cualquier anticuerpo anti-*S. cerevisiae* o anti-*Candida*. Los controles negativo fueron 1) suero preinmunitario 2) *S. cerevisiae* transformada con el plásmido vacío y 3) *S. cerevisiae* transformada con el gen ALS pero cultivada en condiciones que suprimían la expresión del gen ALS (glucosa).

Además de los experimentos anteriores, se usó un análisis de inmunotransferencia (Western) para proporcionar confirmación adicional de que un antisuero se une específicamente a la proteína ALS contra la que se ha preparado. La *S. cerevisiae* transformada con el ALS1 se cultivó en condiciones inducidas y sus membranas plasmáticas se aislaron usando métodos estándar. Panaretou R y P. Piper. 1996. Isolation of yeast plasma membranes. páginas 117-121. En I.H. Evans. (ed.), Yeast Protocols. Methods in Cell and Molecular Biology. Humana Press, Totowa, Nueva Jersey, Estados Unidos. También se prepararon membranas plasmáticas de *S. cerevisiae* transformada con el plásmido vacío y se cultivaron en condiciones idénticas. Las proteínas de membrana se separaron mediante SDS-PAGE y después se transfirieron a membrana de PVDF para la electroinmunotransferencia. Harrow, E. y D. Lane. 1988. Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Después de bloquearse con leche no grasa, la mancha se incubó con el antisuero ALS. El antisuero preabsorbido no reaccionó con proteínas extraídas de *S. cerevisiae* que contenían plásmido vacío. Este antisuero bloqueó la adherencia de pYF5 de *S. cerevisiae* (un clon que expresa ALS1 de *Candida albicans*) a células endoteliales.

55 **Ejemplo V**

Anticuerpos policlonales contra proteínas ALS específicas de ratones protegidos profilácticamente de infecciones por *Candida* mucosales y diseminadas hematógicamente

Habiendo identificado los antisueros que bloquean la adherencia de un clon de *S. cerevisiae* transformado con un gen ALS en las condiciones anteriores, se demostró que estos antisueros protegían ratones de la exposición intravenosa a *Candida albicans*.

Los antisueros contra las proteínas ALS se analizaron primeramente en el modelo murino de candidiasis diseminada hematógicamente. Los anticuerpos anti-ALS purificados por afinidad son eficaces en la prevención de la adhesión de células de levadura a diversos sustratos (véase el ejemplo 3). La purificación por afinidad es útil en este sistema debido a que las dosis de anticuerpos pueden determinarse con precisión. Además, los antisueros no fraccionados

contendrán indudablemente cantidades elevadas de anticuerpo dirigido a antígenos en las células vehículo de *S. cerevisiae*. Muchos de estos anticuerpos anti-*Saccharomyces* se unirían probablemente a *C. albicans* y harían la interpretación de estos resultados imposible. Adicionalmente, es bastante posible que el procedimiento usado para eluir anticuerpos de *S. cerevisiae* que expresan la proteína ALS también puede eluir pequeñas cantidades de manano o glucano de levadura que podrían tener actividad similar a coadyuvante. Los anticuerpos purificados mediante inmunofinidad se purifican adicionalmente antes de su uso. También pueden preabsorberse con esplenocitos de ratón.

Pueden administrarse dosis de anticuerpos para cubrir el intervalo que abarca los niveles de anticuerpo en suero que pueden esperarse en la mayor parte de los protocolos de inmunización activa y para cubrir el intervalo de dosis de anticuerpos que se usan típicamente para la inmunización pasiva en modelos murinos de candidiasis. Véase Dromer, F., J. Charreire, A. Contrepolis, C. Carbon y P. Yeni. 1987, Protection, of mice against experimental cryptococcosis by anti-Cryptococcus neoformans monoclonal antibody, Infect. Immun. 55:749-752; Han, Y. y J.E. Cutler. 1995, Antibody response that protects against disseminated candidiasis, Infect. Immun. 63:2714-2719; Mukherjee, J., M.D. Scharff y A. Casadevall. 1992, Protective murine monoclonal antibodies to Cryptococcus neoformans, Infect. Immun. 60:4534-4541; Sanford, J.E., D.M. Lupan, A.M. Schlageter y T.R. Kozel. 1990, Passive immunization against Cryptococcus neoformans with an isotype-switch family of monoclonal antibodies reactive with cryptococcal polysaccharide, Infect. Immun. 58:1919-1923. Se administró a ratones BALB/c (hembras, 7 semanas de edad, el NCI) anti-ALS que había sido absorbido con células esplénicas de ratón mediante una inyección intraperitoneal (i.p.). Los ratones control recibieron suero presangrado que había sido absorbido con células esplénicas de ratón, suero anti-ALS intacto o DPBS, respectivamente. Para la preabsorción, se mezclaron 2 ml de sueros anti-ALS o presangrados con 100 µl de células esplénicas de ratón (BALB/c, hembras de 7 semanas de edad, NCI) (aprox. 9×10^6 células por ml) a temperatura ambiente durante 20 minutos. La mezcla se lavó con DPBS estéril caliente mediante centrifugación (a 300 g) durante 3 minutos. Este procedimiento se repitió tres veces. El volumen de inyección i.p. fue de 0,4 ml por ratón. Cuatro horas más tarde, los ratones se expusieron a *C. albicans* (cepa CA-1; 5×10^5 células de levadura hidrófilas por ratón mediante inyección i.v. Después se midieron sus tiempos de supervivencia. Véase la Figura 6.

Estudios previos han demostrado que los anticuerpos administrados por vía intraperitoneal se transfieren rápidamente (en minutos) y casi completamente al suero (Kozel y Casadevall, observaciones no publicadas). Como control para efectos de administración de preparaciones de anticuerpos, se trató un grupo paralelo de ratones con anticuerpos aislados a partir de suero preinmunitario que se ha absorbido con *S. cerevisiae* transformada con el gen ALS. Se midieron el tiempo de supervivencia y los niveles de levadura por gramo de riñón. De nuevo, con referencia a la figura 6, los ratones infectados intravenosamente con 10^6 blastosporas del mutante nulo ALS1 tenían una mediana del tiempo de supervivencia superior en comparación con ratones infectados con CAI-12 de *Candida albicans* o *Candida albicans* en la que un alelo del ALS1 se había eliminado ($p=0,003$).

Estos resultados indican que las estrategias inmunoterapéuticas que usan las proteínas ALS1 como vacuna tienen un efecto profiláctico protector contra candidiasis diseminada.

Ejemplo VI

Diversidad funcional y estructural en la familia de proteínas Als de *Candida albicans*

El aislamiento y caracterización del gen *ALS1* de *C. albicans* mediante complementación heteróloga de *S. cerevisiae* no adherente se ha descrito previamente (Fu y col., Infect. Immun. 66:1783-1786 (1998)). El *ALS1* codifica una proteína de superficie celular que media la adherencia a células endoteliales y epiteliales. La interrupción de ambas copias de este gen en *C. albicans* está asociada con una reducción del 35 % en la adherencia a células endoteliales y la sobreexpresión de *ALS1* aumenta la adherencia un 125 % (Fu y col., Mol. Microbiol. 44:61-72 (2002)).

El *ALS1* es un miembro de una familia de genes de *C. albicans* extensa que consta de al menos ocho miembros descritos originariamente por Hoyer y col. (Hoyer y col., Trends Microbiol. 9:176-180 (2001), Zhao y col., Microbiology 149:2947-2960 (2003)). Estos genes codifican las proteínas de superficie celular que están caracterizadas por tres dominios. La región N-terminal contiene un péptido de señal putativo y está relativamente conservada entre las proteínas Als. Se ha predicho que esta región está pobremente glucosilada (Zhao y col., Microbiology 149:2947-2960 (2003), Hoyer y col., Genetics 157:1555-1567 (2001)). La porción central de estas proteínas consta de un número variable de repeticiones en tándem (~36 aminoácidos de longitud) y está seguida por una región C-terminal rica en serina-treonina que contiene una secuencia de anclaje de glicosilfosfatidilinositol (referencia anterior). Aunque se sabe que las proteínas que codifican esta familia de genes se expresan durante la infección (Hoyer y col., Infect. Immun. 67:4251-4255 (1999), Zhang y col., Genome Res. 13:2005-2017 (2003)), la función de las distintas proteínas Als no se ha investigado en detalle.

Se realizó la expresión heteróloga de proteínas Als en *S. cerevisiae* no adherente para evaluar la función de proteínas Als y para evitar la adherencia de fondo alta mediada por las otras múltiples adhesinas expresadas por *C. albicans*. Este sistema de expresión heterólogo se ha usado ampliamente para el estudio de genes de *C. albicans*, incluido el aislamiento y caracterización de adhesinas *ALS1*, *ALS5* y *EAP1* (Li y col., Eukaryot Cell 2:1266-1273

(2003), Fu y col., Infect. Immun. 66:1783-1786 (1998), Gaur y col., Infect. Immun. 65:5289-5294 (1997)). Tal como se describe más adelante, usando este sistema de modelo se demostró que las proteínas Als tienen diversas funciones adhesivas e invasivas. En consecuencia con estos resultados, los modelos de homología indicaron que las proteínas Als están relacionadas estrechamente en estructura con miembros adhesinas e invasinas de la superfamilia de proteínas de las inmunoglobulinas. Los análisis estructurales usando CD y espectrometría de infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) confirmaron que el dominio N-terminal de Als1p está compuesto por lámina β anti-paralela, giro, hélice α y dominios no estructurados consecuentes con las estructuras de otros miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Finalmente, modelos basados en energía comparativos sugieren diferencias en propiedades físico-químicas clave de los dominios N-terminales entre proteínas Als diferentes que pueden gobernar sus funciones biológicas distintivas de adherencia e invasivas.

Para clonar miembros de la familia de ALS y expresarlos en *S. cerevisiae*, se amplificaron ALS1, -3, -5, -6, -7 y -9 exitosamente y se expresaron como se ha descrito anteriormente. Brevemente, para la clonación y otras etapas de cultivo se usó la cepa de *S. cerevisiae* S150-2B (leu2 his3 trp1 ura3) para la expresión heteróloga tal como se ha descrito previamente (Fu y col., Infect. Immun. 66:2078-2084 (1998)). Se usó la cepa SC5314 de *C. albicans* para la clonación genómica. Todas las cepas se cultivaron en medio definido mínimo (1x caldo de base de nitrógeno de levadura (Difco), glucosa al 2 % y sulfato de amonio al 0,5 %, suplementado con 100 μ g/ml de L-leucina, L-triptofano, L-histidina y sulfato de adenina) solidificado con bacto-agar al 1,5 % (Difco) según se necesitara. El cultivo de las cepas ura se apoyó con la adición de 80 μ g/ml de uridina (Sigma). Los plásmidos pGK103, que contiene ALS5, pYF5, que contiene ALS1, y pALS_n, que contiene ALS9, se han descrito previamente (Fu y col. Infect. Immun. 66:1783-1786 (1998), Gaur y col., Infect. Immun. 65:5289-5297 (1997), Lucinod y col., Proceedings of the 102nd Annual Meeting of the American Society for Microbiology, página 204, American Society for Microbiology, Salt Lake City, Utah, Estados Unidos (2002)). El plásmido pADH1, obtenido de A. Brown (Aberdeen, Reino Unido) contiene el promotor y el terminador del gen alcohol deshidrogenasa de *C. albicans* (ADH 1), que son funcionales en *S. cerevisiae* (Bailey y col., J. Bacteriol. 178:5353-5360 (1996)). Este plásmido se usó para la expresión constitutiva de genes ALS en *S. cerevisiae*.

Se obtuvieron células epiteliales orales y endoteliales vasculares humanas y se cultivaron como sigue. La línea de células epiteliales orales FaDu, aislada a partir de un carcinoma faríngeo, se adquirió de la Colección estadounidense de cultivos tipo (ATCC) y se mantuvieron según su protocolo recomendado. Se aislaron células endoteliales de venas del cordón umbilical y se mantuvieron mediante nuestra modificación descrita previamente del método de Jaffe y col. (Fu y col., Mol. Microbiol. 44:61-72 (2002), Jaffe y col., J. Clin. Invest. 52:2745-2756 (1973)). Todos los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C en un ambiente humidificado que contenía el 5 % de CO₂.

Para la clonación de los genes ALS, se identificaron secuencias genómicas de miembros de la familia ALS mediante BLAST buscando en la base de datos de Stanford (disponible en Internet en el sitio: sequence.stanford.edu/group/candida/search.html). Se generaron cebadores PCR para amplificar específicamente cada uno de los marcos de lectura abierta que incorporaron un 5' BglIII y un sitio de enzima de restricción en 3' XhoI y se muestran más adelante en la tabla I (SEC ID N°:14-19 (cebadores sentido ALS 1, 3, 5, 6, 7 y 9, respectivamente); SEC ID N°:20-25 ((cebadores antisentido ALS 1, 3, 5, 6, 7 y 9, respectivamente)). Cada gen se clonó por PCR usando el sistema de PCR de alta fidelidad Expand[®] (Roche Applied Science). Se amplificaron ALS3, ALS6 y ALS7 a partir de ADN genómico de SC5314 de *C. albicans* SC5314, mientras que ALS1, ALS5 y ALS9 se amplificaron a partir de plásmidos que se han obtenido previamente de bibliotecas genómicas de *C. albicans* (Fu y col., Infect. Immun. 66:1783-1786 (1998), Gaur y col., Infect. Immun. 65:5289-5297 (1997), Lucinod y col., Proceedings of the 102nd Annual Meeting of the American Society for Microbiology, página 204, American Society for Microbiology, Salt Lake City, Utah, Estados Unidos (2002)). Los productos PCR se enlazaron a pGEM-T-Easy (Promega) para la secuenciación. Los marcos de lectura abierta de ALS de secuencia verificada se liberaron después de pGEM-T-Easy mediante codigestión con BglIII-XhoI y se enlazaron a pADH1 de tal modo que el gen ALS de interés estuviera bajo el control de promotor ADH1. La cepa de *S. cerevisiae* S150-2B se transformó con cada uno de los constructos de sobreexpresión de ALS así como el constructo pADH1 vacío usando el método del acetato de litio. La expresión de cada gen ALS en *S. cerevisiae* se verificó mediante análisis de inmunotransferencia (Northern) antes de realizar los análisis fenotípicos.

Tabla 1

Cebadores PCR usados en la amplificación de regiones codificantes de genes ALS para la expresión heteróloga en <i>S. cerevisiae</i>		
Gen ALS	Sentido correcto (5' -3')	Antisentido (5' -3')
ALS1	AGATCTCAGATGCTTCAACAATTTACATT G	CTCGAGTCACTAAATGAACAAGGACAATA
ALS3	GAAGATCTATGCTACAACAATATACATT GTTACTC	CCGCTCGAGTTAAATAAACAAGGATAATA ATGTGATC
ALS5	AGATCTCAACTACCAACTGCTAACA	CTCGAGACCATATTATTTGGTACAATC
ALS6	AGATCTCATTACCCGACAATGAAGACA	CTCGAGTTGGTACAATCCCGTTTGA
ALS7	AGATCTTCAACAGTCTAATACCTATGA	CTCGAGACTTGATTGAATTATACCATATA
ALS9	AGATCTCGAATGCTACCACAATTCCTA	CTCGAGTCTTAGCACCCCTGACGTAGCT

La expresión de ARNm de ALS se detectó mediante análisis de inmunotransferencia (Northern) para cada constructo. A pesar del uso de tres conjuntos de cebadores, la amplificación de ALS2 y ALS4 a partir de ADN genómico de SC5314 de *C. albicans* no tuvo éxito. Dada la dificultad de secuenciar y ensamblar de forma cruzada las repeticiones en tándem de genes ALS, es posible que este fallo refleje errores en el ensamble de secuencia disponible actualmente en las bases de datos de genomas publicadas.

La citometría de flujo confirmó que cada una de las proteínas Als se expresó en la superficie de sus respectivos huéspedes de *S. cerevisiae*. Brevemente, la confirmación de la expresión de superficie celular para cada uno de los constructos Als se determinó usando inmunofluorescencia indirecta usando dos antisueros policlonales anti-Als.

El antisuero A consta de anticuerpos anti-Als1p, generados mediante inmunización de conejos con un fragmento N-terminal de 417 aminoácidos de Als1p.

El antisuero B era factor 5 de manano anti-*C. albicans* de conejo que reconoce componentes de la pared celular de *C. albicans*, pero que no actúa de forma cruzada con *S. cerevisiae* (Iatron Laboratories).

Para cada cepa, se aislaron 10^7 blastosporas del cultivo durante la noche, se bloquearon con 100 μ l de suero de cabra y después se tñeron con antisuero policlonal bien A o bien B a una dilución de 1:25, seguido por IgG de cabra anti-conejo etiquetada con isotiocianato de fluoresceína a 1:100. Se usó un instrumento FACSCaliber (Becton Dickinson) equipado con un láser de argón que emite a 488 nm para los análisis de citometría de flujo. La emisión de fluorescencia se detectó con un filtro de paso de banda de 515/40 nm. Se corrigieron los datos de fluorescencia para 10.000 eventos y la distribución de células con fluorescencia sobre la línea base (es decir, *S. cerevisiae* transformada con el plásmido vacío) se analizó para cada cepa usando el programa informático CELLQUEST (Becton Dickinson).

Tal como se muestra en la tabla II, dos anticuerpos distintos demostraron que todas las cepas que expresan Als_p muestran al menos 4 veces de aumento de la fluorescencia cuando se comparan con *S. cerevisiae* transformada con el plásmido vacío. En consecuencia con la diversidad estructural predicha entre miembros de la familia Als, los antisueros representaron diferencias en el reconocimiento de cepas de expresión de Als individuales.

Tabla II

Detección de proteínas Als en la superficie de <i>S. cerevisiae</i> mediante análisis de citometría de flujo		
Se tñeron blastosporas de cada cepa usando inmunofluorescencia indirecta con bien antisuero policlonal anti-Als1p (A) o antisuero policlonal de pared celular anti- <i>C. albicans</i> (B) y después se analizaron usando citometría de flujo. Los resultados se expresan como porcentaje de células positivas sobre el fondo (<i>S. cerevisiae</i> transformada con plásmido vacío), con las veces aumentadas en paréntesis.		
Porcentaje de células sobre el fondo (veces aumentada)		
Constructo Als	Antisuero A	Antisuero B
Plásmido vacío	(1)	(1)
Als1p	47,8(17)	50,1 (19)
Als3p	24,5 (9)	54,0 (20)
Als5p	23,5 (8)	28,2 (11)
Als6p	12,7 (4)	16,2 (6)
Als7p	22,1 (8)	15,7 (6)
Als9p	11,4(4)	33,9 (13)

Se examinaron clones de *S. cerevisiae* que expresaron las diversas proteínas Als para determinar su capacidad

para adherirse a una variedad de sustratos huésped. Tal como se describe más adelante, los resultados muestran que las proteínas Als representan distintos perfiles de adherencia específica del sustrato.

5 Los ensayos de adherencia fúngica se realizaron para determinar las propiedades de adherencia de cepas de *S. cerevisiae* transformadas. Brevemente, se usó una modificación del ensayo de adherencia (8) descrito previamente como sigue. Las placas de adherencia se recubrieron añadiendo 1 ml de una solución de 0,01 mg/ml de gelatina (Sigma), laminina (Sigma) o fibronectina (Becton Dickinson) a cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 6 pocillos (Costar) y se incubaron durante la noche a 37 °C. Para células epiteliales, se cultivaron células de segundo pasaje hasta confluencia en placas de cultivo tisular de 6 pocillos con una matriz de gelatina al 0,2 % y para células epiteliales, se cultivaron células FaDU hasta confluencia (3 días) en placas de cultivo tisular de 6 pocillos recubiertas con una matriz de fibronectina al 0,1 %. Antes de los ensayos de adherencia, los pocillos se lavaron dos veces con 1 ml de solución salina equilibrada de Hanks (HBSS). Las cepas de *S. cerevisiae* que se van a analizar se cultivaron durante la noche en medio definido mínimo a 30 °C y después se recogieron por centrifugación, se lavaron con HBSS (Irvine Scientific) y se enumeraron usando un hemacitómetro. Se añadieron trescientos organismos a cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 6 pocillos recubierta con el sustrato de interés y se incubó durante 30 min a 37 °C en CO₂. Los organismos no adherentes se eliminaron lavando dos veces de un modo estandarizado con 10 ml de HBSS. Los pocillos se cubrieron con agar YPD (extracto de levadura al 1 % (Difco), bacto-peptona al 2 % (Difco), D-glucosa al 2 %, agar al 1,5 %) y el inóculo se confirmó mediante cultivo cuantitativo. Las placas se incubaron durante 48 h a 30 °C y se realizó el recuento de las colonias. La adherencia se expresó como un porcentaje del inóculo inicial. Las diferencias en la adherencia se compararon usando un análisis de factor único de ensayo de varianza, con $p < 0,01$ considerado significativo.

25 Hubo diferencias sorprendentes en los perfiles de adherencia de los transformantes de *S. cerevisiae* a los distintos sustratos (Fig. 8). Mientras que las cepas que expresan Als1p, Als3p y Als5p se unen a todos los sustratos analizados, la *S. cerevisiae* que expresa Als6p se adhirió sólo a gelatina y la *S. cerevisiae* que expresa Als9p se adhirió a niveles superiores al fondo a laminina. Además, hubo diferencias cuantitativas en la adherencia a los diversos sustratos. Por ejemplo, en comparación con Als3p, el Als1p confiere una adherencia superior a gelatina pero una adherencia menor a células epiteliales ($p < 0,01$, análisis de factor único de varianza). Sólo la *S. cerevisiae* que expresa Als7p no se adhirió a ninguno de los sustratos analizados. Mientras que diferencias pequeñas en niveles de expresión de proteínas Als no pueden descartarse mediante los estudios de inmunofluorescencia mostrados en la tabla II, es improbable que dichas diferencias sean responsables de los patrones de unión específica al sustrato encontrados en este estudio. Se esperaría que dicho aumento o disminución general en la cantidad de proteína Als expresada en la superficie celular produjera un aumento o disminución problemático en la adherencia en todos los sustratos y no dieran como resultado las diferencias específicas del sustrato que se observaron.

35 Tal como se describe más adelante, la especificidad de unión al sustrato para proteínas Als reside en las secuencias N-terminales de proteínas Als. Brevemente, la expresión de Als5p en *S. cerevisiae* confiere adherencia a múltiples sustratos, incluidos gelatina y células endoteliales, mientras que la expresión de Als6p da como resultado adherencia sólo a gelatina. A pesar de esta marcada diferencia en la función, Als5p y Als6p son idénticos en más del 80 % en el nivel de aminoácidos. La repetición en tándem y las porciones C-terminales de estas proteínas son virtualmente idénticas, y la mayor parte de las diferencias en las secuencias están concentradas en los extremos N-terminales de estas dos proteínas. Estos datos indican que la variabilidad de secuencias N-terminales confieren especificidades de sustrato.

45 El resultado anterior se apoyó mediante los resultados de estudios que determinaban los fenotipos de adherencia de constructos ALS5/ALS6 quiméricos. Brevemente, las proteínas Als5/Als6 quiméricas se construyeron intercambiando los extremos N-terminales de cada proteína. Los genes ALS5/6 quiméricos se construyeron como sigue. Se aisló un fragmento BgIII-HpaI de ALS5 que abarca 5' de 2117 pb del gen. Después se digirió pGEM-T-ALS6 con BgIII y HpaI para liberar los 5' de 2126 pb de ALS6 y el fragmento que consta de pGEM-T-Easy más las 3 secuencias de ALS6 se aisló y se enlazó al fragmento 5' de ALS5 para generar el plásmido pGEM-T-5N6C. Se usó un enfoque idéntico usando el fragmento 5' correspondiente de ALS6 y el fragmento 3' de ALS5 para generar el plásmido p-GEM-T-6N5C. Después de la confirmación de secuencias, cada gen ALS quimérico se liberó por digestión con BgIII-XhoI y se subclonó en pADH1 como anteriormente. Después se transformó S150-2B de *S. cerevisiae* con estos constructos y se verificó la expresión mediante análisis de inmunotransferencia (Northern) antes de la caracterización de sus propiedades de adherencia.

60 La *S. cerevisiae* que expresa una fusión quimérica del extremo N-terminal de Als5p al extremo C-terminal de Als6p se adhirió tanto a gelatina como a células endoteliales de un modo similar al Als5p (fig. 9). Asimismo, las cepas que expresan la fusión quimérica del extremo N-terminal de Als6 al extremo C-terminal de Als5p se adhirieron sólo a gelatina, tal como hizo la *S. cerevisiae* que expresa Als6p (fig. 9). Además, las cepas que expresan Als5p y proteína Als5N6C quimérica se aglutinaron a perlas recubiertas con fibronectina, mientras que las que expresan Als6p y la proteína Als6N5C quimérica tenían poca o ninguna afinidad por estas perlas. En conjunto, estos datos indican que los perfiles de adherencia de estas cepas de *S. cerevisiae* transformadas están gobernados por la porción N-terminal de la proteína Als.

65 Además de las diferencias en la especificidad de sustrato demostradas entre los miembros de la familia de proteínas

Als, también se observaron diferencias en otras funciones biológicas. Por ejemplo, se demostró que un subconjunto de proteínas Als median la invasión de células endoteliales por *S. cerevisiae*. La *C. albicans* invade células endoteliales induciendo su propia endocitosis (Filler y col., Infect. Immun. 63976-983 (1995), Belanger y col., Cell Microbiol., en prensa (2002)). Esta endocitosis tiene lugar después de que el organismo se adhiera a células endoteliales; sin embargo, los ligandos de *C. albicans* requeridos para este proceso son desconocidos. Además, no está claro si se requieren ligandos de *Candida* distintos para la adherencia y la endocitosis. Además de ser no adherente, la *S. cerevisiae* no experimenta endocitosis significativa por células endoteliales. Por lo tanto, para analizar si las proteínas Als podrían servir como invasinas y como adhesinas, se determinó la capacidad de cepas de *S. cerevisiae* que expresan proteínas Als para invadir células endoteliales.

La capacidad de proteínas Als para mediar la invasión de células endoteliales se determinó usando una modificación de un ensayo de fluorescencia diferencial descrito previamente (Phan y col., Infect. Immun. 68:3485-3490 (2000)). Brevemente, se cultivaron células endoteliales hasta confluencia en cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro con fibronectina y se dispusieron en una placa de cultivo tisular de 24 pocillos (Corning). Las células se infectaron después con 10^9 blastosporas de cada una de las cepas de *S. cerevisiae* en medio RPMI 1640 (Irvine Scientific). Como control positivo, se infectaron células con un número similar de blastosporas de *C. albicans*. Después de la incubación durante 90 min, las células se enjuagaron dos veces con 0,5 ml de HBSS de un modo estandarizado y se fijaron con paraformaldehído al 3 %. Los organismos que permanecieron adherentes con respecto a la superficie de las células endoteliales se tiñeron durante 1 h con antisuero de conejo anti-*C. albicans* (Biosdesign) que se había conjugado con Alexa 568 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, Estados Unidos) que tiene fluorescencia roja. El antisuero reacciona de forma cruzada con *S. cerevisiae* a una dilución superior a 2 veces. Después, las células endoteliales se permeabilizaron en Triton X-100 al 0,2 % en solución salina tamponada con fosfatos durante 10 min, después de lo cual los organismos asociados a células (los organismos internalizados más los adherentes) se tiñeron de nuevo con antisuero anti-*C. albicans* conjugado con Alexa 488, que tiene fluorescencia verde. Después, los cubreobjetos se observaron bajo epifluorescencia. El número de organismos que había sido internalizado por las células endoteliales se determinó sustrayendo el número de organismos adherentes (con fluorescencia roja) del número de organismos asociados a células (con fluorescencia verde). Se contaron al menos 100 organismos en cada cubreobjetos y todos los experimentos se realizaron por triplicado en al menos tres ocasiones separadas.

También se realizaron ensayos de adherencia a perlas de fibronectina para caracterizar adicionalmente las características de unión a determinadas proteínas Als. A este respecto, se identificó Als5p originariamente en virtud de la capacidad de la proteína para inducir aglutinación de perlas recubiertas con fibronectina cuando se expresa sobre la superficie de *S. cerevisiae* (Gaur y col., Infect. Immun. 65:5289-5297 (1997)). Por lo tanto, se analizaron cepas de *S. cerevisiae* transformadas con ALS5, ALS6, 5N6C y 6N5C para fibronectina para determinar la adherencia a perlas usando esta metodología (Gaur y col., Infect. Immun. 65:5289-5297 (1997), Gaur y col., Infect. Immun. 67:6040-6047 (1999)). Brevemente, se recubrieron perlas magnéticas tosilladas (Dynal Biotech) con fibronectina siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se mezclaron 10 μ l de perlas recubiertas (10^6 perlas) con 1×10^8 *S. cerevisiae* transformada en 1 ml de 1 x tampón Tris-EDTA (TE), pH 7,0, y se incubaron con un mezclado suave durante 45 min. Los tubos se dispusieron en un imán para separar perlas y *S. cerevisiae* adherente de organismos no adherentes. El sobrenadante que contenía organismos no adherentes se eliminó por aspiración y las perlas remanentes se lavaron tres veces resuspendiendo en 1 ml de tampón TE, seguido por la separación magnética y la aspiración del sobrenadante. Finalmente, las perlas lavadas y los organismos adherentes se resuspendieron en 100 μ l de tampón TE y se examinaron microscópicamente para determinar la coaglutinación.

Este resultado muestra que la *S. cerevisiae* que expresa Als1p, Als3p y Als5p mostró un aumento significativo en el porcentaje de organismos asociados a células, reflejando su capacidad para adherirse a células endoteliales. Además, los organismos que expresan Als3p y, en menor medida, Als1p y Als5p mostraron una invasión de células endoteliales significativa (fig. 10).

Además de los estudios funcionales descritos anteriormente, se halló también que las proteínas Als eran homólogas a adhesinas e invasinas de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Como etapa inicial en el modelo molecular de proteínas Als, se usó un algoritmo de búsqueda basado en conocimientos para identificar moléculas que comparten similitud estructural significativa con miembros de la familia Als. Brevemente, el modelo basado en homología y energía se realizó para comparar las características físico-químicas generales de proteínas Als. Primeramente se usó un método basado en conocimientos (SWISS-MODEL) (Guex y col., Electrophoresis 18:2714-2723 (1997), Schwede y col., Nucleic Acids Res. 31:3381-3385 (2003)) para analizar y comparar alineamientos estructurales de extensión combinatoria de estructuras en las bases de datos de proteínas Swiss y Brookhaven para determinar proteínas con conformación homóloga (Shindyalov y col., Protein Eng. 11:739-747 (1998)). Este enfoque incluyó el algoritmo BLASTP2 (Altschul y col., Mol. Biol. 215:403-410 (1990)) para buscar similitudes de secuencias primarias en la base de datos ExNRL-3D. Paralelamente, se usó el algoritmo de alineamiento de secuencias dinámico SIM (Huang y col., Adv. Appl. Math. 12:337-367 (1991)) para seleccionar plantillas candidatas con la identidad de secuencias mayor. Subsiguientemente, se usó ProModII para realizar análisis de coincidencia primaria y refinada. Las proteínas resultantes se usaron como plantillas para el modelo de homología de trayectorias de esqueleto de proteínas Als.

Se generaron modelos sólidos de los dominios N-terminales de proteínas Als (por ejemplo, aminoácidos 1-480; que

preceden repeticiones en tándem iniciales) mediante enfoques complementarios. Los dominios N-terminales de proteínas Als se convirtieron en conformaciones en solución putativas mediante homología de secuencias (Composer (Topham y col. Biochem. Soc. Symp. 57:1-9 (1990)) y métodos de insertado (Matchmaker (Godzik y col., J. Mol. Biol. 227:227-238 (1992)) y de plegamiento de genes (Jaroszewski y col., Protein Sci. 7:1431-1440 (1998), Godzik y col., Protein Eng. 8:409-416 (1995), Godzik y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:12098-12102 (1992), Godzik y col., J. Comput. Aided Mol. Des. 7:397-438 (1993)) usando el programa informático SYBYL 6.9.1 (Tripos Associates) que opera en estaciones de trabajo Silicon Graphics (SGI, Inc.). Los conformeros y las cadenas laterales de aminoácidos resultantes de dominios de Als diana se refinaron mediante dinámica molecular y se minimizaron energías de cepas usando el método de campo de fuerza AMBER95 (Duan y col., J. Comput. Chem. 24:1999-2012 (2003)) y el minimizador Powell (Powell y col., Math. Programa 12:241-254 (1977)).

Estos enfoques optimizan interacciones de cadenas laterales en las que se fijan posiciones de los átomos del esqueleto peptídico. Se determinaron conformaciones preferentes a partir de dinámica molecular extendida en disolvente acuoso. Después, los ángulos de torsión de todos los enlaces peptídicos se ajustaron a $180 \pm 15^\circ$, con restricciones mínimas. En algunos casos se ejecutaron dinámicas moleculares, bien no restringidas o con regiones de hélice α restringidas por la aplicación de una penalización de 0,4 kJ a los ángulos canónicos de Ramachandran ϕ y ψ . Las minimizaciones de energía generales finales se realizaron para cada modelo después de eliminar todas las restricciones y agregados. Los modelos de dominios N-terminales de Als se priorizaron sobre la base de tres criterios: (i) energía de cepa más favorable (mecánica molecular); (ii) funciones de energía posicional empírica; y (iii) conservación de la disposición espacial de puentes de disulfuro potenciales (Godzik y col., J. Mol. Biol. 227:227-238 (1992), Bowie y col., Science 253:164-170 (1991), Eisenberg y col., Methods Enzymol. 277:396-404 (1997), Fischer y col., FASEB J. 10:126-136 (1996), Luthy y col., Nature 356:83-85 (1992)). Todos los modelos se evaluaron para la validación de la relación a plantillas de homología usando mediciones estándar (valores de e (Welch y col., Biochemistry 35:7165-7173 (1996), Welch y col., Biochemistry 33:6074-6085 (1994)). Finalmente, se visualizaron las propiedades físico-químicas de los modelos de Als mediante MOLCAD (Heiden y col., J. Comput. Chem. 14:246-250 (1993)), tal como se implementan en plataformas SYBYL y HINT (Kellog y col., J. Comput. Aided Mol. Des. 5:545-552 (1991)), de tal modo que se proyectaran las propiedades físicas en la superficie accesible a agua de los dominios N-terminales de Als.

Estos modelos indican que los dominios N-terminales de todas las proteínas Als contienen múltiples dominios de lámina β anti-paralelos, consecuentes con miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Los resultados se resumen más adelante en la Tabla III. Estas proteínas constan típicamente de dominios complejos de lámina β anti-paralelos de siete cadenas, a partir de los cuales se proyectan estructuras de bucle/hélice. Los dominios de lámina β están separados uno de otro por regiones interpuestas. Esta estructura se denomina a menudo motivo de perlas en una cuerda. Se indica particularmente que virtualmente todos los modelos de proteínas Als fueron homólogos de adhesina o invasina conocidos (Tabla III). Se observaron patrones de similitud entre las proteínas Als analizadas. Por ejemplo, todas las proteínas Als examinadas, excepto Als7p, compartían homología con proteínas de unión a colágeno de *Staphylococcus aureus*. No obstante, los homólogos específicos primarios, secundarios y terciarios varían para la mayor parte de los miembros de la familia (Tabla III). Por ejemplo, Als2p y Als9p comparten un homólogo idéntico primario, secundario y terciario.

Tabla III
Comparación de homólogos entre proteínas Als

Se identificaron homólogos de cada proteína Als mediante algoritmo basado en conocimientos y se clasificaron en orden descendente de correlación estructural de 1 a 3. NS, no se identificó ningún modelo significativo para el modelo de homología (coeficiente de correlación (r^2) \leq 70 %. PDB, código del banco de datos de proteínas por formato de National Center for Biotechnology Information.

Proteína	Homólogo 1	Homólogo 2	Homólogo 3
Als1p	Proteína de Yersinia pseudotuberculosis de unión a invasina/integrina (PDB 1cww) ^a	Proteína de <i>Staphylococcus aureus</i> de unión a colágeno (PDB 1d2p) ^a	Factor de aglutinamiento de <i>S. aureus</i> (PDB 1n67A) ^b
Als2p	Proteína de <i>S. aureus</i> de unión a colágeno (PDB 1d2p) ^a	Proteína de unión a invasina/integrina de <i>Y. pseudotuberculosis</i> (PDB 1cww) ["]	Proteína de capa superficial de <i>Methanosarcina mazei</i> (PDB 1 LOQA) ^c
Als3p	Proteína de <i>S. aureus</i> de unión a colágeno (PDB 1d2p) ^a	Proteína de unión a invasina/integrina de <i>Y. pseudotuberculosis</i> (PDB 1cww) ^b	Factor de aglutinamiento de <i>S. aureus</i> (PDB 1 n67A) ^c NS
Als4p	Proteína de <i>S. aureus</i> de unión a colágeno (PDB 1d2p) ^a	Proteína de unión a invasina/integrina de <i>Y. pseudotuberculosis</i> (PDB 1cww) ^b	

Als5p	Proteína de unión a invasina/integrina de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> (PDB 1cww) ^b	Proteína de capa superficial de <i>M. mazei</i> (PDB 1LOQA) ^b	Proteína de <i>S. aureus</i> de unión a colágeno (PDB 1d2p) ^c
Als6p	Proteína de <i>S. aureus</i> de unión a colágeno (PDB 1d2p) ^b	Proteína de unión a invasina/integrina de <i>Y. pseudotuberculosis</i> (PDB 1cww) ^b	Virus de gripe neuraminidasa de tipo B (PDB 1nsca) ^c
Als7p	Proteína de capa superficial de <i>M. mazei</i> (PDB 1LOQA) ^b	NS	NS
Als9p	Proteína de <i>S. aureus</i> de unión a colágeno (PDB 1d2p) ^a	Proteína de unión a invasina/integrina de <i>Y. pseudotuberculosis</i> (PDB 1cww) ^b	Proteína de capa superficial de <i>M. mazei</i> (PDB 1LOQA)

También se determinó que las proteínas Als contienen regiones hipervariables N-terminales que se asocian en estructuras bucle/hélice predichas. A este respecto, a pesar de las diferencias observadas en la adherencia específica de sustrato mediada por proteínas Als individuales, las regiones grandes de secuencias de los dominios N-terminales se conservan a la largo de esta familia. No obstante, se encontraron siete regiones de divergencia significativa entre regiones hipervariables (HVR) 1-7 diseñadas de proteínas Als. Estas regiones (compuestas por 8 o más aminoácidos) no contenían ninguna identidad de consenso aparente a lo largo de las proteínas Als y menos del 50 % de conservación de consenso. Por el contrario las regiones conservadas (CR) intervenidas 1-7, mostraron más del 30 % de identidad de consenso y más del 50 % de conservación de consenso a lo largo de las proteínas Als. Un gráfico de identidad y un alineamiento esquemático de estas secuencias de aminoácidos que comprenden los dominios N-terminales (residuos 1-420) de proteínas Als con funciones conocidas se presenta en la figura 11, A y B. En particular, el modelo de homología reveló que las HVR de proteínas Als diferentes, aunque distinguibles en secuencia, están predichas para conformar estructuras similares de bucle/hélice que se proyecta a partir de componentes de lámina β de las CR. Por lo tanto, la presencia de estas HVR conservadas indica que están disponibles para interactuar con constituyentes del huésped.

Además del modelo de homología y determinaciones relacionadas descritas anteriormente, las determinaciones empíricas confirman adicionalmente la estructura predicha del dominio N-terminal de Als1p. Para analizar las hipótesis generadas por nuestro modelo de homología, las características estructurales del dominio N-terminal de Als1p se determinaron usando el enfoque complementario de espectrometría CD y FTIR. Esta proteína, que comprende los aminoácidos 17-432 de Als1p, se produjo en *S. cerevisiae* y ha sido descrita previamente por Fu y col., Molecular Microbiology, 44:61-72 (2002).

Brevemente, se recogieron espectros de dicroísmo circular con un espectropolarímetro AVIV 62DS (Aviv Biomedical Inc.) equipado con un controlador de temperatura termoeléctrico. Se escanearon soluciones acuosas de Als1p (10 μ M en solución salina tamponada con fosfatos) usando células de cuarzo desmontables de haz de luz de 0,1 mm a una velocidad de 10 nm/min de 260 a 185 nm y un intervalo de muestra de 0,2 nm. Los espectros de péptidos carentes de tampón se sustrajeron de las soluciones de muestras para minimizar los artefactos de dispersión de luz, y los espectros finales fueron en promedio de 8 escaneos registrados 25 °C. El instrumento se calibró rutinariamente con ácido (+)-10-canforsulfónico (1 mg/ml en una células de longitud de haz de 1 mm) (Johnson y col., Proteins 7:205-214 (1990)), y la elipticidad se expresó como elipticidad de residuo media (1)MRE (grados-cm² dmol⁻¹). La concentración de proteínas se determinó mediante absorbancia a 280 nm sobre la base de la composición de aminoácidos aromáticos del dominio de Als1p expresado (Pace y col. Protein Sci 4:2411-2423 (1995)). Los espectros CD se desenredaron en hélice, lámina β , giro y estructuras desordenadas usando Selcon (Sreerama y col., Protein Sci. 8:370-380 (1999)) mediante la Dichroweb basada en Internet (Lobley y col., Bioinformatics 18:211-212 (2002)) interfaz (cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/home.html).

Los espectros de infrarrojos de autopelículas de Als1p se registraron a 25 °C en un espectrómetro Bruker Vector 22 FTIR (Bruker Optics) equipado con un detector de sulfato de triglicina deuterado a una ganancia de 4, haciéndose el promedio de 256 escaneos, y a una resolución de 2 cm⁻¹. Se extendieron 50 μ l de solución salina tamponada con fosfatos sobre la superficie de un cristal de muestra reflectante total atenuado de germanio de 50 x 20 x 2 mm (Pike Technologies) y se dejaron secar. La autopelícula de proteína seca se hidrató después con D₂O durante 1 h antes de registrar los espectros de infrarrojos. Las bandas de amida I de los espectros de infrarrojos se analizaron para determinar conformaciones secundarias mediante cálculo de áreas de picos de componentes con un programa informático de ajuste de curva (GRAMS/32, Versión 5; Galactic). Los límites de frecuencias para las diversas conformaciones fueron como sigue: hélice α (1662-1645 cm⁻¹), lámina β (1637-1613 y 1710-1682 cm⁻¹), bucles de giro β (1682-1662 cm⁻¹) y estructuras desordenadas (1645-1637 cm⁻¹) (50-52).

Los resultados de dicroísmo circular del dominio N-terminal de Als1p se muestran en la figura 12A y revelan un

mínimo de dicroísmo a 217 nm y un máximo de dicroísmo positivo fuerte a aproximadamente 200 nm. Estas características son características de una proteína que tiene un componente de lámina β antiparalelo. El desenredado de los espectros CD indicaron que la proteína asumió conformaciones del 50,1 % de lámina β , mientras que otras contribuciones de clase de estructura incluyen estructuras desordenadas (26,9 %), estructuras de giro (19,3 %) y hélice α (3,7 %).

Tal como se muestra en la figura 12B, las mediciones de FTIR de una autopelícula de Als1p hidratada corroboraron fuertemente que la muestra tiene una conformación de lámina β dominante. Estos espectros revelaron unas bandas de amida I de frecuencia baja fuertes con picos centrado a 1634 y 1628 cm^{-1} y una banda de frecuencia alta débil centrada a 1685 cm^{-1} . Esta separación de frecuencias de los espectros de infrarrojos de amida I de proteína en componentes de frecuencia alta y baja se ha demostrado que es típica del efecto de acoplamiento de dípolos de transición entre láminas β antiparalelas intermoleculares (Halverson y col., J. Am. Chem. Soc. 113:6701-6703 (1991)). La adaptación a las curvas de los espectros indicó que el constructo de proteína es ~57,2 % lámina β antiparalela. Otras conformaciones estructurales secundarias de ajuste de curva de los espectros IR incluyen estructuras desordenadas (20,5 %), componentes de giro (13,3 %) y hélice α (9,0 %).

Tomados en conjunto, los datos de FTIR y CD corroboran adicionalmente que los extremos N-terminales de Als1p contienen dominios predominantes de estructura de lámina β antiparalela que contienen componentes secundarios de hélice α y de giro, interpuestos por menos regiones estructuradas.

Los modelos tridimensionales indican además distinciones físico-químicas entre dominios N-terminales de Als. A este respecto, los modelos moleculares indican diferencias en atributos físico-químicos predichos de los dominios N-terminales de proteínas Als que influyen probablemente en sus interacciones con células huésped y varios sustratos. Tal como se muestra en la figura 13, las proteínas Als se pueden separar en tres grupos distintos sobre la base de distribuciones superficiales de hidrofobicidad, carga y potencial de enlace de hidrógeno. Als1p, Als3p y Als5p comparten cada uno patrones similares de estas propiedades y, de este modo, se consideran el grupo A de Als. Por el contrario, las propiedades físico-químicas de dominios N-terminales de Als6p y Als7p (grupo B de Als) tienen diferencias sorprendentes con los del grupo A de Als (Fig. 13). Mientras que el potencial catiónico en miembros del grupo A de Als se segrega típicamente a partir de sus facetas neutras o aniónicas, la carga positiva está distribuida ampliamente a lo largo de la totalidad de la superficie de los miembros del grupo B de Als Als6p y Als7p. Finalmente, los extremos N-terminales de Als2p, Als4p y Als9p parecen constituir un tercer grupo de proteínas Als (el grupo C de Als) que difieren estructuralmente de cualquiera de las proteínas de los grupos A y B. Las proteínas del grupo C de Als parecen ser más similares a las proteínas del grupo A de Als que a las del grupo B de Als en términos de hidrofobicidad o distribución electrostática.

Se han identificado varias proteínas con función adhesiva en *C. albicans*. Se ha demostrado que Hwp1p media la adherencia a células epiteliales bucales actuando como un sustrato para transglutaminasa de mamífero (5). Se identificó recientemente *EAP1* mediante expresión heteróloga en *S. cerevisiae* y media la adherencia a poliestireno y células epiteliales renales *in vitro* (7). De los ocho miembros de la familia de proteínas Als, sólo Als1p y Als5p se han estudiado desde una perspectiva funcional. Se ha demostrado que la expresión heteróloga de Als1p media la unión a células endoteliales y vasculares humanas y células epiteliales, un hallazgo que se ha confirmado en *C. albicans* mediante estudios de interrupción de genes (Fu y col., Mol. Microbiol. 44:61-72 (2002), Fu y col., Infect. Immune. 66:1783-1786 (1998)). La expresión heteróloga de *ALS5* en *S. cerevisiae* confiere adherencia a colágeno, fibronectina, albúmina de suero bovino y laminina (Gaur y col., Infect. Immune. 65:5289-5297 (1997), Gaur y col., Infect. Immun. 67:6040-6047 (1999), Gaur y col., Cell Commun. Adhes. 9:45-57 (2002)). No se ha realizado ninguna comparación a gran escala de las especificidades de sustrato de adhesinas de *C. albicans*. En este estudio comparamos las propiedades adhesivas de un grupo estructuralmente diverso de miembros de la familia de proteínas Als. Nuestros datos demuestran que las proteínas Als comprenden una familia diversa de proteínas de superficie con un espectro superpuesto de especificidades para la adherencia a una variedad de sustratos humanos (Fig. 8). Además, los resultados de los experimentos de intercambio de dominios indican que los dominios N-terminales de proteínas Als confieren la especificidad de sus perfiles de adherencia a sustratos.

Además de mediar la adherencia, nuestros datos sugieren que las proteínas Als también pueden funcionar como invasinas. De forma interesante, mientras que ambas *S. cerevisiae* que expresan Als1p y Als3p demostraron una adherencia a células endoteliales similar, la *S. cerevisiae* que expresa Als3p experimentó internalización a una tasa muy superior. Estos resultados indican que la endocitosis no es simplemente una extensión de la adherencia sin más bien un proceso distinto que puede estar influenciado por la interacción ligando-receptor. Esta claro que las diferencias en secuencias N-terminales en proteínas Als median estas funciones distintas, como es el caso de la adherencia.

Las propiedades físico-químicas de dominios de proteínas tal como se distribuyen en el espacio tridimensional son características estructurales cruciales que gobiernan las interacciones receptor-ligando (Eisenberg y col., J. Mol. Biol. 179:125-142 (1984), Waring y col., Protein Peptidew Lett. 3:177-184 (1996), Hancock y col., Lancet 349:418-422 (1997)). Las proteínas Als comparten características conformacionales que son características de otras adhesinas e invasinas de la superfamilia de inmunoglobulinas. No obstante, las proteínas Als individuales difirieron

en sus homólogos primarios, un hallazgo consecuente con los datos experimentales que indican que miembros de la familia Als muestran diferentes perfiles de unión a sustratos. En conjunto, estos patrones de homología Als indican que, mientras que miembros de las proteínas Als comparten una similitud general en estructura y plegamiento predicho, existen diferencias estructurales entre proteínas Als distintas que son responsables de sus diferencias de funcionamiento.

Los resultados descritos anteriormente con relación a las determinaciones estructurales de miembros de la familia Als corroboran el modelo de homología que indica que las regiones N-terminales de Als1p están compuestas predominantemente por dominios de lámina β antiparalelos que contiene estructuras de bucle/hélice con cantidades menores de regiones relativamente no estructuradas. Estas características son motivos indicativos de miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Estos resultados muestran una correlación predictiva significativa con estudios de dicroísmo circular de Als5p (Hoyer y col., *Yeast* 18:49-60 (2001)), que indica que el dominio N-terminal de Als5p está caracterizado por una predominancia relativa de regiones de lámina β antiparalela y bucle/hélice. Por lo tanto, es muy probable que todos los miembros de la familia de proteínas Als muestran esta estructura general. En particular, los resultados estructurales anteriores también son consecuentes con los modelos de homología que indican que muchas de las HVR corresponden a estructuras bucle/hélice flexibles que se proyectan desde dominios de lámina β en los extremos N-terminales de proteínas Als distintas. En conjunto, estos resultados indican que estas estructuras son integrales a la unión específica a sustrato de proteínas Als (fig. 14). En consecuencia con los resultados anteriores, las regiones análogas de lectina de unión a manosa, aglutinina α y otros miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas parece conferir especificidad de unión al sustrato (Zhao y col., *Hybrid Hybridomics* 21:25-36 (2002), Wojciechowicz y col., *Mol. Cell. Biol.* 13:2554-2563 (1993)). Además, las mutaciones de estas regiones bucle variables alteran significativamente la unión al sustrato en estas proteínas homólogas (Renz y col., *J. Cell Biol.* 125-1395-1406(1994), Viney y col., *J. Immunol.* 157:2488-2497 (1996)).

Los resultados de modelos tridimensionales indicaron adicionalmente que los dominios N-terminales de proteínas Als individuales poseen firmas moleculares distintivas que se relacionan con sus perfiles adhesivos. Estas firmas incorporan parámetros tales como área superficial, hidrofobicidad y carga electrostática, proporcionan configuraciones que distinguen relaciones estructurales entre proteínas Als. Por ejemplo, las proteínas Als que se unen a múltiples sustratos, tales como miembros del grupo A de Als (Als1p, Als3p y Als5p), tienen perfiles N-terminales predichos similares en términos de masa estérica, distribución de hidrofobicidad y potencial electrostático. Todavía, incluso dentro de este grupo, existen distinciones físico-químicas específicas que pueden gobernar diferencias funcionales dentro del grupo (fig. 13). Por el contrario, las proteínas Als con capacidad adhesiva reducida tienen características superficiales que se ha predicho que son distintas de las proteínas del grupo A de Als en múltiples propiedades físico-químicas, incluidas hidrofobicidad y potencial electrostático. Es muy probable que los efectos agregados de diferencias en estas características estructurales confieren las propiedades funcionales específicas de proteínas Als distintas.

La variabilidad genética extensiva se ha demostrado en la familia de genes ALS. Se ha observado la variación de secuencias de genes ALS de diferentes aislados de *C. albicans* (Zhang y col., *Genome Res.* 13:2005-2017 (2003), Hoyer y col., *Yeast* 18:49-60 (2001)), y no todos los miembros de la familia ALS están presentes en todos los aislados. Se ha encontrado incluso una divergencia de secuencias significativa entre dos alelos diferentes en un aislado único (Zhao y col., *Microbiology* 149:2947-2960 (2003), Zhang y col., *Genome Res.* 13:2005-2017 (2003)). Este grado de variabilidad genética sugeriría que estas proteínas pueden experimentar reordenamiento o mutación a una frecuencia relativamente alta. Dicho mecanismo proporcionaría el organismo con la capacidad de generar el alto grado de diversidad estructural y funcional demostrada en este estudio. El apoyo indirecto de esta hipótesis se proporciona mediante un estudio reciente de variación alélica de ALS7, lo que sugiere que este gen es hipermutable y que estas mutaciones son objeto de presión selectiva (Zhang y col., *Genome Res.* 13:2005-2017 (2003)).

En conjunto, los resultados anteriores indican una analogía entre anticuerpos y proteínas Als a nivel estructural y funcional. Por ejemplo, el modelo de homología suscribe las similitudes en configuraciones estructurales de estas familias, con hipervariabilidad dirigida a dominios localizados dentro de un marco de otro modo estable (por ejemplo, HVR de proteínas Als y regiones Fab de inmunoglobulinas). Además, como con anticuerpos, la variabilidad genética de la familia de genes ALS puede proporcionar la oportunidad para *Candida* de mostrar un conjunto diverso de proteínas con un espectro de especificidad en adherencia e invasión. La disponibilidad de dicho grupo de proteínas relacionadas es probable que mejore la capacidad del organismo para colonizar e invadir nichos anatómicos y fisiológicos diferentes durante la infección.

Ejemplo VII

La vacunación con rAls1p-N mejora la supervivencia durante la candidiasis diseminada murina potenciando la inmunidad no humoral mediada por células

Este ejemplo muestra que ratones BALB/c inmunizados con el extremo N-terminal recombinante de Als1p (rAls1p-N) mejoraron la supervivencia durante la exposición subsiguiente a un inóculo letal de *C. albicans*. La dosis protectora de 20 μ g de rAls1p-N aumentó significativamente la estimulación por *Candida* de esplenocitos Th1 y aumentó la

hipersensibilidad de tipo retardado *in vivo*. En contraste, las valoraciones de anticuerpos no se correlacionaron con la protección. Finalmente, la vacuna no era protectora en ratones deficientes en linfocitos T pero fue protectora en ratones deficientes en linfocitos B. Estos datos indican que el mecanismo de acción de la vacuna de rAls1p-N es la estimulación de inmunidad mediada por células, en vez de la humoral, contra *C. albicans*.

La *C. albicans* usada en el estudio fue SC5314, un aislado clínico bien caracterizado que es muy virulento en modelos animales (Spellberg y col., Infect Immun. 71:5756-5764 (2003)) fue suministrado por W. Fonzi (Universidad de Georgetown, Estados Unidos). El organismo se hizo pasar serialmente tres veces en caldo de levadura dextrosa peptona (Difco) antes de la infección.

Las cepas de ratones usadas en el estudio fueron ratones BALB/c hembra obtenidas del Instituto Nacional del Cáncer (Bethesda, MD) de Estados Unidos. Para explorar el efecto de la edad sobre la eficacia de la vacuna, se usaron ratones jóvenes (8-10 semanas) y ratones de cría ya retirados (≥ 6 meses). Los ratones deficientes en linfocitos B hembras que portaban una delección homocigótica en los loci igh (C.129B6-IgH-Jhdtm1 Dhu), ratones desnudos deficientes en linfocitos T (C.Cg/AnBomTac-Foxn1nuN20) y miembros de la misma camada BALB/c de tipo silvestre congénito se obtuvieron de Taconic Farms (Germantown, NY, Estados Unidos). Los ratones se alojaron en jaulas filtradas con comida irradiada y agua autoclavada a voluntad. Para los experimentos de supervivencia, los ratones se inmunizaron con dosis variadas de antígeno (véase más adelante) y subsiguientemente se infectaron a través de la vena de la cola con el inóculo apropiado de blastosporas SC5314 de *C. albicans* o control PBS (Irvine Scientific, Irvine, CA, Estados Unidos). Los resultados de estudios de supervivencia replicados se combinaron si los conjuntos de datos individuales no mostraron heterogeneidad estadística (véase más adelante). Todos los procedimientos que implicaron ratones fueron aprobados por el comité institucional de uso y de cuidados de los animales, siguiendo las directrices del Instituto Nacional de la Salud de EE.UU. para alojamiento y cuidado de animales.

Los procedimientos de inmunización con rAls1p-N que se describen más adelante se realizaron como sigue. Brevemente, se produjo rAls1p-N (aminoácidos 17 a 432 de Als1p) en *S. cerevisiae* y se purificó mediante filtración en gel y purificación de afinidad en matriz Ni-NTA (Fu y col., Molec. Microbiol. 44:61-72 (2002)). La cantidad de proteína se cuantificó mediante un ensayo de Lowry modificado. Se confirmó un alto grado de pureza (≈ 90 %) mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, así como dicroísmo circular y FTIR, tal como se ha descrito anteriormente. Los ratones se inmunizaron mediante inyección intraperitoneal (ip) de rAls1p-N mezclada con coadyuvante completo de Freund (CFA, Sigma-Aldrich) el día 0, recibieron un refuerzo con otra dosis del antígeno con coadyuvante incompleto de Freund (IFA, Sigma-Aldrich) el día 21, y se infectaron dos semanas después del refuerzo.

Las valoraciones de anticuerpos resultantes se determinaron mediante ELISA en placas de 96 pocillos. Brevemente, los pocillos se recubrieron con 100 μ l por pocillo de 5 μ g/ml de rAls1p-N en PBS. Se incubaron sueros de ratón durante 1 h a temperatura ambiente siguiendo una etapa de bloqueo con solución salina tamponada tris (TBS) (TrisHCl 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M) que contenía el 3 % de albúmina de suero de bovino. Lo pocillos se lavaron tres veces con TBS que contenía Tween 20 al 0,05 %, seguido por otros 3 lavados con TBS. Se añadió anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (Sigma) a una dilución final de 1:5000 y la placa se incubó adicionalmente durante 1 h a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron con TBS y se incubaron con sustrato que contenía tampón de citrato 0,1 M (pH 5,0), 50 mg/ml de o-fenilenodiamina (Sigma) y 10 μ l de H₂O₂ al 30 %. Se dejó desarrollar el color durante 30 min, después de lo cual la reacción se terminó añadiendo H₂SO₄ al 10 % y se determinó la densidad óptica (DO) a 490 nm en un lector de placas de microvaloración. Los pocillos de control negativo recibieron sólo diluyente y se sustrajo la absorbancia de fondo de los pocillos de ensayo para obtener las lecturas de DO finales. La valoración de ELISA se tomó como el recíproco de la última dilución de suero que dio una lectura de DO positiva (es decir, > DO media de las muestras de control negativo + 2 desviación típica).

Otros métodos que se describen más adelante se realizaron como sigue. Brevemente, se realizaron los perfiles de citocinas inducidos por *C. albicans* para determinar el efecto de la vacuna de rAls1p-N sobre la inmunidad mediada por células y los perfiles de citocinas *in vivo*. Los ratones se inmunizaron tal como se ha descrito anteriormente. Dos semanas después del refuerzo final, los esplenocitos se recogieron y se cultivaron en medios completos a una densidad de 4×10^6 células/ml tal como se ha descrito previamente (Spellberg y col., Infect. Immun. 71 :5756-5764 (2003)). Para estimular la producción de citocinas, los esplenocitos se cultivaron conjuntamente con tubos germinales de SC5314 de *C. albicans* destruidos térmicamente. Usamos *C. albicans* destruidos térmicamente en lugar de rAls1p-N para estimular los esplenocitos a imitar la situación *in vivo* durante la infección. Las células de *C. albicans* se pregerminaron en RPMI-1640 con glutamina (Gibco BRL) durante 90 minutos para inducir la expresión de Als1p (Fu y col., Molec. Microbiol. 44:61-72 (2002)). Los tubos germinales de *C. albicans* resultantes se destruyeron térmicamente mediante incubación durante 90 minutos a 60 °C (Ibrahim y col., Infect. Immun. 63:4368-74 (1995)). Los hongos destruidos térmicamente se añadieron a los cultivos de esplenocitos a una densidad de 2×10^7 pseudohifas/ml (relación de cinco hongos por un leucocito). Después de 48 h, los esplenocitos se perfilaron para frecuencias Th1 (CD4+IFN- +IL-4-), Th2 (CD4+IFN- -IL-4+) o CD4+IL-10+ mediante detección de citocinas intracelulares y citometría de flujo, tal como se ha descrito previamente (Spellberg y col., Infect. Immun. 71:5756-5764 (2003)). Se realizaron tres citometrías de flujo de color en un instrumento Becton-Dickinson FACScan calibrado

con perlas CaliBRITE (Becton Dickinson, San Jose, CA, Estados Unidos) usando el programa informático FACSCComp según las recomendaciones del fabricante. Durante la recogida de datos, se realizó un control de paso de linfocitos CD4+ mediante concatenación de dispersión hacia delante y dispersión lateral, y propiedades de fluorescencia de anticuerpo FITC-anti-CD4. Se recogieron datos para cada muestra hasta que se analizaron 10.000 linfocitos CD4+. Los resultados se presentan como la mediana \pm cuartiles 25° y 75° del porcentaje de todos los linfocitos sometidos al control de paso que eran células Th1 o Th2.

La inflamación de almohadillas plantares se determinó con el método de Oomura y col. (41). Brevemente, los ratones se inmunizaron con la dosis apropiada de rAls1p-N o CFA solo tal como se ha descrito anteriormente. Dos semanas después del refuerzo, los tamaños de línea base de almohadilla plantar de ratones inmunizados se midieron usando un calibre digital electrónico. Se inyectaron cincuenta μ g de rAls1p-N en 25 μ l de PBS en las almohadillas plantares derechas y se inyectó PBS solo en las almohadillas plantares izquierdas de los ratones inmunizados. Veinticuatro horas después las almohadillas plantares se midieron de nuevo. La inflamación de almohadillas plantares específica del antígeno se calculó como: (espesor de la almohadilla plantar derecha a 24 h – espesor de la almohadilla plantar derecha en la línea base) - (espesor de la almohadilla plantar izquierda a 24 h – espesor de la almohadilla plantar izquierda en la línea base).

Se usó el ensayo de rango logarítmico no paramétrico para determinar diferencias en los tiempos de supervivencia de los ratones. Las valoraciones de anticuerpos, frecuencias de linfocitos Th1 o Th2 e inflamación de almohadilla plantar se compararon mediante el ensayo de Steel para comparaciones múltiples no paramétricas (Rhyne y col., Biometrics 23:539-49 (1967) o la prueba U de Mann Whitney para comparaciones desapareadas, según fuera apropiado. Las correlaciones se calcularon con la prueba de suma de rangos de Spearman. Para determinar si existía heterogeneidad en estudios de supervivencia replicados, se usó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Valores de $P < 0,05$ se consideraron significativos.

Para determinar la dosis más eficaz del inmunógeno rAls1p-N, se evaluó un intervalo de dosis de 10^7 veces (20 μ g a 200 μ g por ratón). Los ratones BALB/c de cría ya retirados hembra se inmunizaron con rAls1p-N más coadyuvante (CFA/IFA) o coadyuvante solo. Se sangraron los ratones inmunizados 2 semanas después del refuerzo para determinar las valoraciones de anticuerpos anti-rAls1p-N (véase más adelante). Los ratones se infectaron subiguientemente con un inóculo letal de *C. albicans* (2×10^5 blastosporas). Los datos de supervivencia de experimentos repetidos se combinaron, ya que los experimentos individuales no demostraron heterogeneidad estadística ($p > 0,05$ mediante el ensayo de Kolmogorov-Smirnov). La dosis de 20 μ g de rAls1p-N dio como resultado una supervivencia a largo plazo del 25 % de los ratones infectados, y un aumento significativo en la supervivencia general en comparación con el coadyuvante solo ($p = 0,044$ mediante la prueba de rango logarítmico, figura 1). Ni la dosis 10 veces superior (figura 15) ni inferior (datos no mostrados) aumentaron significativamente la supervivencia en comparación con el coadyuvante solo. Estos resultados indican que una dosis intermedia de la vacuna de rAls1p-N induce protección contra la candidiasis diseminada murina.

Los hallazgos anteriores establecieron una dosis protectora para la vacuna de rAls1p-N. Después de la eficacia de la vacuna se evaluó en un modelo más rápidamente letal de ratones infectados con 10^6 blastosporas (mediana de supervivencia 3 frente a 11 días para 10^6 frente a 2×10^5 inóculos en ratones vacunados, respectivamente). De nuevo, los datos de estudios repetidos se combinaron, ya que los resultados de los experimentos individuales no demostraron heterogeneidad estadística ($p > 0,05$ mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov). Cuando se administró como una dosis de 20 μ g + CFA a ratones Balb/c infectados con 10^6 blastosporas de *C. albicans*, la vacuna de rAls1p-N fue más del doble de la mediana de supervivencia y dio como resultado un aumento significativo en la supervivencia general frente a los controles no vacunados ($p = 0,001$ mediante la prueba de rango logarítmico, figura 16A). Para determinar si la edad de los ratones influía en su respuesta a la vacuna de rAls1 p-N, la analizamos en ratones jóvenes. Se encontró un beneficio de supervivencia similar cuando los ratones jóvenes se vacunaron e infectaron con el mismo inóculo elevado ($p = 0,02$ mediante la prueba de rango logarítmico, fig. 16B).

Aunque la dosis de 200 μ g de rAls1p-N dio como resultado una protección inferior en comparación con la dosis de 20 μ g, sólo la dosis de 200 μ g de antígeno indujo un aumento significativo en suero de valoraciones de anticuerpos anti-Als1p ($p \leq 0,005$ para dosis de 200 μ g frente a todos los otros grupos, figura 17). No se detectó ningún aumento significativo en valoraciones de anticuerpos anti-Als 1 p en los dosis de antígeno de protección intermedia ($p = 0,1$ para 20 μ g frente a coadyuvante). Cuando se realizó una gráfica de las valoraciones de anticuerpos anti-Als1p en suero de ratones individuales frente al tiempo de supervivencia de cada ratón, no se halló ninguna correlación entre la valoración del anticuerpo y la supervivencia ($R^2 = 0,03$, $p > 0,05$ en la prueba de suma de rangos de Spearman). De hecho, los ratones inmunizados con la dosis más elevada de antígeno (200 μ g) tuvieron valoraciones de anticuerpos anti-rAls1p-N en exceso de 1: 100.000, pero no tuvieron duraciones de supervivencia diferentes de los ratones inmunizados con dosis más bajas de antígeno cuyas valoraciones se encontraron en el límite inferior de detección ($\sim 1:100$). Estos resultados indican que la protección inducida por la vacuna de rAls1p-N no parece correlacionarse con las valoraciones de anticuerpos.

Debido a que la inmunidad humoral no se correlaciona con la protección inducida por rAls1p-N, examinamos la respuesta mediada por células inducida por dosis protectoras y no protectoras de rAls1p-N. Los ratones se

5 inmunizaron con 0,2, 20 ó 200 µg de rAls1p-N o coadyuvante solo, como anteriormente. Dos semanas después del refuerzo, se recogieron esplenocitos y se cultivaron en presencia de *C. albicans* pregerminada destruida térmicamente que se sabe que expresa Als1p (Fu y col., Molec. Microbiol. 44:61-72 (2002)). Después de 48 h de cultivo, los esplenocitos se recogieron para la detección de citocinas intracelulares mediante citometría de flujo. Sólo los linfocitos de ratones inmunizados con la dosis protectora de 20 µg de antígeno desarrollaron una frecuencia significativamente aumentada de células Th1 en comparación con los ratones a los que se había administrados coadyuvante solo ($p = 0,03$, fig. 18). No se detectaron diferencias significativas en la frecuencia de Th2 (fig. 18) o en la frecuencia de linfocitos IL-10⁺ T (datos no mostrados) entre ratones inmunizados con coadyuvante o cualquiera de las dosis de antígeno.

10 Para confirmar que la inmunidad de tipo I se estimulaba mediante r-Als1p-N *in vivo*, se analizó la hipersensibilidad de tipo retardado mediante la inflamación de las almohadillas plantares. Sólo los ratones vacunados con la dosis protectora de 20 µg de rAls1p-N desarrollaron una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado aumentada significativamente en comparación con el control, y esta respuesta también fue significativamente superior a la inducida por las dosis no protectoras de 0,2 y 200 µg (Fig. 19, $p < 0,05$ para todas las comparación frente a la dosis de 20 µg, mediante la prueba de Steel no paramétrica). En conjunto estos resultados indican que una dosis protectora del antígeno rAls1p-N indujo una polarización de Th1 significativa y una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado.

20 Para definir el papel de anticuerpos y de linfocitos T en la protección mediada por vacuna, ratones deficientes en linfocitos B, desnudos deficientes en linfocitos T o de control de tipo silvestre BALB/c congénitos se inmunizaron con 20 µg de rAls1p-N más coadyuvante o coadyuvante solo, y se infectaron con un inóculo letal (8×10^5 blastosporas) de *C. albicans*. Los ratones deficientes en linfocitos B tendieron a ser más resistentes a la infección, mientras que los ratones deficientes en linfocitos T fueron más susceptibles que los ratones control de tipo silvestre que habían recibido coadyuvante solo ($p = 0,065$ y $0,01$ para ratones deficientes en linfocitos B y deficientes en linfocitos T frente a ratones tratados con coadyuvante de tipo silvestre, respectivamente, fig. 20). Finalmente, la vacuna de rAls1p-N mantuvo su eficacia en ratones deficientes en linfocitos B ($p = 0,04$ para vacunados con rAls1p-N frente a coadyuvante solo, fig. 6) pero fue ineficaz en ratones deficientes en linfocitos T ($p = 0,4$ para vacunados con rAls1p-N frente a coadyuvante solo, fig. 20). Estos resultados indican que la vacuna de Als1p es eficaz en ratones deficientes en linfocitos B pero no ratones desnudos deficientes en linfocitos T.

30 Lo descrito anteriormente son los resultados que muestran que la inmunización con el extremo N-terminal de esta proteína mejoró la supervivencia de ratones BALB/c tanto jóvenes como maduros durante la candidiasis diseminada hematógicamente. En particular, una dosis intermedia de rAls1p-N (20 µg) proporcionó una protección superior en comparación tanto con dosis inferiores como con una dosis superior (200 µg). De todas las maneras, la dosis no protectora de 200 µg de rAls1p-N fue inmunógena, ya que indujo valoraciones de anticuerpos 100 veces superiores a las inducidas por la dosis de 20 µg.

40 La curva de eficacia de respuesta a la dosis con forma de U invertida, con protección baja en la dosis de rAls1 p-N más alta, es una reminiscencia de los estudios clásicos de Parish y col., que describieron primero la relación inversa entre la inducción de inmunidad humoral y mediada por células mediante una dosis dada de antígeno. En el contexto de datos seminales de Parish, una curva de eficacia de respuesta a la dosis con forma de U invertida podría explicarse si: 1) la eficacia de la vacuna dependía de la inmunidad mediada por células y, 2) las dosis intermedias de rAls1p-N estimularon una inmunidad mediada por células superior en comparación con la dosis estimulante de anticuerpos elevada. Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que la curva de eficacia de respuesta a la dosis con forma de U invertida observada con la vacuna de rAls1p-N fue debida a la inducción superior de la inmunidad mediada por células mediante la dosis intermedia protectora de antígeno.

50 Para analizar esta hipótesis, se determinó la capacidad de dosis altas, intermedias y bajas de antígeno para estimular células Th1 y la hipersensibilidad de tipo retardado. Para estimular la producción de citocinas a partir de esplenocitos, activamos específicamente las células mediante exposición a *C. albicans* destruidas térmicamente, en vez de rAls1p-N, para imitar la situación *in vivo* durante la infección. Sólo la dosis de 20 µg protectora aumentó significativamente la frecuencia de linfocitos Th1 esplénicos estimulados por *C. albicans*. La frecuencia de células Th1 observada en esplenocitos estimulados por *C. albicans ex vivo* fue similar a la detectada *in vivo* durante la candidiasis diseminada en ratones (59), subrayando la relevancia de este enfoque.

60 Para determinar si las células Th1 detectadas *ex vivo* tuvieron una significancia funcional *in vivo*, comparamos la hipersensibilidad de tipo retardado inducida por diferentes dosis de inmunización de rAls1 p-N. En concordancia con la frecuencia de células Th1, sólo la dosis protectora de 20 µg de rAls1p-N estimuló una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado *in vivo* significativa. Estos resultados son consecuentes con la hipótesis de que la protección inducida por vacuna fue debido a la inducción de inmunidad mediada por células de tipo 1'. Sorprendentemente, a pesar de la inducción de valoraciones de anticuerpos marcadamente elevadas por la dosis de 200 µg de rAls1p-N, no encontramos un aumento en linfocitos Th2 esplénicos en ratones vacunados con esta dosis. Una posible explicación es que las células Th2 se activaron en ganglios linfáticos periféricos en vez de en el bazo. Alternativamente, otras poblaciones de linfocitos T (por ejemplo, células NKT) pueden haber sido responsables de la

inducción de valoración de anticuerpos altas observadas en la respuesta de la dosis de 200 µg de rAls1p-N.

La falta de correlación entre la valoración de anticuerpo y la protección no excluyó completamente un papel de los anticuerpos en la mediación de la protección inducida por vacuna. Por ejemplo, las valoraciones con ELISA son el resultado de la enumeración de anticuerpos con una variedad de especificidades y afinidades. Por lo tanto, la posibilidad de que se generaran pequeños subconjuntos de anticuerpos que participaran en la protección mediada por vacuna no podría excluirse midiendo las valoraciones de anticuerpos. Para confirmar el papel de inmunidad mediada por células y no humoral en la protección mediada por vacuna de rAls1p-N, analizamos la eficacia de la vacuna en ratones deficientes en linfocitos B y deficientes en linfocitos T. Los ratones deficientes en linfocitos B tendieron a ser más resistentes a candidiasis diseminada que los controles de tipo silvestre y la eficacia de la vacuna no se anuló en ratones deficientes en linfocitos B. Por el contrario, los ratones deficientes en linfocitos T fueron más susceptibles a la candidiasis diseminada que los controles de tipo silvestre y la eficacia de la vacuna se perdió en ratones deficientes en linfocitos T. Por lo tanto, nuestros hallazgos confirmaron que la eficacia de la vacuna de rAls1p-N depende de la inducción de la inmunidad mediada por linfocitos T y no principalmente humoral. Además, debido a que los ratones deficientes en linfocitos B no son más susceptibles a candidiasis diseminada que los compañeros de camada de tipo silvestre congénitos, el anticuerpo no es un efector dominante frente a candidiasis diseminada en este modelo.

En suma, informamos que la vacuna de rAls1p-N nueva media la protección contra candidiasis diseminada experimental induciendo una inmunidad mediada por células en vez de humoral. La potenciación del efecto protector modesto de la vacuna de rAls1p-N, por lo tanto, puede estar acompañado con la obtención adicional de inmunidad mediada por celular usando coadyuvantes optimizados y/o citocinas, o una vía alternativa de inmunización. De hecho, en nuestros estudios publicados hemos encontrado ya un aumento marcado en la eficacia administrando rAls1p-N subcutáneamente en comparación con la administración intraperitoneal.

Ejemplo VIII

La vacuna de rAls1p-N anti-*Candida albicans* reduce la carga fúngica y mejora la supervivencia en ratones tanto inmunocompetentes como inmunocomprometidos

Este ejemplo describe la mejora de la eficacia de la vacuna de rAls1p-N descrita en el ejemplo VII cuando se administra por una vía subcutánea (SQ) en ratones tanto inmunocompetentes como inmunocomprometidos. Inicialmente, la eficacia de la vacuna de rAls1p-N en ratones inmunocompetentes. El rAls1p-N, que abarca los aminoácidos 19-433 de la proteína de longitud completa, se produjo en *S. cerevisiae* y se purificó tal como se ha descrito anteriormente. La preparación del control se purificó de forma similar a partir de *S. cerevisiae* transformada con un plásmido vacío. Se inmunizaron ratones BALB/c de cría ya retirados (25-30 g) mediante inyección SQ de rAls1p-N (20 µg) o preparación de control mezclada con coadyuvante completo de Freund (CFA) el día 0, seguido por una dosis de refuerzo de coadyuvante incompleto de Freund (IFA) el día 21. Dos semanas después del refuerzo se confirmó la inmunogenicidad de la vacuna evaluando la intensidad de la reacción de inflamación de las almohadillas plantares como marcador de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH), tal como se ha descrito previamente. Los ratones vacunados tenían aumentos marcados en DTH específico de rAls1p-N (Fig. 21).

Se determinó la eficacia de la vacuna de rAls1p-N para determinar el efecto de la vacunación de rAls1p-N sobre la supervivencia en ratones BALB/c infectados (Fig. 22A). Los ratones vacunados o control se infectaron a través de la vena de la cola con inóculos rápidamente letales ($2,5-5 \times 10^5$ blastosporas) de *C. albicans*. Hemos mostrado previamente que ratones infectados con dichos inóculos mueren de choque séptico muy intenso (Spellberg y col., J. Infect. Dis. En prensa (2005)). La vacunación prolongó marcadamente el tiempo hasta la muerte ($p < 0,05$ para ambos inóculos mediante el ensayo de rango logarítmico) y mejoró la supervivencia en 30 días (50-57 % frente al 0 %, $p < 0,05$ para ambos inóculos mediante la prueba exacta de Fisher).

Después se determinó el efecto de la vacunación sobre la carga fúngica en tejidos durante la candidiasis diseminada hematógicamente. Catorce días después del refuerzo, los ratones BALB/c vacunados y control se infectaron a través de la vena de la cola con 5×10^5 blastosporas de SC5314 de *C. albicans*. Seis días después de la infección, antes de la aparición de las primeras muertes en la rama de control, se recogieron riñones, se homogeneizaron y se cultivaron cuantitativamente en agar de dextrosa de Sabouraud (Difco) (18). La vacunación SQ con rAls1p-N dio como resultado una disminución de la mediana 1,5 log CFU/g en la carga fúngica del riñón en comparación con el control ($p = 0,01$ mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon, Fig. 22B).

La eficacia de la vacuna de rAls1p-N también se evaluó en ratones inmunocomprometidos. Habiendo demostrado la eficacia en ratones inmunocompetentes, también se evaluó el potencial de la vacuna de rAls1p-N para inducir inmunidad en ratones neutropénicos y protegerlos de la candidiasis diseminada. Los ratones BALB/c vacunados se hicieron neutropénicos mediante la administración de ciclofosfamida (200 mg/kg ip el día -2 y 100 mg/kg ip el día +9 con relación a la infección, dando como resultado en aproximadamente 12 días neutropenia, tal como se ha descrito (Sheppard y col., Antimicrob. Agents. Chemother. 48:1908-11 (2004)). La reacción de inflamación de las almohadillas plantares se realizó 2 días después de la primera dosis de ciclofosfamida. Los ratones neutropénicos vacunados desarrollaron reacciones DTH de magnitud similar a ratones inmunocompetentes (Fig. 23A frente a 1,

experimentos realizados en paralelo). En ratones neutropénicos infectados a través de la vena de la cola con $2,5 \times 10^4$ blastosporas de *C. albicans*, la vacunación también dio como resultados aumentos significativos del tiempo hasta la muerte ($p = 0,007$ mediante ensayo de rango logarítmico frente a control), la mediana del tiempo de supervivencia (> 21 frente a 12 d, $p = 0,008$ mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon) y la supervivencia general (el 88 % frente al 38%, $p = 0,005$ mediante la prueba exacta de Fischer) (Fig. 23B).

Para determinar la eficacia de la vacunación de rAls1p-N en la infección mucosal, la vacuna se analizó en un modelo de candidiasis orofaríngea murino (OPC) (Kamai y col., *Infect. Immun.* 70:5256-8 (2002) y Kamai y col., *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:3195-97 (2001)). Los ratones vacunados se trataron con acetato de cortisona (225 mg/kg SQ los días -1, 1 y 3 con respecto a la infección) y se infectaron sublingualmente tal como se ha descrito. Las lenguas se escindieron el día 5 después de la infección. Debido a que las unidades formadoras de colonias de lenguas homogeneizadas no pueden distinguir entre infección invasiva y colonización adherente a la superficie, evaluamos la extensión de la invasión por histopatología. Un observador no enterado (BJS) registró cada sección mediante escaneo a lo largo de toda la longitud de las lenguas y cuantificó la gravedad de las lesiones fúngicas por 40x campo de potencia alta (0 = ninguna lesión, 1⁺ = inflamación mucosal leve, 2⁺ = inflamación significativa restringida al epitelio, 3⁺ = inflamación extendida a lo largo de toda la capa epitelial, 4⁺ = inflamación extendida en el subepitelio). Para evitar el sesgo de muestras, se registraron dos secciones de cada lengua separadas mediante al menos una sección de tejido intervenida. Todos los ratones control desarrollaron invasión fúngica marcada de sus lenguas en numerosas ubicaciones, mientras que sólo dos ratones vacunados desarrollaron alguna lesión en la lengua. En total, el valor de la mediana (75^a 25^a cuartiles) de lesiones por lengua de ratones control fue 6,5 (8, 5,75) en comparación con 1 (2,5, 0) para ratones vacunados ($p = 0,03$ mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon). La evaluación semicuantitativa de la gravedad de la infección demostró una reducción significativa en ratones vacunados en comparación con los controles (Fig. 24, $p = 0,03$ mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon).

Para determinar la eficacia de la vacunación con rAls1p-N o rAls3p-N en la infección mucosal, se analizaron estas dos vacunas en un modelo murino de colonización vaginal (Clemons y col., *Infect. Immun.* 72: 4878-80 (2004); Fidel. *Int Rev Immunol.* 21: 515-48 (2002) y Wozniak y col., *Infect Immun.* 70: 5790-9 (2002)). Los ratones vacunados se trataron con estrógeno (30 μ g, administración SQ) el día -3 con relación a la infección y después se administraron en la vagina 10 μ l de solución salina tamponada con fosfatos que contenía 10^6 blastosporas de *C. albicans*. Las vaginas se escindieron el día 3 después de la inoculación, se homogeneizaron y se plaquearon diluciones seriadas en placas YPD. Las unidades formadoras de colonias (UFC) se enumeraron 24-48 h después de la incubación de placas a 30-35 °C. Las vaginas recogidas de ratones vacunados con rAls3p-N, pero no las recogidas de ratones vacunados con rAls1p-N, tenían un nivel de UFC inferior a las vaginas recogidas de los ratones control (es decir, ratones vacunados con CFA solo) (Fig 25, $p=0,01$ mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon).

A la luz de la incidencia creciente de candidemia y su alta tasa de mortalidad continua, el desarrollo de una vacuna contra *Candida spp.* es de gran importancia. Los resultados descritos anteriormente muestran que la vacunación SQ con rAls1p-N dio como resultado una mejora marcada en la supervivencia y reducciones significativas de la carga fúngica durante la candidiasis diseminada hematógicamente de otro modo rápidamente fatal en ratones tanto inmunocompetentes como inmunocomprometidos. Son de interés los resultados de la carga fúngica en riñón de ratones vacunados individualmente, demostrando que aproximadamente la mitad de los ratones tenían cargas fúngicas en el riñón inferiores a 5 log UFC/g. Hemos hallado previamente que el umbral de carga fúngica en el riñón indicativo de una infección fatal es 5 log UFC/g; los ratones con cargas fúngicas en el riñón superiores a este nivel mueren típicamente de la infección, mientras que los ratones con cargas fúngicas inferiores al mismo sobreviven a la infección (Spellberg y col., *J. Infect. Dis.* En prensa (2005) y (Spellberg y col., *Infect. Immun.* 71:5756-5764 (2003)). Por lo tanto, las muertes descubiertas en el grupo vacunado reflejan probablemente una carga fúngica alta a pesar de la vacunación. Las variaciones de ratón a ratón en la carga fúngica en tejidos pueden reflejar las complejidades de las interacciones huésped-patógeno y/o respuestas variables a la vacuna.

En resumen, la vacuna de rAls1p-N puede usarse para el tratamiento, la reducción de la gravedad y/o prevención de candidiasis diseminada cada vez más frecuente y altamente letal. La vacuna es eficaz en ratones inmunocompetentes y se mantiene su eficacia incluso en huéspedes neutropénicos y tratados con corticoesteroides. Finalmente, la vacuna puede proteger contra candidiasis mucocutánea incluidas candidiasis vaginal y orofaríngea.

55 Ejemplo IX

Eficacia de las vacunas de ALS contra infecciones por *S. aureus*

Este ejemplo muestra que las proteínas Als de *C. albicans* mejoran la supervivencia de modelos animales infectados con *S. aureus*.

Se identificaron adhesinas Als de *C. albicans* que eran significativamente homólogas a adhesinas de *S. aureus*. Esta característica se usó para diseñar y se preparó una vacuna eficaz contra *S. aureus* usando adhesinas Als. Brevemente, la familia ALS de *C. albicans* está comprendida por al menos 9 genes (Hoyer y col., *Genetics* 157:1555-67 (2001); Hoyer LL., *Trends Microbiol.* 9:176-80 (2001)). Tal como se ha descrito previamente, las proteínas Als funcionan como adhesinas para sustratos biológicamente relevantes (Fu y col., *Molec. Microbiol.* 44:61-72 (2002);

Gaur y Klotz, Infect. Immun. 65:5289-94 (1997); Zhao y col., Microbiology 150:2415-28 (2004); Oh y col., Microbiology 151:673-81 (2005); Zhao y col. Microbiology 151:1619-30 (2005); Hoyer y col., Mol. Microbiol. 15:39-54 (1995)). En particular, los extremos N-terminales de Als1p y Als3p son significativamente homólogos a proteínas de superficie expresadas por *S. aureus* patógena, incluidas proteína de unión a colágeno y factor de aglutinamiento (Tabla IV; Sheppard y col. J. Biol. Chem. 279:30480-89 (2004)).

Tabla IV. Homología de proteínas Als con adhesinas e invasinas patógenas		
Proteína	Homólogo 1	Homólogo 2
Als1p	Proteína de unión a colágeno de <i>S. aureus</i> : ≥ 95 % de homología	Factor de aglutinamiento de <i>S. aureus</i> : ≥ 90 % de homología
Als3p	Proteína de unión a colágeno de <i>S. aureus</i> : ≥ 95 % de homología	Factor de aglutinamiento de <i>S. aureus</i> : ≥ 80 % de homología
Als5p	Proteína de unión a invasina/integrina de <i>Y. pseudotuberculosis</i>	Proteína de capa de superficie en <i>M. mazei</i>

El cálculo de homología proporcionado anteriormente en la tabla IV tiene en cuenta características tanto de alineamiento de secuencia como de estructura superficial tridimensional. Se calculó que la homología de Als1p era superior al 95 % o al 90 % en comparación con la proteína de unión a colágeno o el factor de aglutinamiento de *S. aureus* ($r^2 \geq 90$ %; Sheppard y col., referencia anterior). De forma similar, se calculó que la homología de Als3p era superior al 95 % o al 80 % en comparación con la proteína de unión a colágeno o el factor de aglutinamiento de *S. aureus* ($r^2 \geq 90$ %).

Para corroborar los hallazgos anteriores, se usaron la homología y métodos de insertado para un modelo de congruencia estructura-función entre Als1p y el factor de aglutinamiento A de *S. aureus* (ClfA - PDB código: c1 n67A). Estos métodos evaluaron homologías específicas en estructura primaria, conformación 3-D y se realizaron análisis de patrones para buscar motivos funcionales análogos. Por ejemplo, se usaron los métodos BLASTP, PROSITE y JALVIEW para analizar similitudes y diferencias en secuencias primarias de ALS frente a ClfA (Yount y col. Antimicrob. Agents Chemother. 48:4395-4404 (2004) y Yount y Yeaman. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:7363-7368 (2004)). Se usaron después aplicaciones basadas en Internet incluida PSSM 3-D para priorizar homólogos de ALS potenciales para análisis posteriores (Sheppard y col. J. Biol. Chem. 279:30480-30489 (2004)). Junto con los datos resultantes, se usó la aplicación PHYRE (Kelley, L., R. Bennett-Lovsey, A. Herbert y K. Fleming; sitio de Internet siguiente: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/>) para realizar el cartografiado topológico y para identificar motivos tridimensionales compartidos por proteínas con la mayor homología estructural y funcional con proteínas ALS seleccionadas para fines de identificación de motivos funcionales compartidos putativamente. Los métodos anteriores están ampliamente disponibles al dominio público y se usan en una diversidad de aplicaciones de biología proteómica y estructural. Sobre la base de los resultados del método de homología e insertado anterior, se generó un consenso de homología de sitios funcionales entre Als1p y ClfA y se cartografió para residuos específicos del modelo de Als1p construido sobre ClfA. Diversos hallazgos particulares derivados de estos análisis de modelo se establecen más adelante.

Primeramente, se identificó homología significativa entre las regiones N-terminales de Als1p y ClfA en la estructura secundaria y la conservación de aminoácidos, en particular en la región abarcada por los aminoácidos 30 - 300 (es decir, los extremos N-terminales de ambas proteínas).

En segundo lugar, el cartografiado de consenso de sitios funcionales homólogos basado en determinantes de adhesina ClfA establecidos convergió en un motivo topológico específico de Als1p. Este motivo topológico se muestra en la figura 26 como una hendidura formada por la inflexión de aspectos adyacentes de dos dominios de lámina β .

En tercer lugar, en consecuencia con la homología de estructura primaria, el motivo de hendidura funcional predicho en Als1p se asocia a residuos específicos que se originan a partir de regiones hipervariables en la región N-terminal que abarca los restos de aminoácidos 30 - 300.

Estos resultados proporcionan una base estructural para funciones biológicas congruentes, así como respuestas inmunológicas a Als1p y ClfA. Además, estos resultados también corroboran nuestro modelo general de actividad estructural de Als1p y además facilitan enfoques dirigidos a análisis mutacionales y cartografiado de epítopes. Finalmente, estos resultados indican que Als1p y ClfA son adhesinas de estructura análoga y presentan funciones sobre diversos patógenos microbianos.

También se identificó un anticuerpo monoclonal contra *S. aureus* que puede reducir infecciones provocadas por *C. albicans*. Como con los hallazgos estructurales anteriores, esta característica también se usó para diseñar e preparar una vacuna eficaz contra *S. aureus* usando adhesinas Als.

Brevemente, un anticuerpo monoclonal anti-estafilococos humanizado (Aurexis®) que se sabe que reconoce adhesinas de superficie en *S. aureus* está siendo sometiendo actualmente a ensayos clínicos. Este anticuerpo

monoclonal también reacciona de forma cruzada con miembros de la familia Als. Se ha informado de resultados favorables de un ensayo clínico de fase II de Aurexis[®] para el tratamiento de infecciones del torrente sanguíneo por *staphylococcus* (Inhibitex Inc., 2045; 19 de septiembre de 2005, accesible en <http://phx.corporate-ir.net/phoenix.zhtml?c=176944&p=irol-newsArticle&ID=707322&highlight=>). Brevemente, en este informe, a 5 pacientes que se sabía que tenían *S. aureus* en sangre se administró anticuerpo Aurexis[®] como tratamiento para la infección activa (es decir, éste no es una estrategia de vacuna activa ni un estudio profiláctico). Nueve pacientes que recibieron placebo experimentaron infecciones en el torrente sanguíneo descubiertas provocadas por *Candida*, mientras que sólo tres pacientes de la rama de Aurexis[®] experimentaron infecciones en el torrente sanguíneo por *Candida*. El reconocimiento de la disminución de la infección de sangre por *Candida* para los pacientes tratados con 10 un anticuerpo de *S. aureus* en combinación con los hallazgos de homología y estructurales anteriores indican que los epítopes inmunógenos están compartidos entre *Candida* y *S. aureus* y que los epítopes inmunógenos pueden actuar como dianas para lograr un beneficio terapéutico usando respuestas inmunitarias, anticuerpos o mecanismos efectores preparados contra una especie para el tratamiento de las otras especies. Por lo tanto, los datos anteriores proporcionan conjuntamente respuestas inmunitarias a adhesinas de superficie en *S. aureus* para reaccionar de 15 forma cruzada con *Candida spp.*

Siguiendo la estrategia anterior, se diseñaron ejemplos de vacunas de adhesina Als y se demostró que mejoran la supervivencia de ratones infectados con *S. aureus*. Los ejemplos de adhesinas Als usados para vacunar fueron rAls1p-N o rAls3p-N, que se produjeron y se usaron tal como se ha descrito anteriormente. Brevemente, para 20 determinar si estas vacunas de Als contra *Candida*, rAls1p-N y rAls3p-N, pueden mediar la protección de especies cruzadas contra *S. aureus*, se vacunaron ratones Balb/c hembra con el régimen descrito previamente (coadyuvante completo de Freund + 20 µg de rAls1p-N o rAls3p-N el día 0, seguido por una dosis de refuerzo en coadyuvante incompleto de Freund a las 3 semanas, administradas ambas subcutáneamente). Dos semanas después de la vacunación, los ratones se infectaron a través de la vena de la cola con una dosis letal de la cepa 67-0 de *S. aureus*, 25 que es resistente a meticilina y conocida por ser virulenta en modelos animales. Los resultados que muestran supervivencia de ratones se muestran en la figura 26. Tal como se ha indicado, las vacunas de rAls1p-N y de rAls3p-N mediaron una supervivencia a largo plazo mejorada en estos ratones infectados (figura 27). Adicionalmente, el mecanismo de protección sea probablemente una potenciación de Th1 más que de Th2, ya que no se observó 30 correlación entre valoraciones de anticuerpos y supervivencia de ratones vacunados con bien rAls1p-N o bien rAls3p-N (figura 28).

Ejemplo X

La vacuna de rAls1 p-N anti-*Candida* media un intervalo amplio de protección contra candidiasis diseminada

Este ejemplo muestra que la vacuna de rAls1-N protege ratones no consanguíneos de candidiasis diseminada y protege ratones Balb/c contra otras cepas virulentas de *C. albicans* y *Candida no-albicans*. 35

Los estudios actuales se realizaron para ilustrar la amplitud de la protección inducida por rAls1p-N evaluando específicamente su eficacia en ratones no consanguíneos, en combinación con un segundo coadyuvante distinto del coadyuvante de Freund, contra otras cepas de *C. albicans* y contra especies de *Candida no-albicans*. 40

La vacunación con rAls1p-N protegió ratones no consanguíneos de candidiasis diseminada. Brevemente, los ratones CDI no consanguíneos se obtuvieron del Instituto Nacional del Cáncer (Bethesda, MD, Estados Unidos). Todos los procedimientos que implicaron ratones fueron aprobados por comité institucional de uso y de cuidados de los animales, siguiendo las directrices del Instituto Nacional de la Salud de EE.UU. para alojamiento y cuidado de animales. Los ratones se vacunaron con rAls1p-N + coadyuvante de Freund tal como se ha descrito previamente anteriormente y en, por ejemplo, Ibrahim y col., Infect. Immun. 73:999-1005 (2005); Spellberg y col., Infect. Immun. 73:6191-93 (2005). El rAls1p-N (aminoácidos 17 a 432 de Als1p) se produjo en *S. cerevisiae* y se purificó mediante filtración en gel y purificación por afinidad en matriz de Ni-NTA. Se confirmó un alto grado de pureza (~90 %) mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, así como mediante difracción circular y FTIR, tal como se ha descrito anteriormente y en, por ejemplo, Sheppard y col., J Biol Chem 279:30480-89 (2004). Los ratones se inmunizaron mediante inyección SQ de rAls1p-N (20 µg) mezclado con coadyuvante completo de Freund (CFA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) el día 0, seguido por una dosis de refuerzo en coadyuvante incompleto de Freund (IFA; Sigma-Aldrich) el día 21. Los ratones control se inmunizaron con CFA/IFA solo. Catorce días después del refuerzo, los ratones inmunizados se infectaron a través de la vena de la cola con SC5314 de *C. albicans*, tal como hemos descrito previamente, Ibrahim y col., (2005) referencia anterior; y Spellberg y col. (2005), referencia anterior. De forma similar a nuestros hallazgos previos en ratones Balb/c, la vacuna de rAls1p-N mejoró 50 marcadamente el supervivencia de ratones CD1 infectados (figura 29A).

Debido a que se considera que el coadyuvante de Freund es demasiado tóxico para su uso en seres humanos, realizamos una respuesta a la dosis de la vacuna de rAls1p-N en alumbre (Alhydrogel al 2 %, Brenntag Biosector, Frederikssund, Dinamarca), el único coadyuvante de vacuna aprobado actualmente por Administración de fármacos y alimentos de Estados Unidos (FDA) para su uso en seres humanos. La vacunación con alumbre se realizó con una agente idéntica al coadyuvante de Freund, con inmunización el día 1, refuerzo el día 21 e infección dos semanas después. Encontramos que dosis más elevadas de rAls1p-N combinadas con alumbre dieron como resultado 65

mejoras significativas en la supervivencia de ratones con candidiasis diseminada (figura 29B). También parece que hay una relación de respuesta a la dosis que tiende a mejorar la supervivencia a dosis altas de rAls1p-N cuando se combina con alumbre.

5 También se demostró que la vacuna de rAls1p-N mejora la supervivencia de ratones Balb/c infectados con varias cepas de *C. albicans*. Las vacunas particularmente útiles usa un inmunógeno que puede suministrarse al sistema inmunitario para reconocer múltiples cepas del patógeno diana. Por medio del análisis de secuencias de ADN, encontramos que la secuencia de aminoácidos predicha de la región N-terminal de Als1p estaba conservada en un 99,9 % entre un grupo diverso de aislados clínicos de *C. albicans* de infecciones del torrente sanguíneo (5 cepas), la orina (5 cepas) y orofaríngea (10 cepas) (datos no mostrados). Estos resultados indican que la vacuna de rAls1p-N puede ser eficaz contra una amplia serie de cepas de *C. albicans*. Para confirmar la amplitud de la protección de la vacuna de rAls1p-N contra cepas de *C. albicans*, los ratones se vacunaron con rAls1p-N + coadyuvante de Freund como anteriormente, y se infectaron con uno de los diversos aislados clínicos de *C. albicans* (Ibrahim y col., Infect Immun 63:1993-98 (1995)). Tal como se muestra en la figura 30, la vacuna de rAls1p-N mejoró significativamente la supervivencia de ratones infectados con cada una de estas cepas.

También se demostró que la vacuna de rAls1p-N reduce la carga fúngica en tejidos en ratones infectados con varias especies de *Candida no-albicans*. Brevemente, la familia de genes ALS está presente en otras especies de *Candida*, incluidas *C. dubliniensis* y *C. tropicalis* (Hoyer y col., Genetics 157:1555-67 (2001)). De forma similar, se ha descrito un análogo de adhesina de miembros de la familia Als en *C. glabrata* (Cormack y col., Science 285:578-82 (1999); Frieman y col., Mol Microbiol 46:479-92 (2002)). Para confirmar la eficacia de la rAls1p-N contra especies no-*albicans*, se vacunaron ratones Balb/c con rAls1p-N + coadyuvante de Freund como anteriormente, y se infectaron a través de la vena de la cola con 31028 de *C. glabrata* (un aislado clínico del torrente sanguíneo del laboratorio de microbiología de Harbor-UCLA Medical Center), *C. krusei* 91-1159, (proporcionado generosamente por Michael Rinaldi, San Antonio, Texas, Estados Unidos), 22019 de *C. parapsilosis* (aislado clínico del torrente sanguíneo de Harbor-UCLA Medical Center) o 4243 de *C. tropicalis* (aislado clínico del torrente sanguíneo de Harbor-UCLA Medical Center). Tal como se muestra en la figura 31, la vacuna de rAls1p-N redujo la carga fúngica en riñón de ratones infectados con cada una de estas cepas.

30 En resumen, la vacuna de rAls1p-N es capaz de prevenir y/o reducir la gravedad de una candidiasis diseminada cada vez más frecuente y altamente letal. La vacuna es eficaz en ratones consanguíneos y no consanguíneos cuando se mezcla con alumbre como coadyuvante, contra múltiples cepas de *C. albicans* y contra diferentes especies de *Candida no-albicans*. Estos resultados corroboraron además que las vacunas ALS de la invención son eficaces contra una amplia variedad de infecciones por *Candida* y de otras infecciones.

Ejemplo XI

La vacuna de rAls3p-N anti-*Candida* es igual de eficaz que la de rAls1p-N contra candidiasis diseminada y más eficaz contra candidiasis mucosal

40 Este ejemplo compara la eficacia de vacunas rAls3p-N con vacunas rAls1p-N en modelos murinos de candidiasis diseminada hematológicamente, orofaríngea y vaginal.

45 De los miembros de la familia ALS, los genes ALS1 y ALS3 codifican adhesinas con el abanico más amplio de afinidad al sustrato. En comparación con otro, el Als1p medió una adherencia superior a células endoteliales y gelatina, pero una adherencia inferior a células epiteliales (Sheppard y col., J Biol Chem 279:30480-89 (2004)). Estas diferencias en cualidades de adherencia sugirieron que rAls3p-N puede tener una eficacia diferente como inmunógeno de vacuna en comparación con rAls1p-N.

50 Las vacunas y las vacunaciones se realizaron tal como se ha descrito anteriormente. Brevemente, rAls1p-N y rAls3p-N (aminoácidos 17 a 432 de Als1p o Als3p) se produjeron en *S. cerevisiae* y se purificaron mediante filtración en gel y purificación por afinidad en matriz de Ni-NTA, tal como se ha descrito anteriormente y en Ibrahim y col., (2005), referencia anterior; Spellberg y col., (2005), referencia anterior). La cantidad de proteína se cuantificó mediante un ensayo de Lowry modificado. Se confirmó un algo grado de pureza (≈90 %) mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, así como mediante dicroísmo circular y FTIR, tal como se ha descrito anteriormente y en Ibrahim y col., (2005), referencia anterior; Spellberg y col., (2005), referencia anterior). Los ratones se inmunizaron mediante inyección subcutánea (SQ) de rAls1p-N o rAls3p-N mezclada con coadyuvante completo de Freund (CFA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) el día 0, recibieron un refuerzo con otra dosis del antígeno con coadyuvante incompleto de Freund (IFA, Sigma-Aldrich) el día 21, y se infectaron dos semanas después del refuerzo.

60 Los análisis estadísticos se realizaron tal como sigue. Se usó el ensayo de rango logarítmico no paramétrico se usó para determinar diferencias en los tiempos de supervivencia de los ratones. Las valoraciones de anticuerpos e inflamación de almohadilla plantar se compararon mediante el ensayo de Steel para comparaciones múltiples no paramétricas (Rhyne y col., Biometrics 23:539-49 (1967)) o la prueba U de Mann Whitney para comparaciones desapareadas, según fuera apropiado. Las correlaciones se calcularon con la prueba de suma de rangos de Spearman. Para determinar si existía heterogeneidad en estudios de supervivencia replicados, se usó la prueba de

Kolmogorov-Smirnov. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron significativos.

Se demostró que la vacunación con rAls3p-N estimula un abanico amplio de respuestas de anticuerpos en comparación con rAls1p-N. A este respecto, los resultados mostrados en la figura 32 muestran que los ratones vacunados con CFA + rAls1p-N o rAls3p-N desarrollaron valoraciones de anticuerpos significativamente superiores que los ratones que recibieron CFA solo. Cabe señalar que los ratones vacunados con rAls3p-N generaron anticuerpos anti-rAls1p-N en valoraciones equivalentes a los ratones vacunados con rAls1p-N (fig. 32, parte superior). Por el contrario, los ratones vacunados con rAls1p-N generaron valoraciones más pequeñas contra rAls3p-N que los ratones vacunados con rAls3p-N (fig. 32, parte inferior). No obstante, tanto rAls1p-N como rAls3p-N dieron como resultado respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado similares *in vivo* tal como se muestra en la figura 33.

Las vacunas de rAls1p-N y rAls3p-N también mostraron que median una eficacia similar contra candidiasis diseminada. Brevemente, para corroborar adicionalmente que la vacuna de rAls3p-N era tan eficaz como rAls1p-N contra candidiasis diseminada hematógicamente, los ratones se vacunaron con CFA, CFA + rAls1p-N o CFA + rAls3p-N, y subsiguientemente se infectaron a través de la vena de la cola con *C. albicans*. Los resultados mostrados en la figura 34 demuestran que las vacunas de rAls1p-N y de rAls3p-N dieron como resultado una mejora significativa en la supervivencia.

También se determinó la correlación de las valoraciones de anticuerpos anti-Als p y las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado con la supervivencia en ratones vacunados infectados subsiguientemente con *C. albicans*. Brevemente, las valoraciones de anticuerpos se determinaron mediante ELISA en placas de 96 pocillos, tal como hemos descrito previamente y se describe por Ibrahim y col., (2005), referencia anterior; Spellberg y col., (2005), referencia anterior. Los pocillos se recubrieron con 100 μ l por pocillo de rAls1p-N o rAls3p-N a una concentración de 5 μ g/ml en PBS. Se incubaron sueros de ratón durante 1 h a temperatura ambiente siguiendo una etapa de bloqueo con solución salina tamponada tris (TBS) (TrisHCl 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,1 M) que contenía el 3 % de albúmina de suero de bovino. Lo pocillos se lavaron tres veces con TBS que contenía Tween 20 al 0,05 %, seguido por otros 3 lavados con TBS sin Tween. Se añadió anticuerpo secundario IgG anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (Sigma-Aldrich) a una dilución final de 1:5000 y la placa se incubó adicionalmente durante 1 h a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron con TBS y se incubaron con sustrato que contenía tampón de citrato 0,1 M (pH 5,0), 50 mg/ml de o-fenilendiamina (Sigma) y 10 μ l de H₂O₂ al 30 %. Se dejó desarrollar el color durante 30 min, después de lo cual la reacción se terminó añadiendo H₂SO₄ al 10 % y se determinó la densidad óptica (DO) a 490 nm en un lector de placas de microvaloración. Los pocillos de control negativo recibieron sólo anticuerpo irrelevante y se sustrajo la absorbancia de fondo de los pocillos de ensayo para obtener las lecturas de DO finales. La valoración de ELISA se tomó como el recíproco de la última dilución de suero que dio una lectura de DO positiva (es decir, $> DO$ media de las muestras de control negativo + (desviación típica * 2).

Las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado se evaluaron mediante medición de los ensayos de inflamación de la almohadilla plantar. Brevemente, los ratones se inmunizaron con rAls1p-N, rAls3p-N o CFA solo. Dos semanas después del refuerzo, los tamaños de línea base de almohadilla plantar de ratones inmunizados se midieron usando un calibre digital electrónico. Se inyectaron cincuenta μ g de rAls1p-N o rAls3p-N en 25 μ l de PBS en las almohadillas plantares derechas y se inyectó PBS solo en las almohadillas plantares izquierdas de los ratones inmunizados. Veinticuatro horas después las almohadillas plantares se midieron de nuevo. La inflamación de almohadillas plantares específica del antígeno se calculó como: (espesor de la almohadilla plantar derecha a 24 h – espesor de la almohadilla plantar derecha en la línea base) - (espesor de la almohadilla plantar izquierda a 24 h - espesor de la almohadilla plantar izquierda en la línea base).

Los ratones vacunados se sangraron para la determinación de valoraciones y se sometieron a ensayos de inflamación de almohadilla plantar dos días antes de la infección. Los ratones vacunados que no sobrevivieron a la infección tenían, de todas las maneras, un intervalo amplio de valoraciones de anticuerpos tal como se muestra en la figura 35. Muchos de dichos ratones tuvieron valoraciones de anticuerpos anti-rAls1p-N y anti-rAls3p-N $\geq 1:50.000$ ($\geq 4,5 \log_{10}$). Como resultado, las valoraciones de anticuerpos no se correlacionaron significativamente con la supervivencia. Por el contrario, la intensidad de las reacciones de inflamación de la almohadilla plantar se correlacionaron con la supervivencia (fig. 35, $p = 0,6$ y $p = 0,009$ mediante la prueba de correlación de rangos de Spearman).

La vacuna de rAls3p-N también demostró más eficacia que la de rAls1p-N en dos modelos de candidiasis mucosal. Debido a que el Als3p medió una adhesión superior a células epiteliales con comparación con Als I p, esta observación indica que el rAls3p-N puede mostrar una eficacia única en modelos mucosales de infección. La eficacia de rAls1p-N en comparación con rAls3p-N evaluada en un modelo de infección orofaríngeo tratado con esteroides y en modelo de vaginitis por *Candida*.

Brevemente, los estudios de vacunas en el modelo de candidiasis orofaríngea (OPC) murina anterior se realizaron tal como se ha descrito previamente y como se describe por Spellberg y col., (2005), referencia anterior; Kamai y

- col., *Antimicrob Agents Chemother* 45:3195-57 (2001) y Kamai y col., *Infect Immun* 70:5256-58 (2002). Los ratones vacunados se inmunocomprometieron mediante tratamiento con acetato de cortisona (225 mg/kg SQ los días -1, 1 y 3 con respecto a la infección). El día de la infección, los ratones se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal con 8 mg de xilazina y 110 mg de quetamina por kg. Se saturaron exudados uretrales en alginato de calcio con *C. albicans* disponiéndolos en una suspensión de 10^6 organismos por ml en HBSS a 30 °C. Los exudados saturados se dispusieron sublingualmente en la cavidad oral de los ratones durante 75 min. Después de 5 días desde la infección, la lengua y el tejido hipoglosal se escindieron, se pesaron, se homogeneizaron y después se cultivaron cuantitativamente para determinar la carga fúngica oral.
- 5
- 10 La eficacia de la vacuna contra candidiasis vaginal murina se realizó mediante vacunación de ratones Balb/c hembras que fueron tratados subcutáneamente con 30 µg de valerato de estradiol disuelto en aceite de cacahuete (ambos de Sigma-Aldrich) el día -3 con respecto a la infección para inducir pseudoestrus. El día de la infección, los ratones se sedaron mediante administración ip de 100 mg/kg de quetamina. Los ratones sedados se infectaron intravaginalmente con 10^6 blastosporas de *C. albicans* en 10 µl de HBSS. El día 3 después de la infección, las
- 15 vaginas y aproximadamente un centímetro de cada cuerno uterino se diseccionaron en bloque, se homogeneizaron y se cultivaron cuantitativamente.
- Tal como se muestra en la figura 36, en ratones tratados con cortisona con candidiasis orofaríngea, la vacuna de rAls1p-N medió una tendencia fuerte hacia una carga fúngica en la lengua reducida ($p = 0,054$). La magnitud general del beneficio fue $< 0,3$ log UFC/gramo (fig. 36). En comparación, la vacuna de rAls3p-N medió una disminución $> 0,6$ log UFC/gramo en la carga fúngica en la lengua que fue estadísticamente significativa ($p = 0,005$, fig. 36). De forma similar, en un modelo no inmunocomprometido de vaginitis candidiásica, la vacuna de rAls3p-N medió una disminución de $0,7$ log UFC/gramo en la carga fúngica vaginal en comparación con CFA solo ($p = 0,02$) tal como se muestra en la figura 37. En comparación, el rAls1p-N no medió ningún beneficio en el modelo de vaginitis y el rAls3p-N fue significativamente más eficaz que el rAls1p-N ($p = 0,01$).
- 20
- 25
- Los resultados anteriores indican que una vacuna basada en rAls3p-N, que tiene una homología del 85 % con rAls1p-N en el nivel de aminoácidos, fue igualmente eficaz contra candidiasis diseminada, pero fue más eficaz que el rAls1p-N contra la infección mucosal. La eficacia aumentada de rAls3p-N se observó tanto en un modelo tratado con esteroides de candidiasis orofaríngea como en un modelo inmunocompetente de vaginitis candidiásica. Los resultados anteriores también muestran que el logro de una supervivencia a largo plazo ≥ 50 % en un modelo murino de choque séptico candidiásico con terapia anti-fúngica no adjuntiva es alentador, y corrobora adicionalmente el beneficio terapéutico de todas las vacunas de ALS de la invención.
- 30
- 35 Las valoraciones de anticuerpos no se correlacionaron con el efecto protector de ninguna de las vacunas durante la candidiasis diseminada, pero la inducción de hipersensibilidad de tipo retardado *in vivo* se correlacionaron con la protección. Estos datos también corroboran adicionalmente que el mecanismo de protección inducido por vacuna fue una inducción de inmunidad al hongo mediada por células de tipo 1. Tanto el rAls 1p-N como el rAls3p-N indujeron valoraciones equivalentes de anticuerpos contra rAls1p-N, pero el rAls3p-N indujo significativamente valoraciones más elevadas de anticuerpos anti-rAls3p-N que el rAls1p-N. Estos datos indicaron que, a pesar de su alto grado de homología de secuencia de aminoácidos (85 %), el sistema inmunitario humoral puede distinguir entre rAls1p-N y rAls3p-N. Los resultados anteriores corroboran también que, independientemente de las diferencias en las características de adherencia a células epiteliales de Als1p y Als3p, las vacunas de rAls1p-N y de rAls3p-N fueron igualmente eficaces en la protección contra candidiasis diseminada hematógicamente (es decir, endovascular).
- 40
- 45 En suma, la vacuna anti-*Candida* de rAls3p-N indujo respuestas mediadas por células equivalentes para respuestas basadas en anticuerpos más amplias que la vacuna de rAls 1p-N. Los inmunógenos dieron como resultado un grado de protección equivalente contra candidiasis diseminada hematógicamente, pero el rAls3p-N medió una protección superior contra candidiasis orofaríngeo y contra candidiasis vaginal.

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna que comprende un miembro aislado de la familia de proteínas Als de *Candida* que tenga actividad de adhesión celular, o un fragmento inmunógeno del mismo, para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección por *Staphylococcus aureus* en un organismo humano o animal.
- 5
2. La vacuna para su uso según la reivindicación 1, en la que dicho miembro de la familia de proteínas Als comprende una proteína Als derivada de una cepa de *Candida* seleccionada del grupo que consta de *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* y *Candida parapsilosis*.
- 10
3. La vacuna para su uso según la reivindicación 1, en la que dicho miembro de la familia de proteínas Als está seleccionado de Als1p o Als3p.
4. La vacuna para su uso según la reivindicación 1, en la que dicho fragmento inmunógeno comprende un fragmento de la región N-terminal de un miembro de la familia de proteínas Als.
- 15
5. La vacuna para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha administración comprende inmunización activa, inmunización pasiva o una combinación de las mismas.
6. La vacuna para su uso según la reivindicación 4, en la que dicho fragmento inmunógeno es un fragmento de la región N-terminal de dicha proteína Als3 o Als1 de *Candida*.
- 20
7. La vacuna para su uso según la reivindicación 6, en la que el fragmento inmunógeno comprende una secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID N°: 2.
- 25
8. La vacuna para su uso según la reivindicación 6, en la que el fragmento inmunógeno comprende una secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID N°: 1.
9. Un miembro aislado de la familia de proteínas Als de *Candida* que tenga actividad de adhesión celular, o un fragmento inmunógeno del mismo, para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección por *Staphylococcus aureus* en un organismo humano o animal.
- 30
10. El miembro aislado de la familia de las proteínas Als de *Candida* para su uso según la reivindicación 9, en la que dicho miembro de la familia de proteínas Als comprende una proteína Als derivada de una cepa de *Candida* seleccionada del grupo que consta de *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* y *Candida parapsilosis*.
- 35
11. El miembro aislado de la familia de las proteínas Als de *Candida* para su uso según la reivindicación 9, en el que dicho miembro de la familia de proteínas Als está seleccionado de Als1p o Als3p.
- 40
12. El miembro aislado de la familia de las proteínas Als de *Candida* para su uso según la reivindicación 9, en el que dicho fragmento funcional comprende un fragmento de la región N-terminal de un miembro de la familia de proteínas Als.
- 45
13. El miembro aislado de la familia de las proteínas Als de *Candida* para su uso según la reivindicación 12, en el que dicho fragmento inmunógeno es un fragmento de la región N-terminal de dicha proteína Als3 o Als1 de *Candida*.
- 50
14. El miembro aislado de la familia de las proteínas Als de *Candida* según la reivindicación 13, en el que el fragmento inmunógeno comprende una secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID N°: 2.
15. El miembro aislado de la familia de las proteínas Als de *Candida* para su uso según la reivindicación 13, en el que el fragmento inmunógeno comprende una secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID N°: 1.

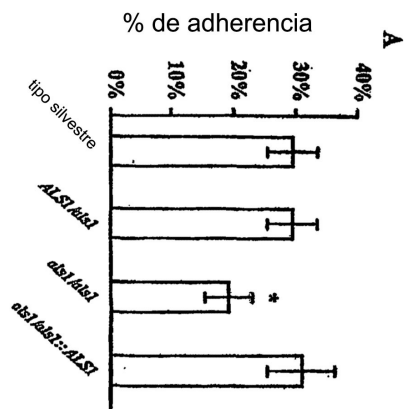


Fig. 1A

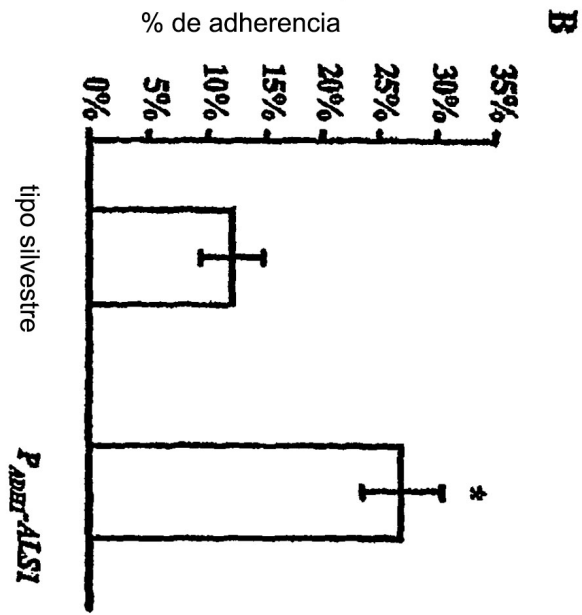


Fig. 1B



FIG. 2A



FIG. 2B

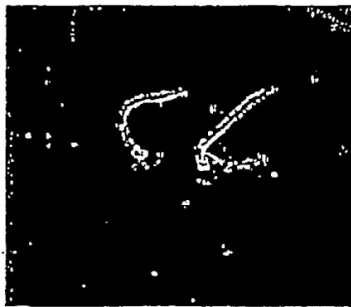


FIG. 2C



FIG. 2D

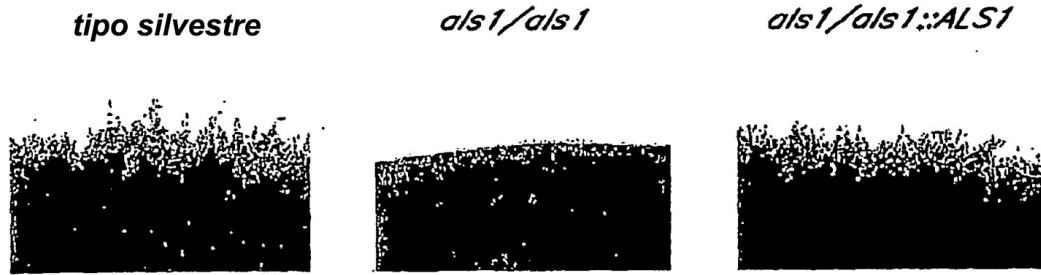


FIG. 3A

tipo silvestre

PADH1-ALS1



FIG. 3B

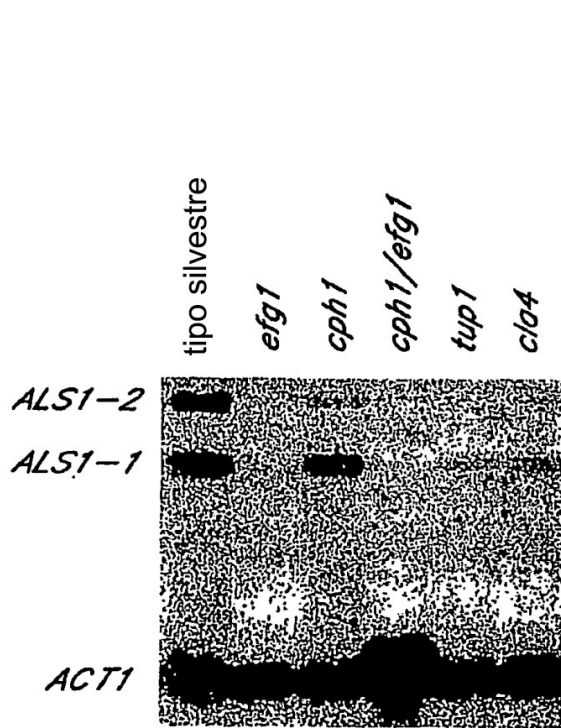


FIG. 4A

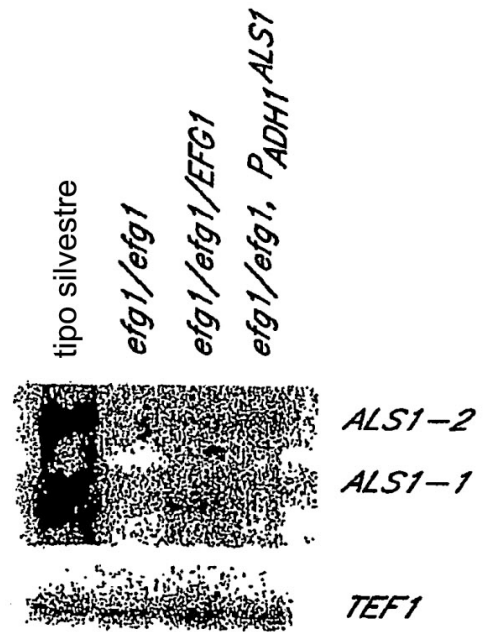


FIG. 4B

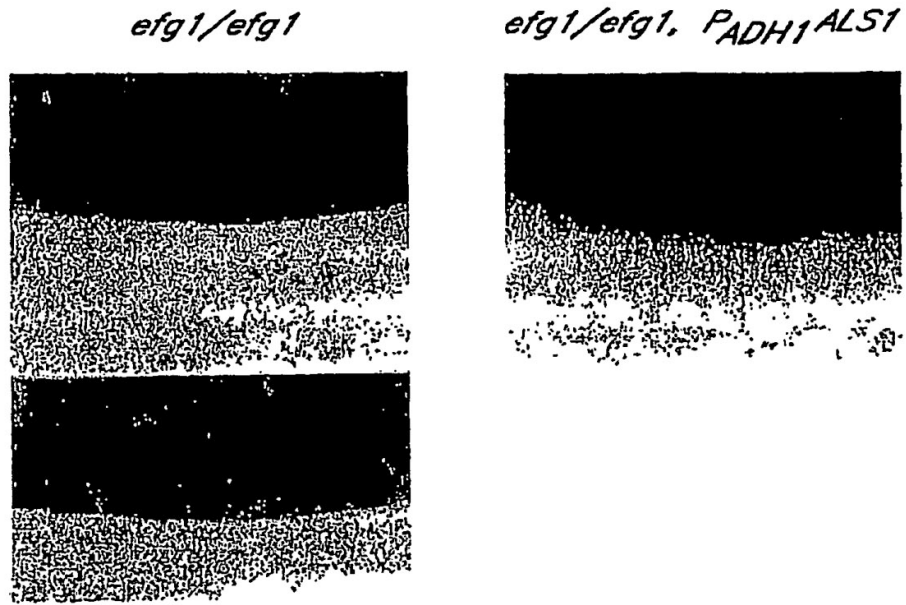


FIG. 4C

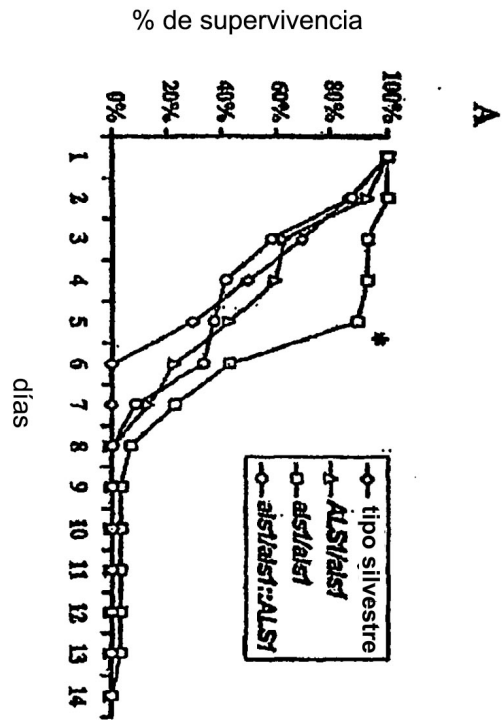


Fig. 5A



FIG. 5B

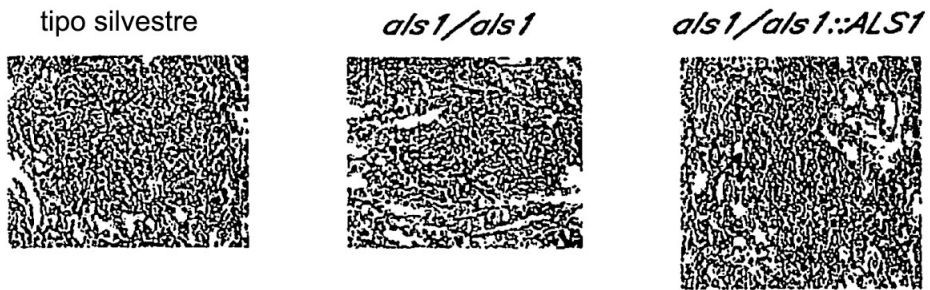
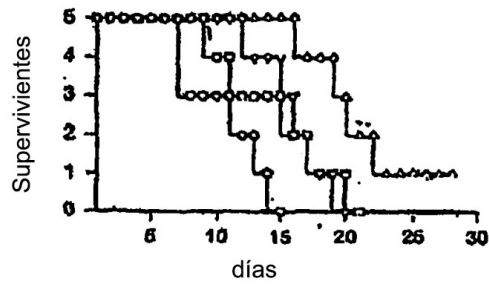


FIG. 5C

Efecto profiláctico de anticuerpos antiALS
 contra candidiasis diseminada



	<u>MST (días)</u>
○ DPBS	11.4 ± 3.3
□ NRS (PB)†	15.4 ± 4.4
△ S²-antiALS	22.0 ± 4.6
◇ I²-antiALS	18.8 ± 2.6

Fig. 6

ALS1 .MLQOFTL FLVLSLAKLIT V DSEH TWSRANFYAPGPGP KNAVIGHSLDG S NP TLMPCVFKFTSQF D DGVKVAQCQ Y; 99
 ALS3 .MLQOFTL FLVLSVATARTI V NSEH TWSRANFYAPGPGP KNAVIGHSLDG S SP TLMPCVFKFTSQF D HGVKVAQCQ Q; 99
 ALS5 .MLQOFTL FLVLSFATARTI I NSID TWSRANFYAPGPGP KNAVIGHSLDG S NP TLMPCVFKFTSQF D DGVKVAQCQ Y; 99
 ALS6 KKVILLE PFYCLAMAKLIS V TSEH TITNGHYFGGPGP YAVLGHSLDG L SP TLMPCVFKFTSQF D NGVKVAQCQ H; 100
 ALS7 HKKILLY LASFTVISEKVT V NQEH TWITNGHYFGEHETL RAKQURHALDG I SP TLMPCVFKFTSQF Q NSLAVACD D; 100
 ALS9 .MLFOPLL LXLVAVSTARTI V NSEH TWANRANFYQIPEP KNAVIGHSLS T DA TLMPCVFKFTSQF D DGVKVAQCQ N; 99
 Consenso L X G F SL T A L W L T A CDTP L MCVX K SV LTA YKIC F ;

ALS1 S EFTT TLACTVNDALAKSSIKAF T TLPLAFVUGT STDLK CPTAGTNT N DEEI IDVEPESTVDEBSAYLAKS VRESLAKVTLL; 199
 ALS3 A EFTT TLACTVNSVTLFESIKAL T TLPLAFVUGT SVDLR CPTAGTNT N GKKI INVDFERSNVDFKGYLAKS VRESLAKVTLL; 199
 ALS5 S EFTT TLACTVNDALAKSSIKAF T TLPLAFVUGT STDLK CPTAGTNT N SKKL LAVAFKSTVDRSGYLAITS FMSLAKIATL; 199
 ALS6 A EFTT SMCVUNDELSENTEAF T ELPLAFVUGT SVDLK CPTAGTNT N DEKI TVNVPKTPKSSSLAVFA VPSLAKLSSL; 200
 ALS7 A DTKB SLKCTVDEBELNEOTVP S ILPLAFVUGS KSTIQ CFSSTGNT P NQQL TIANFLPFRKELAGLVVVSQ LMSLWMTNRF; 200
 ALS9 A EFTT SLSCTVNSVSEVUDKAS T KLPEFVUGT SVDLK CPTAGTNT T DTEI TSVDFOQASVPSISSGYLAKS VPSLAKIASSL; 199
 CON GE PS C V G V LP FVUGG GS DSKCP G JTWTF D3 S F P R SL

ALS1 FVAPO EN TSGTMGFSSSNDVA NHHIGLTKL D NY S ESFSYTKTCSNGIQIKVQVPGYRPFIDAYIS ATDVROVTLAYTNDYT; 297
 ALS3 FVAPO AN TSGTMGPANTYQVQ NHHVGLTKL D NY S ESFSYTKTCSNGIITLVKQVPGYRPFVDAYIS ATDVNSVTLAYANEYT; 297
 ALS5 YVAPQ EN TSGTMGFSSTYGDVA NVHIGLSKV D NH T ESFSYTKTCSNGISITLVKQVPGYRPFIDAYIS PSDRNQVQLSTRNDYT; 297
 ALS6 VVASQ TA ASGVLAGFANTYQVQ TIRHIGLTKL S NM S ESFSYTKTCSNGIITLVKQVPGYRPFIDAYIS PSDRNQVQLSTRNDYT; 300
 ALS7 VNSTP EN OSKGLAFTSNDDEPE SLHGLTBEI D SM S VPPDHTKTRCSALYIETKIPAGYRPFVDALVO IPTTBEFFVYKTHFA; 298
 ALS9 FYLPQ EN TSGTMGFSSTYQ AT NHHIGLTKL D NF S ESFSYTKTCSNGIITLVKQVPGYRPFIDAYIS SENVEQVTLAYANEYT; 296
 Consenso C GY SG GF IDCS GI N W PV S P T C PGTREPF D Y N

ALS1 AGRSQK FLEWQ YRNSD GSN IYVAVTITVTD T AV NPSVDKTK EILQ TITTSYGVV SYL KI PIGETATVIVD ; 396
 ALS3 AGTYWORA FLEWQ YRNSD GSN IYVAVTITVTD T AV DPHRDKTK EILK TITTSYGVV SYL KI PIGETATVIVD ; 396
 ALS5 VDYWORA FLEWQ YRNSD GSN IYVAVTITVTD T AV NPSVDKTK EILQ TITTSYGVV SYL KI PIGETATVIVD ; 396
 ALS6 MOOKKEND LIYEWTS YRNSD GSN AAVVITITVTD T AI DEVDKTK SVLE TITTSYGVV SYL KI TIGETATVIVD ; 399
 ALS7 VNGIYTSI FTSEFFSQILYDE LAI ADLAVTITVIG I RT ISRLQKTK LVLE TVTTSRHPD NYE EK YIGETATVIVD ; 398
 ALS9 KNGRTVVD FLEWQ YRNSD GSN DIIVVITVTA T AV NPTVDKTB EVIQ TITTSYGVV SYE FT TIGETATVIVD ; 395
 CON C A G V TT TV S T TLEPF KI TI PEPITV ITS G T T A IG YATV D P

ALS1 Y IT V SEMVGTITVIT RINFTDSI VVVQVSEH VSTVEY QSFATITV APPGG DT IIREPPEHIV EY Q PATTITVAPPGG; 496
 ALS3 Y IT V SKMGTITVIT RINFTDSI VIVQVSEH VITVEY QSFATITV APPGN DT IIREPPEHIV EY S YTTITVAPPGG; 496
 ALS5 Y IT V SERLGTITVIT RINFTDSI VVVQVSEH VITTOP ESPTITV NSLAK DS IYRERHAPV EF S PATTITVAPPGG; 496
 ALS6 Y IT I SITYGSAITV RINFTDSI VVVQVSEH VITTOP GSVFTITV RQPGQ DS IYRERHAPV EF S PATTITVAPPGG; 499
 ALS7 Q TA L TTYQESSTAIT YFDDIDAV VIVKIEYH VITVEY ESFATITV RQPGG DG IYRERHAPV EF S PATTITVAPPGG; 496
 ALS9 Y IT V TEFIGSVITV YSNETGVS VIVLELEPA VT HRE ESFATITV RQPGG NS IYRERHAPV EF S PATTITVAPPGG; 494
 CON R TT T H T T DTV V P P FT NS S T T T T V EP N TVVTV WS S T T T P G

ALS1 D IR PHTVITVEY Q PAT T VTRPQCTD; 534
 ALS3 D IK RHTVITVEY S YIT S FTRPQCTD; 534
 ALS5 D VR HPTVITVEY S YAT S IYRQCTD; 534
 ALS6 D VR HFTVITVEY S PAT S VYRQCTD; 537
 ALS7 D IK HFTVITVEY S PAT S VYRQCTD; 537
 ALS9 N VK YRPTVITVEY S PAS T VYRQCTD; 536
 CON T SVL EP NPTVITVEY S T T T P CT

FIGURA 7

Familia de genes ALS de *C. Albicans*

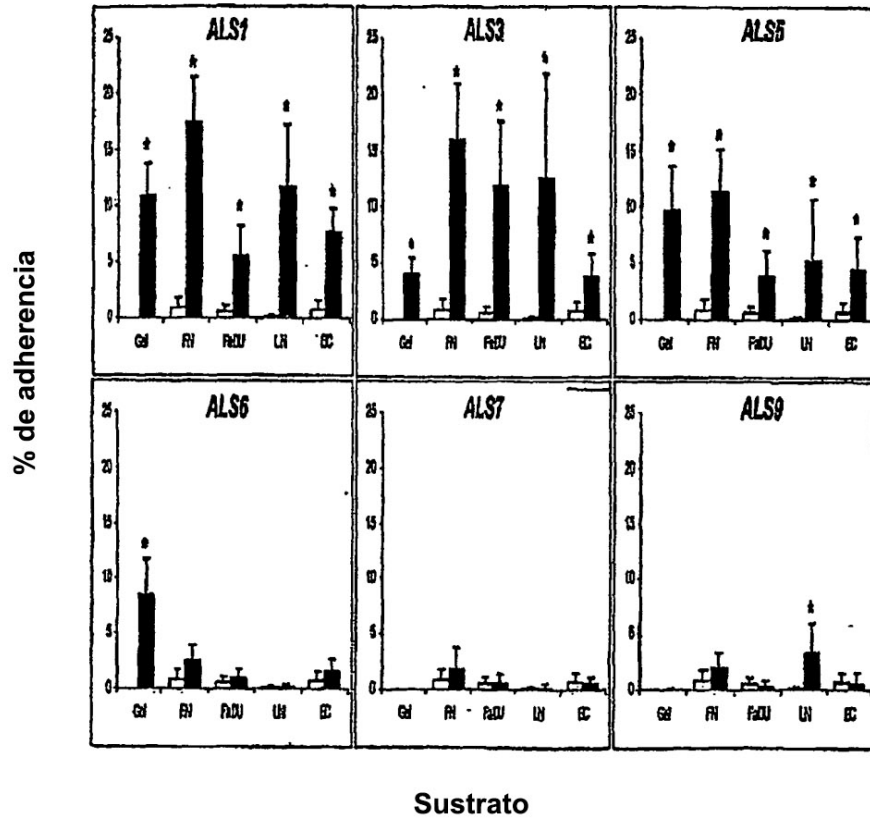


Fig. 8

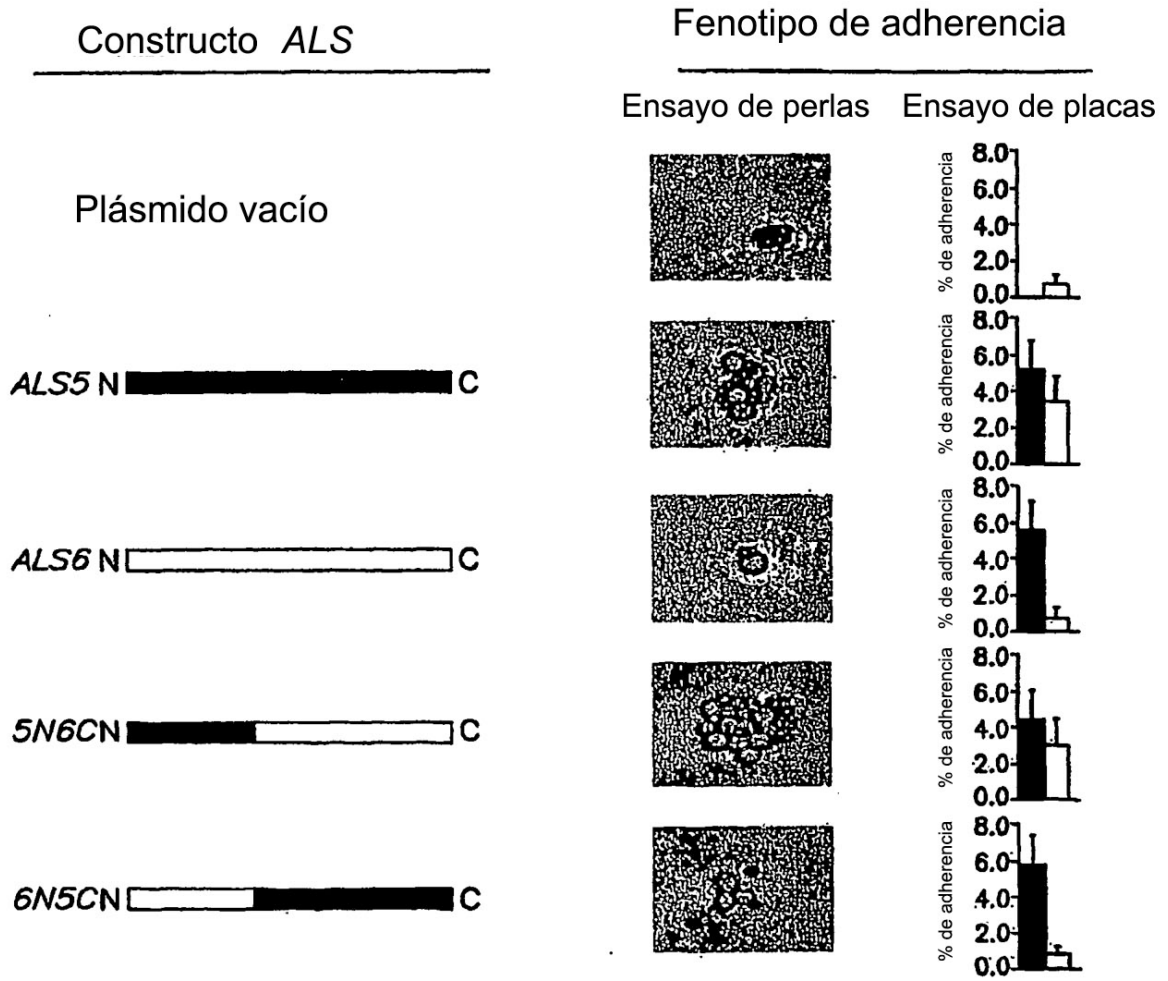


FIG. 9

Familia de genes ALS de C. Albicans

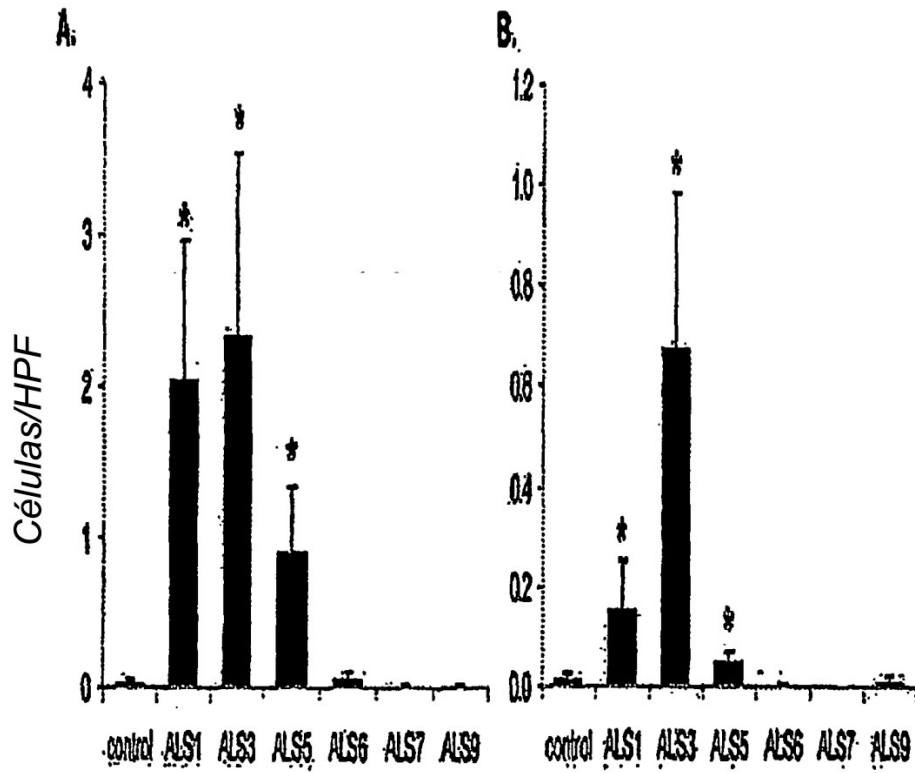


Fig. 10

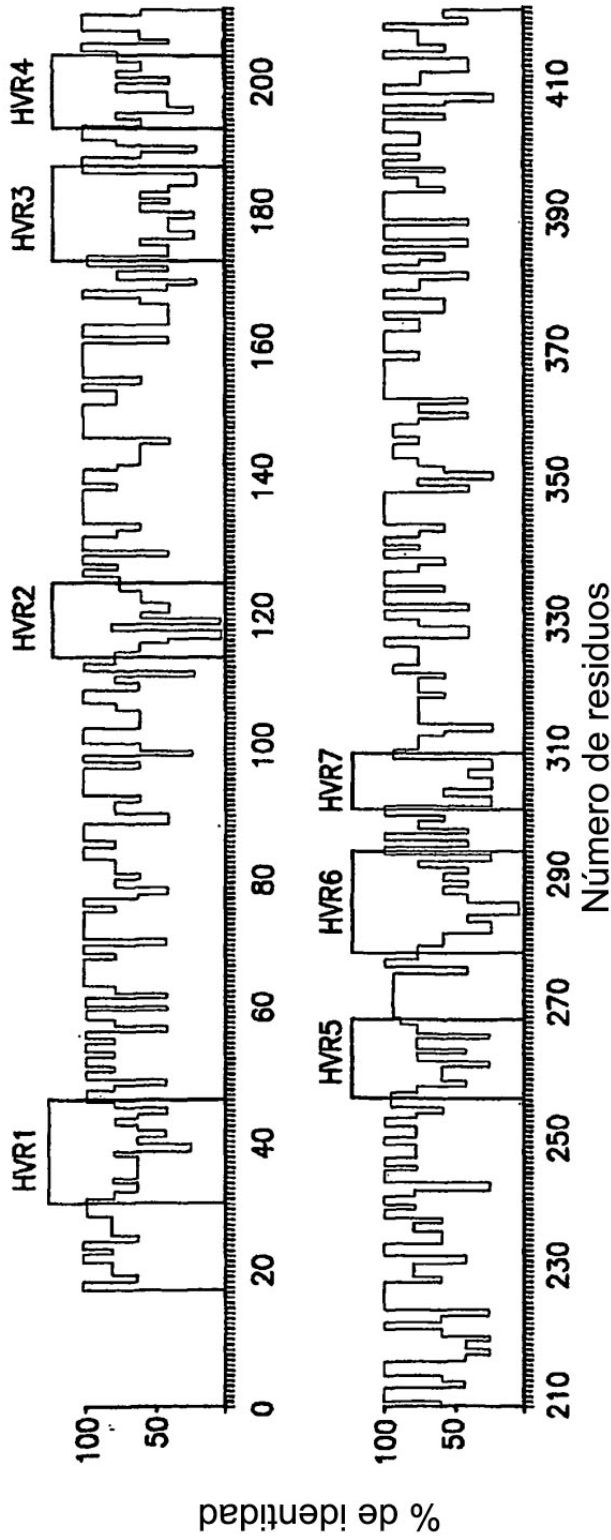


FIG. 11A

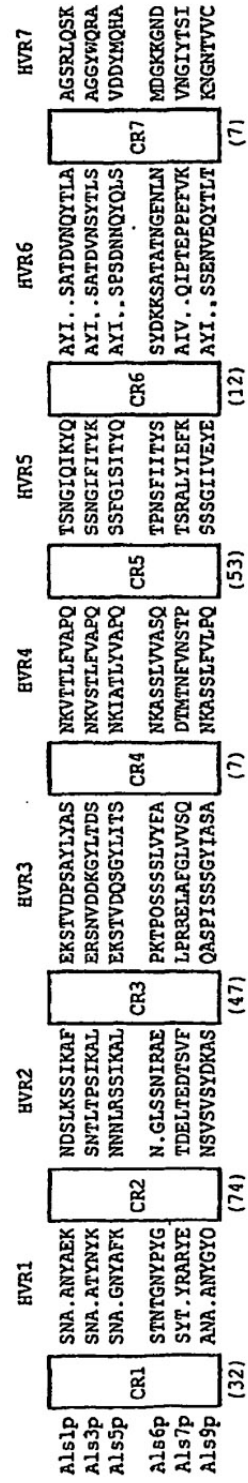


FIG. 11B

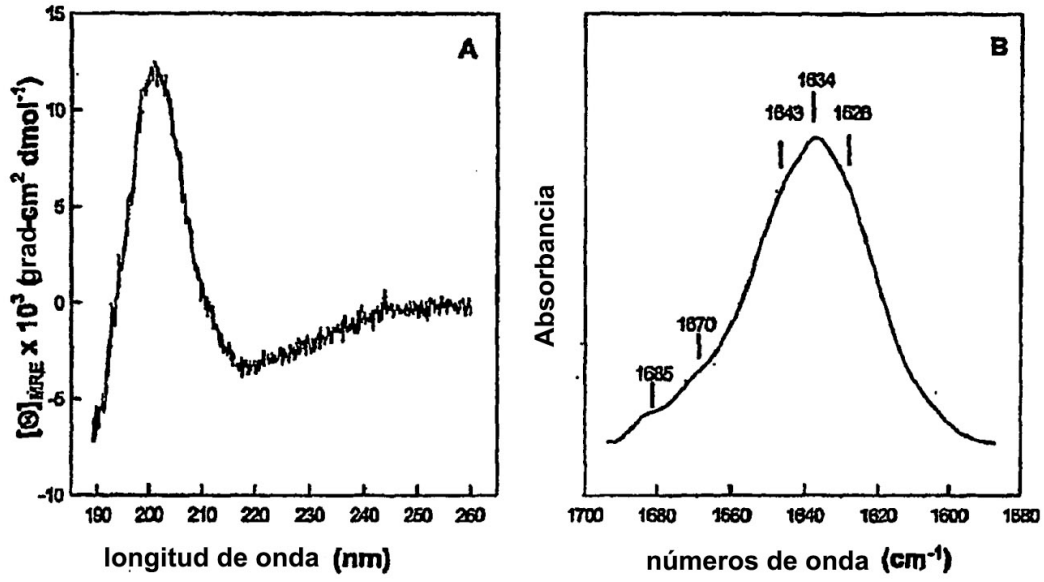


Fig. 12

Familia de genes ALS de C. Albicans

Dominio N-terminal de proteínas Als

Modelo de superficie accesible a agua

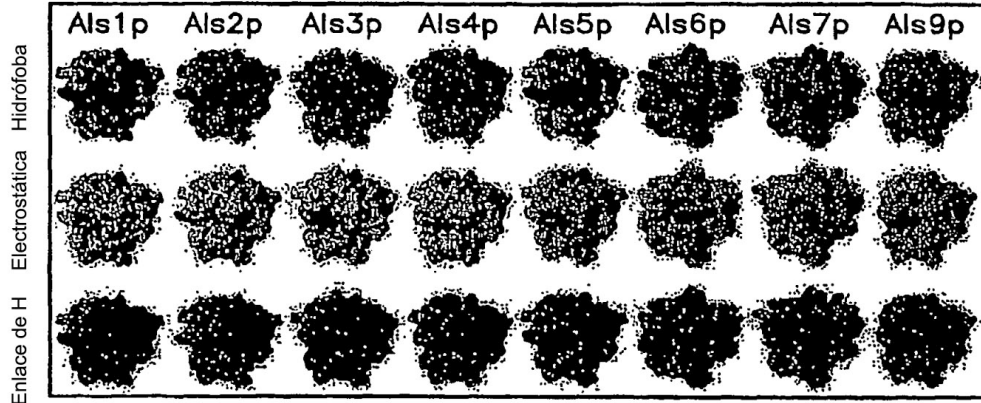


FIG. 13

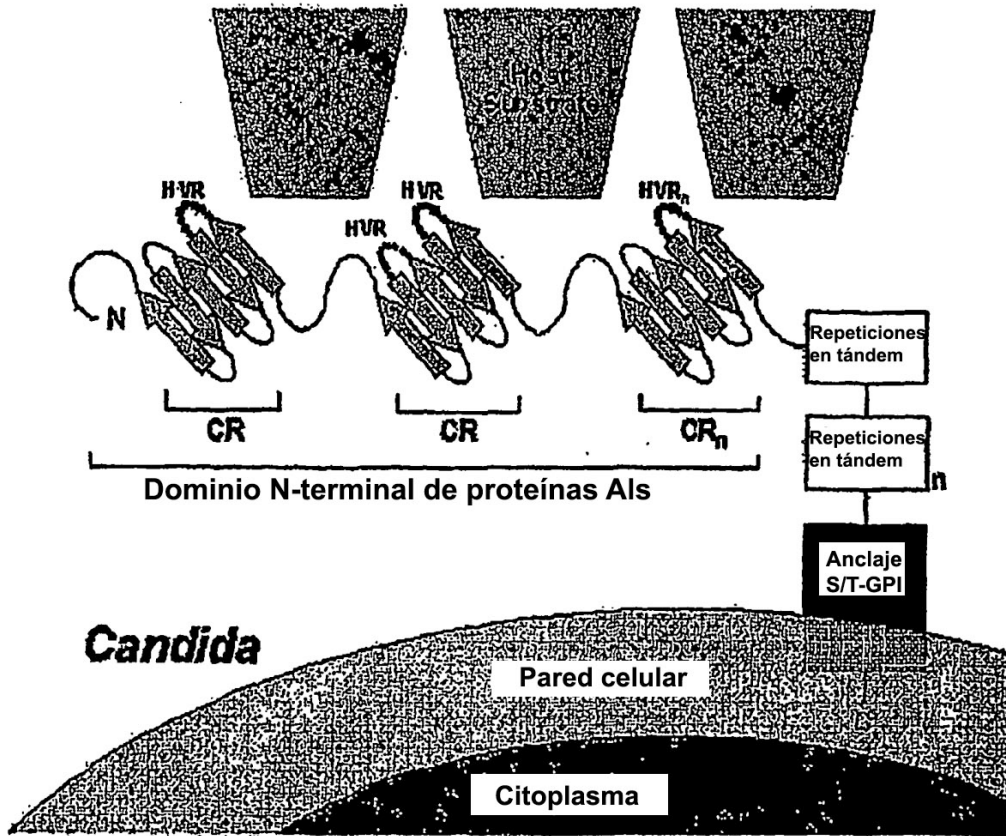


Fig. 14

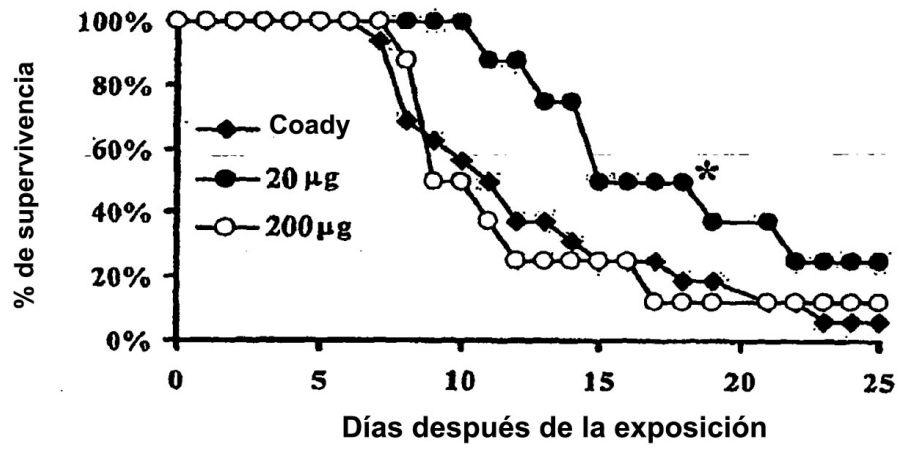


Fig. 15

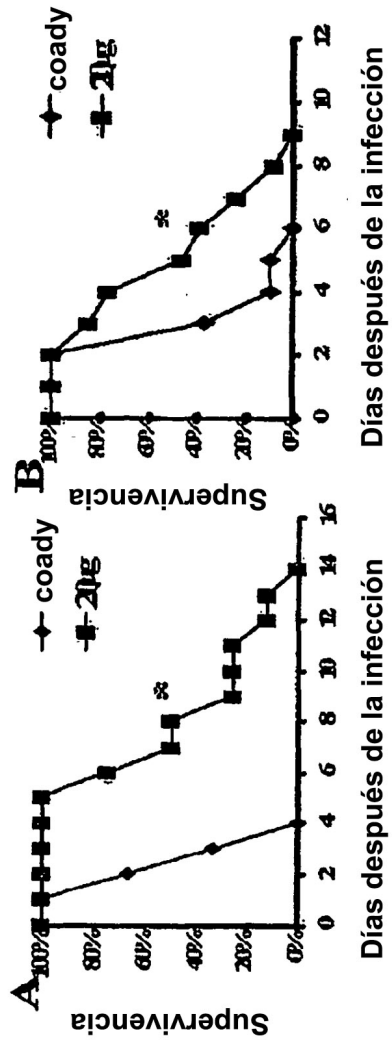


Fig. 16A, 16B

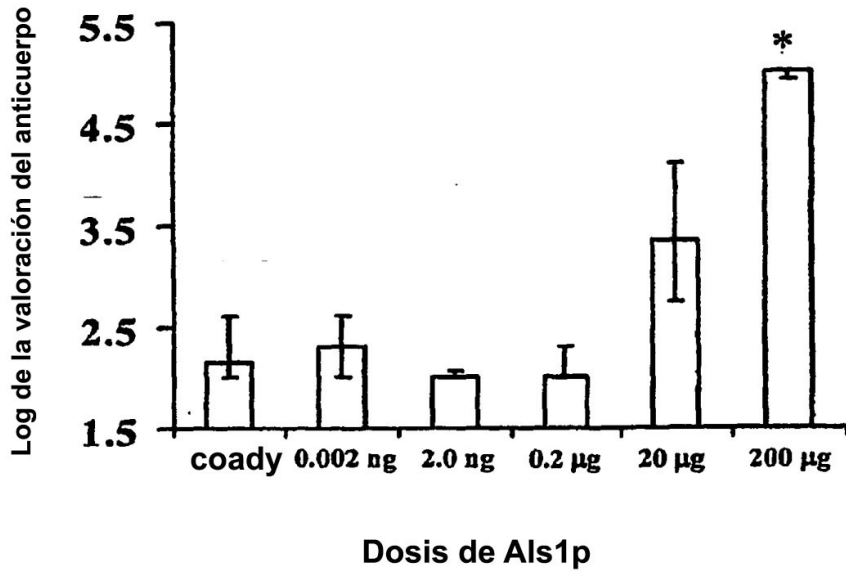


Fig. 17

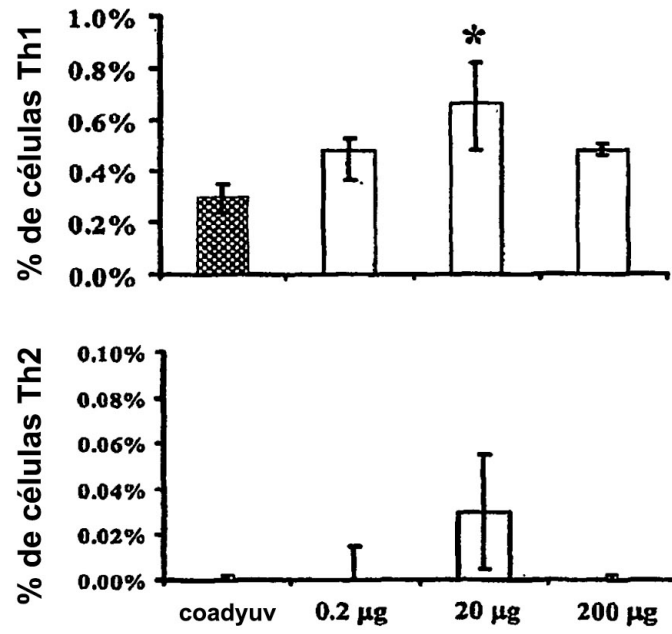


Fig. 18

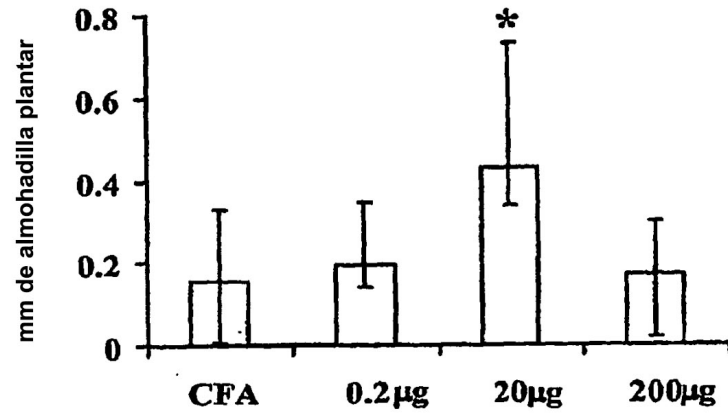


Fig. 19

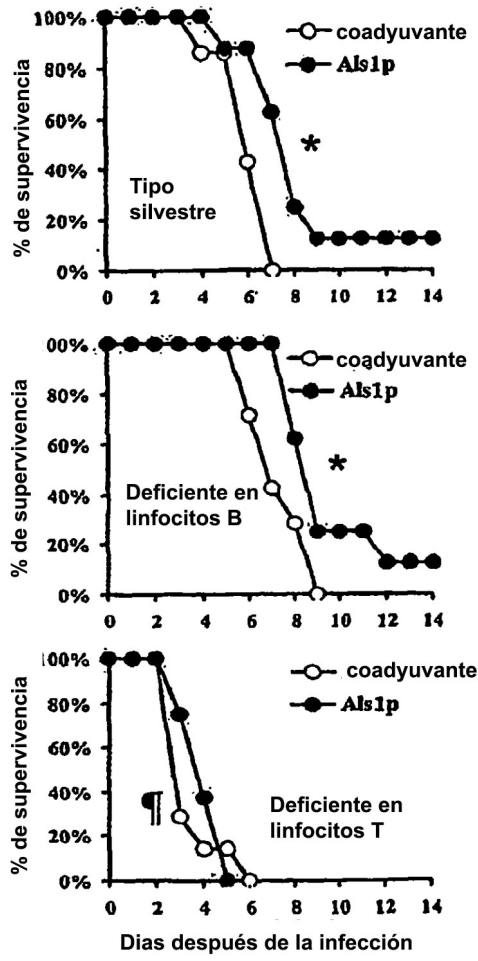


Fig. 20

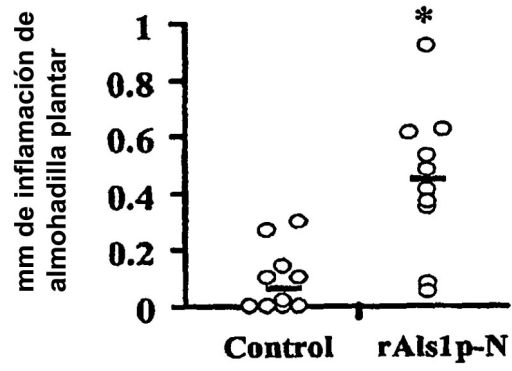


Fig. 21

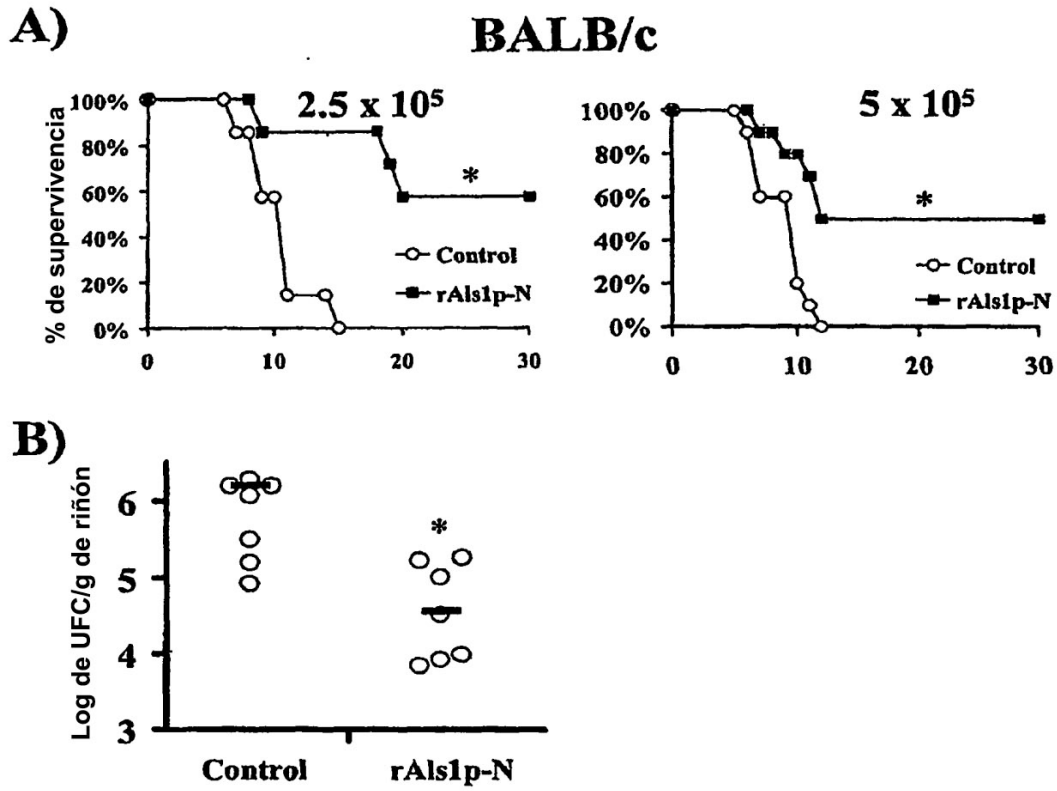


Fig. 22A, 22B

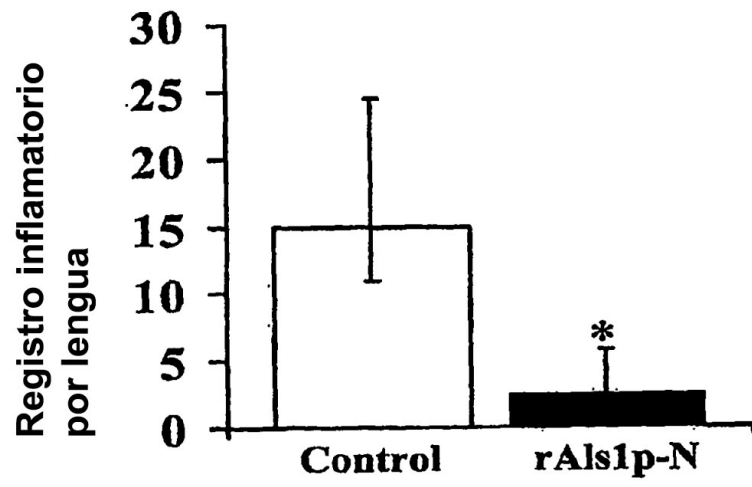


Fig. 24

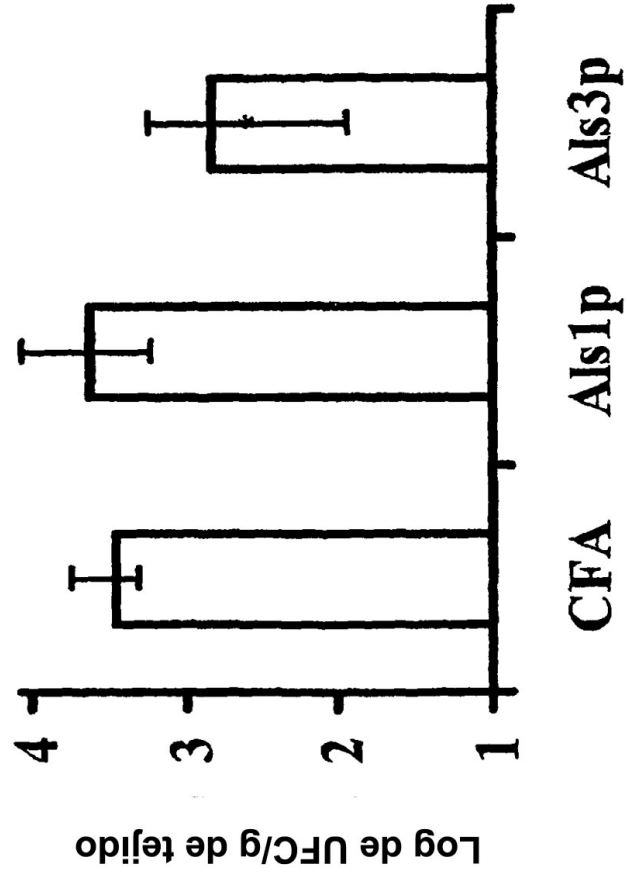


Figura 25

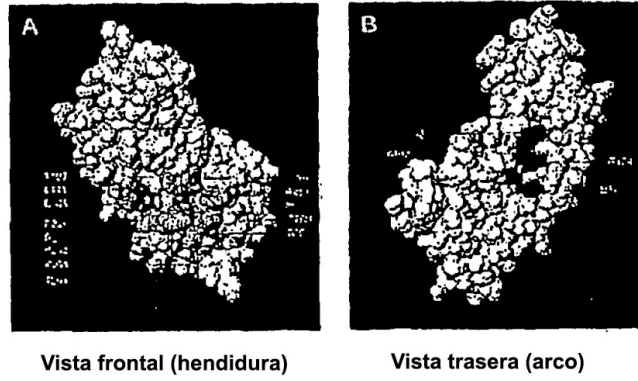


FIGURA 26

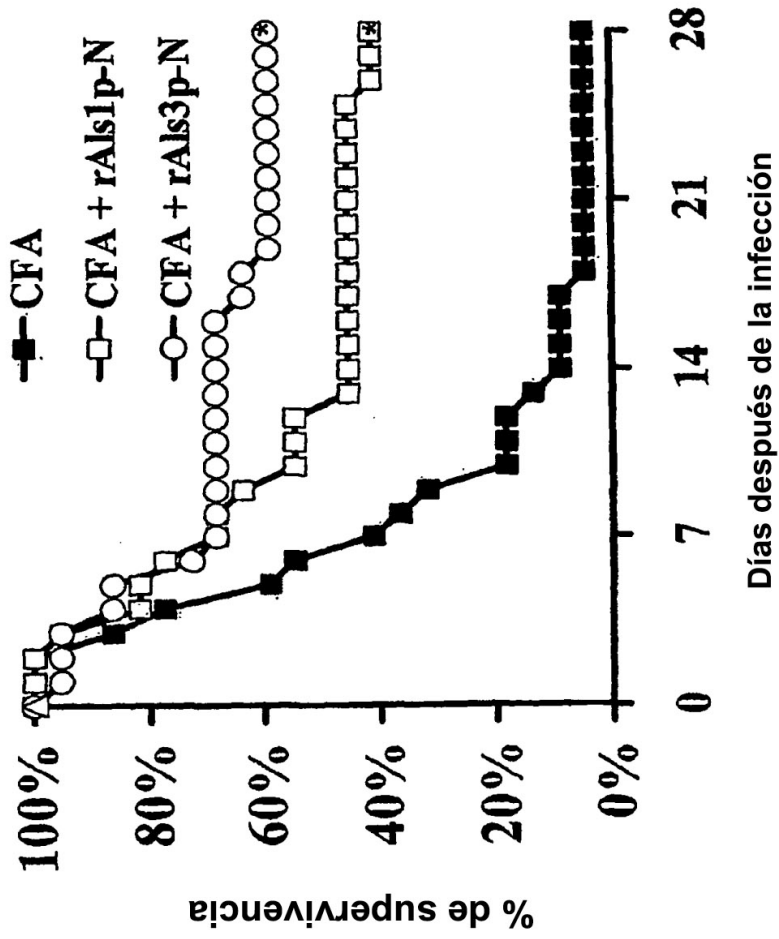


Figura 27

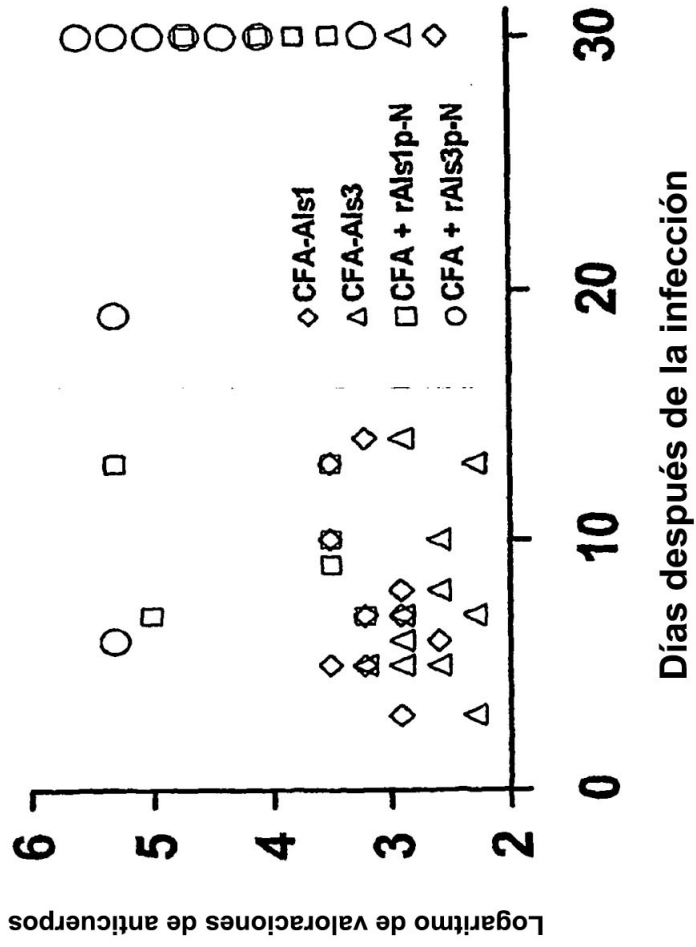


Figura 28

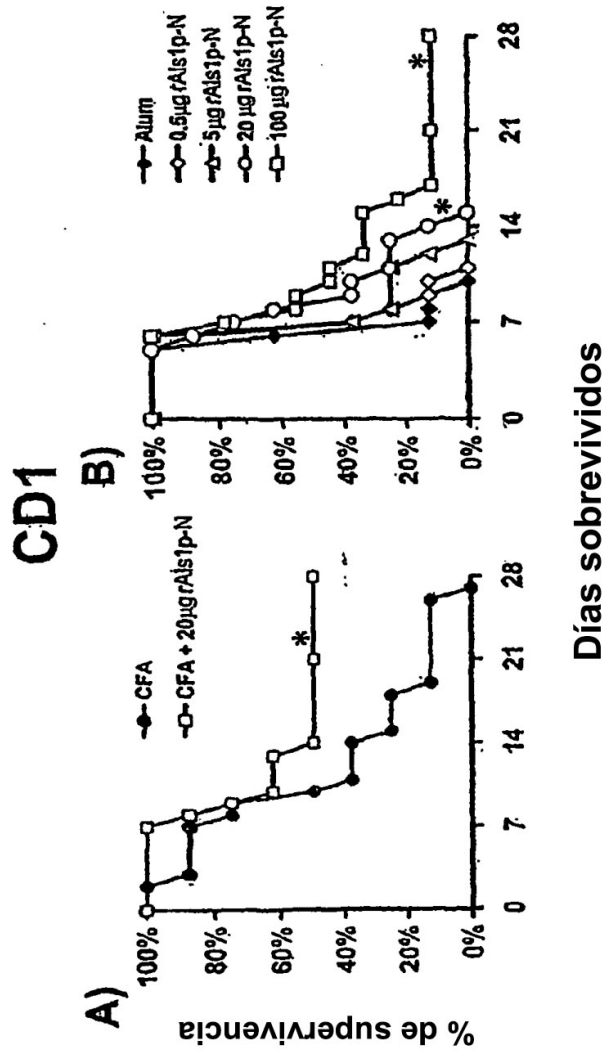
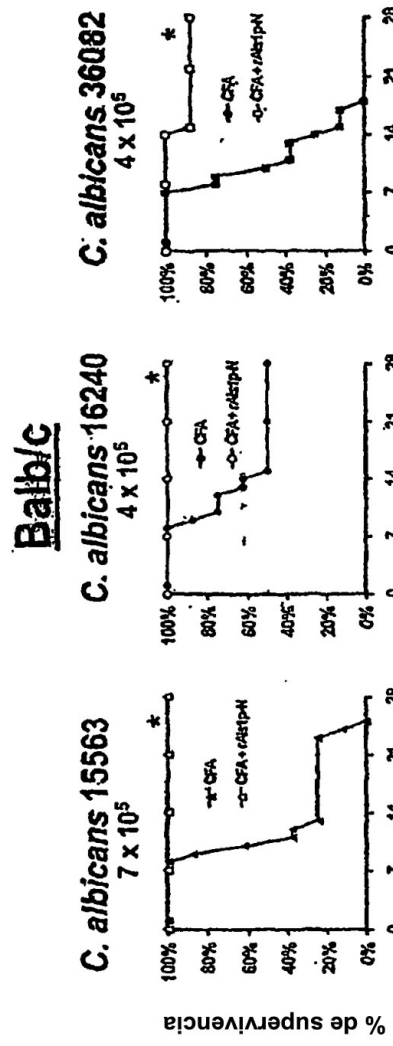


FIGURA 29



Días de después de la infección

FIGURA 30

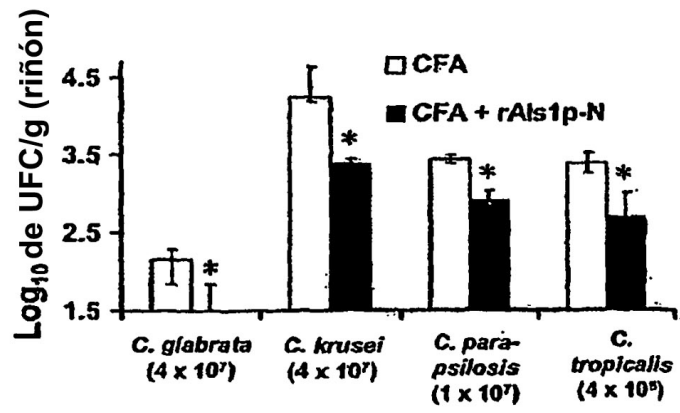


FIGURA 31

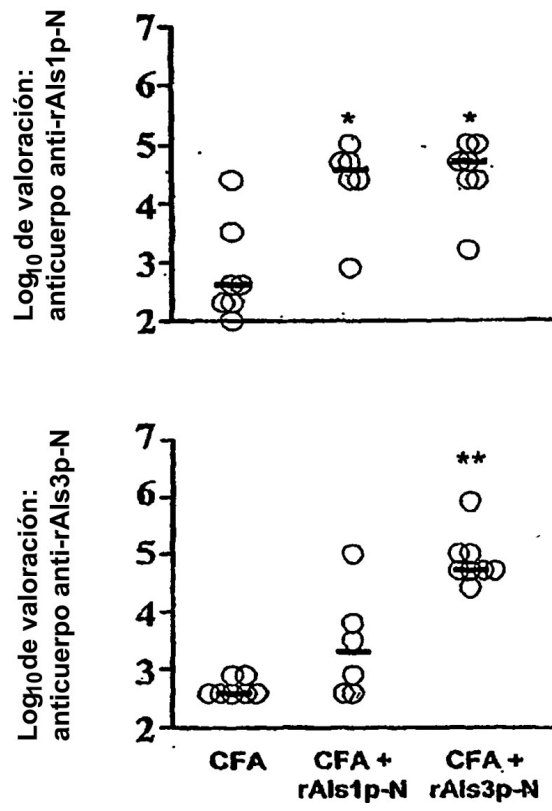


FIGURA 32

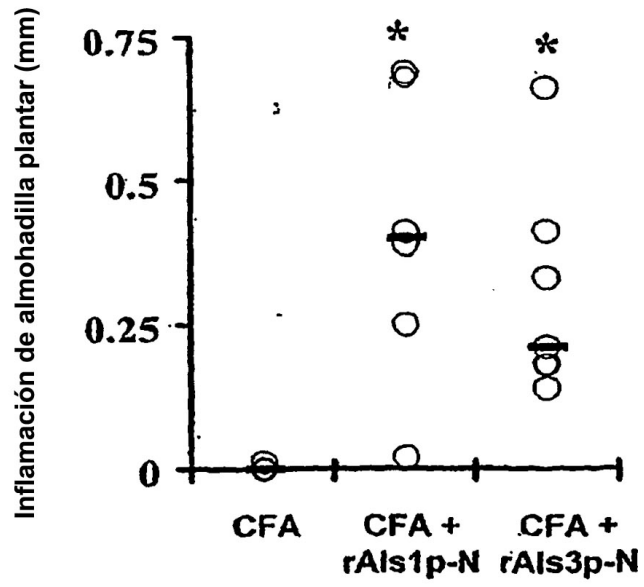


FIGURA 33

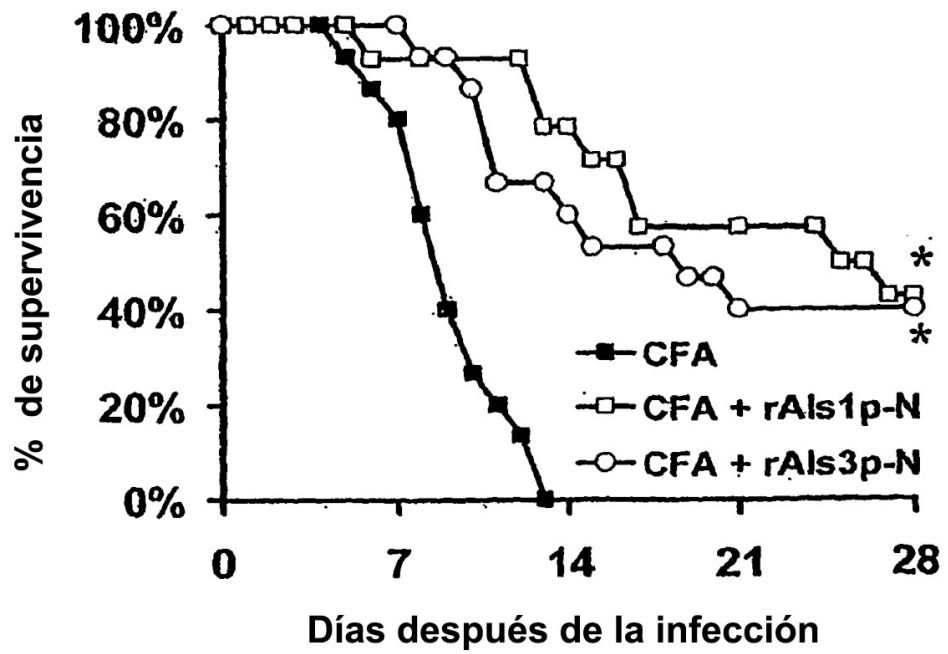


FIGURA 34

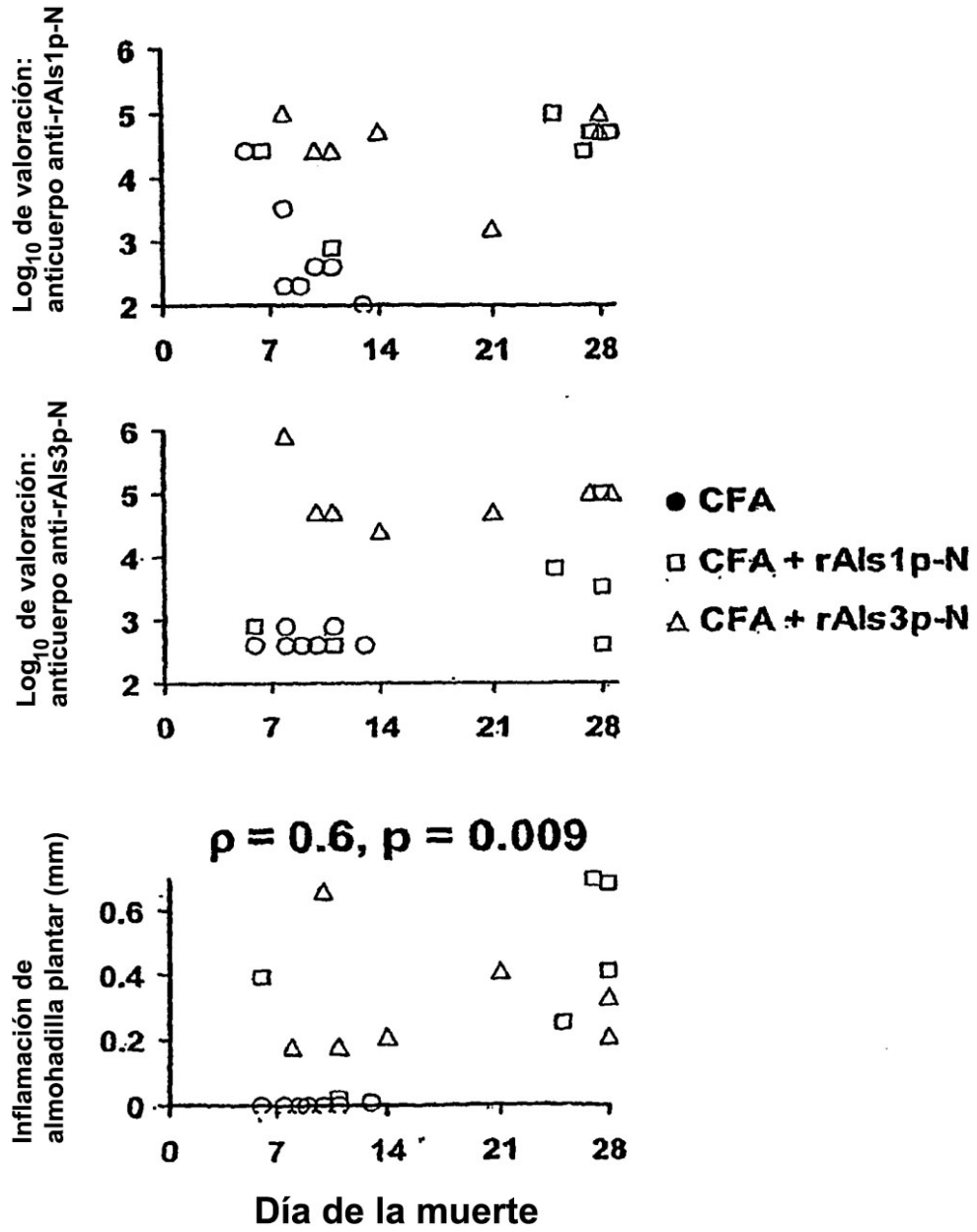


FIGURA 35

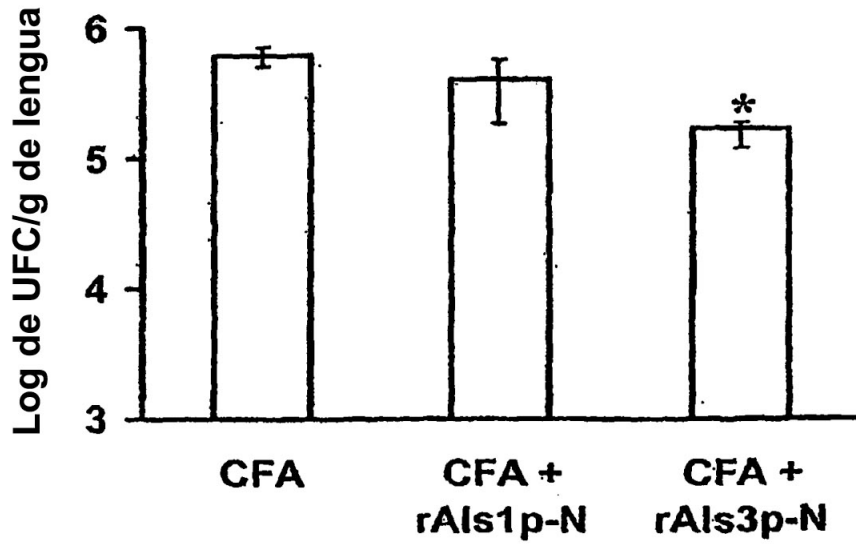


FIGURA 36

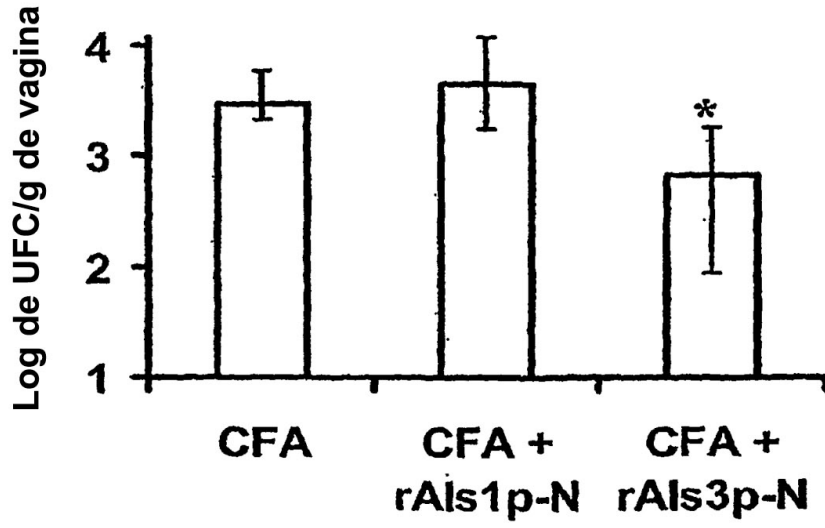


FIGURA 37