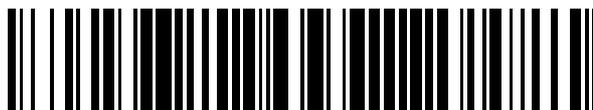


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 957**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/60** (2006.01)

**C12N 15/57** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 38/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08802426 .0**

96 Fecha de presentación: **19.09.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2201109**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.2010**

54 Título: **Aspartil-proteinasa secretora 2 truncada**

30 Prioridad:

**19.09.2007 EP 07018420**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

**17.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**17.12.2012**

73 Titular/es:

**PEVION BIOTECH LTD. (50.0%)  
WORBLENTALSTRASSE 32  
3063 ITTIGEN / BERN, CH y  
ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ZURBRIGGEN, RINALDO;  
DE BERNARDIS, FLAVIA;  
CASSONE, ANTONIO y  
RASI, SILVIA**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

ES 2 392 957 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

Aspartil-proteinasa secretora 2 truncada.

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a una forma truncada de la aspartil-proteinasa secretora 2 (Sap2), así como a moléculas de ácido nucleico que codifican para la misma. Este polipéptido Sap2 truncada (tSap2) es sorprendentemente estable, tiene una completa inmunogenicidad tras su administración intravaginal y confiere una completa protección frente a una exposición intravaginal del hongo *Candida*. La presente invención se refiere además a composiciones que comprenden tSap2 y al uso de tSap2 en la preparación de tales composiciones.

**Antecedentes de la invención**

10 Las infecciones provocadas por *Candida albicans* y otras especies fúngicas relacionadas continúan teniendo una prevalencia sostenida en todo el mundo (Nyirijesy American Family Physician (2001) 63: 697-702). El amplio espectro de la candidiasis y su reconocida importancia clínica ha estimulado el interés por entender los diversos componentes fúngicos y de huésped implicados en la patogénesis de estas enfermedades. *C. albicans* es una bacteria comensal de ser humano y su interacción con el sistema inmunitario del huésped desempeña un papel importante tanto en el comensalismo como en el control de la infección. Se han investigado varias posibles dianas antigénicas de la respuesta del huésped frente a *C. albicans* con el objetivo final de generar herramientas inmunológicas para luchar contra la candidiasis. Las dianas antigénicas más investigadas incluyen manoproteínas (MP), algunas con funciones de tipo adhesivo o similar a receptor, proteínas de choque térmico, enolasa y aspartil-proteinasa secretoras (Sap) (Schaller *et al.*, J. of Invet. Dermatology (2000) 114: 712-717). Junto con los últimos avances en los mecanismos de respuestas inmunitarias anti-cándidas, estos estudios han establecido las bases para investigaciones adicionales del uso seleccionado de algunas de las dianas anteriores como posibles vacunas terapéuticas o preventivas o para producir anticuerpos para la vacunación pasiva.

25 Anteriormente se ha encontrado que la expresión de un miembro de la familia de Sap de *C. albicans*, Sap2, se requiere de manera crítica para la infección, y que la inmunización intravaginal o incluso intranasal con Sap2 de tipo natural de longitud completa confería un grado elevado de protección frente a infección por *Candida* (de Bernardis, Infect and Imm. (2002) 70, 2725-2729). Sin embargo, se mostró que la proteína Sap2 de tipo natural era enzimáticamente activa, muy inestable, y dotada de posible toxicidad (Schaller *et al.*, Infect and Imm (2003), 71, 3227-3234) haciendo que sea una mala elección para una vacuna.

30 Por tanto, existe una necesidad en la técnica de un antígeno de Sap2 que pueda provocar respuestas inmunitarias celulares y de anticuerpos eficaces frente a *C. albicans* sin tener los inconvenientes de la Sap2 de tipo natural de longitud completa asociados al mismo.

**Resumen de la invención**

35 La presente invención cumple esta necesidad proporcionando un polipéptido Sap2 truncada (tSap2). La tSap2 según la presente invención es sorprendentemente estable, tiene una fuerte inmunogenicidad tras la administración intravaginal y confiere completa protección frente a una exposición intravaginal del hongo *Candida*.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un polipéptido que consiste en cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos:

(a) la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1; y

40 (b) una secuencia de aminoácidos que es un fragmento de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, en el que dicha secuencia de aminoácidos tiene al menos 15 aminoácidos de longitud, y en el que dicha secuencia de aminoácidos define un polipéptido que muestra una antigenicidad equivalente al polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polinucleótido que consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada de las siguientes:

45 (a) la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 2;

(b) una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia de (a);

(c) una secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1; y

50 (d) una secuencia de ácido nucleico que es un fragmento de la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 2, en el que dicha secuencia de ácido nucleico tiene al menos 45 nucleótidos de longitud, y en el que dicha secuencia de ácido nucleico codifica para un polipéptido que muestra una antigenicidad equivalente al polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un vector que comprende el polinucleótido según la invención. Además, la presente invención se refiere a una célula huésped que comprende dicho vector.

5 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende al menos uno de los polipéptidos según la invención y/o al menos uno de los polinucleótidos según la invención. En una realización preferida, esta composición es una composición de vacuna. Además, la composición según la invención puede comprender uno o más componentes adicionales seleccionados de excipientes, diluyentes, adyuvantes, virosomas o similares.

10 En aún otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del polipéptido según la invención como inmunógeno y/o antígeno. En una realización preferida, el polipéptido según la invención se usa en una composición de vacuna. Además, la presente invención se refiere al uso de al menos uno de los polipéptidos y/o al menos uno de los polinucleótidos según la invención para preparar una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de una infección por *Candida*. Preferiblemente, la infección por *Candida* es una infección por *Candida albicans*.

15 Los usos según la invención pueden implicar el uso de uno o más componentes adicionales seleccionados de excipientes, diluyentes, adyuvantes, vehículos de suministro o similares. En una realización preferida, el vehículo de suministro es un virosoma. Si se usa un virosoma como vehículo de suministro, el polipéptido y/o polinucleótido según la invención puede estar unido a la superficie del virosoma. Alternativa o adicionalmente, el polipéptido y/o polinucleótido puede estar contenido en el lumen del virosoma. Una alternativa adicional es el uso del polipéptido y/o polinucleótido según la invención junto con un virosoma, en el que el virosoma se usa como componente individual.

20 En una realización preferida, la infección por *Candida* es mucosa y/o sistémica. En otra realización preferida, la infección por *Candida* es mucosa y la enfermedad provocada por dicha infección se selecciona de candidiasis vulvovaginal o esofágica.

25 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un kit que comprende al menos uno de los polipéptidos y/o al menos uno de los polinucleótidos según la invención. En una realización preferida, el kit es para el diagnóstico *in vitro* de una infección por *Candida*. Preferiblemente, la infección por *Candida* es una infección por *Candida albicans*. El kit según la invención puede comprender además un reactivo para detectar complejos que incluyen el polipéptido. Preferiblemente, la detección se realiza mediante un ensayo seleccionado del grupo que consiste en ensayos inmunohistoquímicos, ELISA, RIA, análisis de inmunotransferencia tipo Western, análisis de FACS, un ensayo de inmunofluorescencia y un inmunoensayo de emisión de luz.

### Breve descripción de los dibujos

30 La figura 1 demuestra que la preparación de Sap2 truncada (tSap2) es mucho más estable que la Sap2 de tipo natural enzimáticamente activa. Se incubaron en PBS 3 µg (para SDS-PAGE) o 0,3 µg (para inmunotransferencia tipo Western) de Sap2 y tSap2 expresadas de manera recombinante durante diferentes periodos de tiempo (de 30 min. a 24 ó 48 horas), o bien a temperatura ambiente o bien a 37°C. Tras la incubación, se sometieron ambas preparaciones a SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie. Figura 1A: SDS-PAGE de tSap2 teñida con azul de Coomassie a temperatura ambiente (izquierda) y 37°C (derecha). Figura 1B: SDS-PAGE de Sap2 teñida con azul de Coomassie a temperatura ambiente (izquierda) y 37°C (derecha). Figura 1C: inmunotransferencia tipo Western de tSAP2 con anticuerpo policlonal anti-Sap2.

40 La figura 2 demuestra que la Sap2 truncada (tSap2) induce niveles de anticuerpo superiores a la Sap 2 de tipo natural enzimáticamente activa (Sap2) en fluidos vaginales de ratas inmunizadas. El aumento en la producción de anticuerpos se observa principalmente para IgA, la principal inmunoglobulina implicada en la inmunidad mucosa. Los niveles de anticuerpo se midieron en combinaciones de fluidos vaginales de ratas inmunizadas con una preparación de Sap2 de tipo natural y ratas inmunizadas con Sap2 recombinante, truncada (tSap2) mediante ELISA. La presencia de anticuerpo en los fluidos vaginales se expresa en cuanto a absorbancia, que se leyó a  $\lambda=405$  nm.

45 La figura 3 muestra que la inmunización de ratas con la proteína truncada (tSap2) resuelve la infección vaginal por *C. albicans* más rápido que el tratamiento con la proteína de tipo natural (Sap2) en un modelo de exposición de animales. Dos grupos de cinco ratas hembra ovariectomizadas se inmunizaron por vía intravaginal tres veces a intervalos semanales: un grupo recibió 100 µg/dosis de Sap2 de tipo natural (-■-), mientras que el segundo grupo recibió 50 µg/dosis de Sap2 truncada (-▲-). Una semana tras la última inmunización se sometieron todas las ratas a exposición con una dosis vaginopática de la cepa SA-40 de *C. albicans*. Se evaluó el aclaramiento de las células fúngicas de las ratas tratadas contando las unidades formadoras de colonias (UFC) de *C. albicans* en la vagina durante 21 días tras la exposición. En particular, se contaron las células de levadura cultivando muestras de 1 µl de fluido vaginal sobre agar de Sabouraud que contenía cloramfenicol, a 28°C durante 72 horas.

50 La figura 4 muestra que las formulaciones basadas en virosoma que contienen la proteína Sap2 truncada inducen niveles superiores de IgG e IgA anti-Sap2 a la proteína truncada sola en la vagina de ratas inmunizadas. Se evaluaron los niveles de anticuerpo mediante ELISA realizada en combinaciones de fluidos vaginales de ratas tratadas con diferentes preparaciones. La presencia de anticuerpo en los fluidos vaginales se expresa en cuanto a absorbancia, que se leyó a  $\lambda = 405$  nm.

La figura 5 demuestra que la proteína truncada unida a virosomas proporciona una tasa superior de aclaramiento de la infección en comparación con la proteína truncada sola, en la vagina de ratas infectadas. Se midió la tasa de aclaramiento monitorizando el estado de la infección vaginal en ratas inmunizadas y expuestas a lo largo del tiempo. Se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) 1, 2, 7, 13, 21 y 28 días tras la exposición.

5 La figura 6 muestra que la proteína truncada asociada a los virosomas proporciona una tasa superior de aclaramiento de la infección a la proteína sola. La adición del adyuvante mucoso HLT (toxina termolábil de *E. coli*) a la formulación basada en virosoma no confiere ninguna ventaja en cuanto a protección. Se monitorizó el transcurso de la infección vaginal durante 28 días.

10 La figura 7 muestra el efecto de la administración intravaginal de anticuerpos monoclonales (AcM) dirigidos contra tSap2 (NL2/2A8 y NL2/9b9). Un anticuerpo irrelevante, de isotipo coincidente (AcM anti-enolasa; NL2/7C9) así como la cepa SA40 de *C. albicans* sirvieron como control. Se comprobó la especificidad de cada AcM mediante inmunotransferencia tipo Western, y todos los AcM se usaron a concentraciones de proteína idénticas en una única administración intravaginal 30 min. antes de la exposición. Ambos AcM anti-tSap2 (NL2/2A8 y NL2/9B9) confirieron protección a las ratas, induciendo un aclaramiento muy rápido de células fúngicas de la vagina en comparación con los controles, concretamente, las ratas que sólo recibieron células de *C. albicans* o el AcM anti-enolasa. En las condiciones ensayadas, el efecto de AcM anti-Sap2 fue sustancialmente comparable con el obtenido con fluconazol, un fármaco antifúngico popular, o con pepstatina, un inhibidor de Sap bien conocido.

### Descripción detallada de la invención

#### Definiciones

20 Los aminoácidos y residuos de aminoácidos descritos en el presente documento pueden denominarse según el código de una o de tres letras aceptado al que se hace referencia en libros de texto bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como Stryer, Biochemistry, 4ª Ed., Freeman and Co., Nueva York, 1995 y Creighton, Proteins, 2ª Ed. Freeman and Co., Nueva York, 1993. Tal como se usan en el presente documento, los términos "péptido" y "polipéptido" se usan de manera sinónima y en su sentido más amplio para referirse a una molécula de dos o más residuos de aminoácidos, o análogos de aminoácidos. Los residuos de aminoácidos pueden estar unidos mediante enlaces peptídicos, o alternativamente mediante otros enlaces, por ejemplo éster, éter. etc. Tal como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" o "residuo de aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, incluyendo ambas de las formas enantioméricas D o L, y análogos de aminoácidos.

30 Los términos "tSap2", "polipéptido tSap2", y "proteína tSap2" se usan de manera intercambiable y significan una forma truncada de la proteína Sap2 de tipo natural, en la que se han delecionado los 76 aminoácidos N-terminales. Los términos "Sap2", "polipéptido/proteína Sap2", "Sap2 de tipo natural (wt)" y "polipéptido/proteína Sap2 de tipo natural" se usan de manera intercambiable y se refieren a Sap2 nativa, de longitud completa, tal como se muestra en SEQ ID NO: 3. La Sap2 de tipo natural consiste en 398 aminoácidos, de los cuales los 56 primeros aminoácidos (1-56) codifican para una secuencia pre-pro, y los aminoácidos restantes (57-398) codifican para la forma madura de Sap2.

40 Las "identidades de secuencia" de polipéptidos y polinucleótidos relacionados pueden determinarse por medio de procedimientos conocidos. Como norma, se usan programas informáticos especiales con algoritmos que tienen en cuenta los requisitos especiales. Para los fines de la presente invención, el programa informático usado para la determinación de la identidad entre dos secuencias es BLASTP (para la comparación de secuencias de aminoácidos) y BLASTN (para la comparación de secuencias de nucleótidos), tal como se describe por ejemplo por Altschul S *et al.*, Nucl Acid Res 25: 3389-3402 (1997). Los programas BLAST pueden obtenerse del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) y de otras fuentes (por ejemplo BLAST Handbook, Altschul S *et al.*, NCB NLM NIH Bethesda MD 20894; Altschul S *et al.*, J. Mol. 215: 403-410 (1990)). Para los fines de la presente invención, se usa el algoritmo de BLASTN y BLASTP con las siguientes configuraciones por defecto:

45 BLASTN

Parámetros de puntuación: Puntuaciones por apareamiento/apareamiento erróneo 1, -2

Costes por hueco: Existencia: 5, Extensión: 2

Filtros y enmascaramiento: Regiones de baja complejidad seleccionadas

Repeticiones específicas de especie para: seleccionado (ser humano)

50 Enmascaramiento sólo para la tabla de consulta seleccionado

Enmascaramiento de letras en minúsculas no seleccionado

BLASTP

Parámetros de puntuación:

Matriz: BLOSUM62

Costes de hueco: Existencia: 11, Extensión: 1

Ajustes de composición: Estadística basada en la composición

Filtros y enmascaramiento: Ninguno seleccionado.

5

Opciones avanzadas del programa

-G Coste por abrir un hueco [número entero]

defecto = 5 para nucleótidos; 11 proteínas

-E Coste por extender un hueco [número entero]

10 defecto = 2 nucleótidos; 1 proteínas

-q Penalización por apareamiento erróneo de nucleótido [número entero]

defecto = -3

-r recompensa por apareamiento de nucleótido [número entero]

defecto = 1

15 -e valor esperado [número real]

defecto = 10

-W tamaño de palabra [número entero]

defecto = 11 nucleótidos; 3 proteínas

-y Disminución (X) para extensiones de BLAST en bits (por defecto si es cero)

20 defecto = 20 para BLASTN; 7 para otros programas

-X Valor de disminución de X para alineación con huecos (en bits)

defecto = 15 para todos los programas excepto para BLASTN para el cual no se aplica

-Z Valor de disminución de X final para alineación con huecos (en bits)

50 para BALSTN; 25 para otros programas

25 Para la comparación de secuencias, se usan las secuencias de tSap2 completa (SEQ ID NO 1 y 2, respectivamente) como la secuencia con la cual se compara una secuencia relacionada. Específicamente, para determinar la identidad de un polipéptido con homología desconocida con respecto al polipéptido tSap2 según la invención, se compara la secuencia de aminoácidos de dicho primer polipéptido con la secuencia de aminoácidos del polipéptido tSap2 mostrada en SEQ ID NO: 1, a lo largo de la longitud completa de SEQ ID NO: 1. De manera similar, para  
30 determinar la identidad de un polinucleótido con homología desconocida con respecto al polinucleótido tSap2 según la invención, se compara la secuencia de ácido nucleico de dicho primer polinucleótido con la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 2, a lo largo de la longitud completa de SEQ ID NO: 2.

35 Se dan a conocer "condiciones de alta rigurosidad" convencionales para la hibridación en Ausubel *et al.* (Eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (2000). Las condiciones de hibridación de alta rigurosidad a modo de ejemplo incluyen lavados con 0,1 x SSC/SDS al 0,1% durante 15 min. a 68°C.

40 Un polipéptido se considera "funcionalmente equivalente" al polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 si tiene esencialmente las mismas características que el polipéptido tSap2 de SEQ ID NO: 1. "Esencialmente las mismas características" significa que al menos una de las propiedades que pueden asignarse a tSap2 (tales como una estabilidad mejorada o una antigenicidad aumentada en comparación con Sap2 de tipo natural) también se presenta por el polipéptido funcionalmente equivalente. La estabilidad del polipéptido puede determinarse incubando el polipéptido durante diferentes periodos de tiempo y después tiñendo el polipéptido con azul de Coomassie (véase el ejemplo 1, figura 1). La estabilidad está "mejorada" en comparación con la estabilidad de la Sap2 de tipo natural si el polipéptido funcionalmente equivalente sigue pudiendo detectarse durante un periodo de tiempo mayor o si está presente en mayores cantidades tras el mismo periodo de tiempo que la Sap2  
45 de tipo natural. La antigenicidad del polipéptido puede determinarse midiendo el título de anticuerpos provocados

mediante inmunización de animales, tales como en el modelo de rata de infección vaginal por *Candida* (véanse los ejemplos 4 y 5). La antigenicidad está “mejorada” en comparación con la antigenicidad de la Sap2 de tipo natural si el polipéptido funcionalmente equivalente provoca títulos de IgA o IgG superiores a la Sap2 de tipo natural (véase la figura 2).

5 Los aminoácidos individuales del polipéptido tSap2 pueden sustituirse de manera conservativa por aminoácidos de tamaño, carga y/o polaridad equivalentes. Además, puede añadirse un ligador adecuado, o etiquetas (tales como la etiqueta de HIS) a cualquier extremo del polipéptido tSap2 con el fin de facilitar su incorporación en vehículos de suministro y/o su fusión con antígenos diana y/o para facilitar su purificación y/o detección.

10 El término “epítipo” tal como se usa en el presente documento, se refiere a aquellas partes de una molécula que se reconocen por receptores de células T y/o células B. El término “antígeno” se usa en el presente documento para describir una molécula que se une a un anticuerpo o a un receptor de células T y cuya inmunogenicidad puede aumentarse o potenciarse mediante los adyuvantes dados a conocer en el presente documento.

15 El término “adyuvante” se refiere a una sustancia distinta del antígeno diana que puede aumentar o potenciar la activación de células efectoras inmunitarias. El término “sistemas adyuvantes” se usa en el presente documento para indicar la combinación de diversas proteínas inmunoestimulantes, tales como el polipéptido tSap2 de la presente invención, con adyuvantes tales como CT o HLT, para aumentar el efecto inmunoestimulante que ejercería cada componente del sistema si se usara por sí solo, así como su combinación con un sistema de suministro adecuado, tal como virosomas, que puede aumentar adicionalmente el efecto inmunoestimulante de las composiciones.

20 Por “administración” o “administrar” quiere decirse proporcionar uno o más polipéptidos tSap2 o composiciones que contienen proteína de la invención como fármaco, profármaco, metabolito de fármaco o vacuna a un individuo que lo necesita. Una vacuna es una preparación antigénica usada para establecer inmunidad frente a una enfermedad. Una preparación de vacuna contiene habitualmente un antígeno que consiste en microorganismos completos que provocan enfermedad (muertos o debilitados) o partes de tales microorganismos (por ejemplo el ADN o la proteína antigénica) y se usa para conferir inmunidad frente a la enfermedad que provocan dichos microorganismos. Las preparaciones de vacuna pueden ser naturales, sintéticas o derivadas mediante tecnología de ADN recombinante. Las vacunas pueden ser profilácticas (por ejemplo para prevenir o mejorar los efectos de una futura infección por cualquier patógeno natural) o terapéuticas.

30 Una “cantidad eficaz” es la cantidad de una preparación farmacéutica que sola, o junto con dosis adicionales, estimula la respuesta deseada.

35 Tal como se usa en el presente documento el término “virosoma” se refiere a una vesícula producida mediante un procedimiento *in vitro* que está compuesta por lípidos y al menos una proteína de la envuelta viral. Los lípidos o bien se derivan de origen biológico (por ejemplo huevos, plantas, animales, cultivos celulares, bacterias, virus) o bien se producen sintéticamente (síntesis química). Un virosoma puede tener una envuelta viral reconstituida que puede derivarse de una variedad de virus y que carece de las nucleocápsides infecciosas y el material genético del virus original, por ejemplo un virosoma de influenza reconstituido inmunopotenciador (IRIV). Por tanto, un virosoma es un tipo especial de vesícula lipídica que comprende, en su membrana lipídica, al menos una proteína de la envuelta viral. Tal como se usa en el presente documento, el término “proteína de la envuelta viral” se refiere a cualquier proteína codificada por un virus con envuelta a partir del cual se deriva parcial o completamente el virosoma de la invención y que está presente en la membrana lipídica del virosoma. Las proteínas de la envuelta viral funcionan algunas veces como “proteínas de fusión viral”, cuando desempeñan un papel en la fusión de virus o virosomas con membranas celulares diana. La(s) proteína(s) de la envuelta puede(n) ser proteínas recombinantes, siempre que las propiedades bioquímicas de la proteína permitan su unión física a una membrana lipídica. Estas proteínas de la envuelta justifican la funcionalidad del virosoma. El virosoma usado en la presente invención también puede ser un virosoma quimérico, lo que significa que contiene proteínas de la envuelta viral de al menos dos cepas de virus diferentes. Al contrario que los sistemas virales, los virosomas son seguros, ya que se ha eliminado la nucleocápside infecciosa del virus.

#### Polipéptidos

50 La presente invención proporciona polipéptidos Sap2 truncada (tSap2) que consisten en cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos:

(a) la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1; y

55 (b) una secuencia de aminoácidos que es un fragmento de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, en el que dicha secuencia de aminoácidos tiene al menos 15 aminoácidos de longitud, y en el que dicha secuencia de aminoácidos define un polipéptido que muestra una antigenicidad equivalente al polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1.

En una realización preferida, la secuencia de aminoácidos de (b) tiene una longitud mínima de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 150, 200, 250 ó 300 aminoácidos.

Polinucleótidos

La presente invención proporciona además un polinucleótido que codifica para el polipéptido Sap2 truncado (tSap2) que consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada de las siguientes:

- (a) la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 2;
- 5 (b) una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia de (a);
- (c) una secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1; y
- (d) una secuencia de ácido nucleico que es un fragmento de la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 2, en el que dicha secuencia de ácido nucleico tiene al menos 45 nucleótidos de longitud, y en el que dicha secuencia de ácido nucleico codifica para un polipéptido que muestra una antigenicidad equivalente al polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1.
- 10

En una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico de (d) tiene una longitud mínima de 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 300, 450, 600, 750 ó 900 nucleótidos.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un vector que comprende el polinucleótido según la invención. Además, la presente invención se refiere a una célula huésped que comprende dicho vector.

15 Composiciones y usos

Además, la presente invención se refiere a una composición que comprende al menos uno de los polipéptidos según la invención y/o al menos uno de los polinucleótidos según la invención. En una realización preferida, esta composición es una composición de vacuna. Además, la composición según la invención puede comprender uno o más componentes adicionales seleccionados de excipientes, diluyentes, adyuvantes, virosomas o similares.

- 20 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del polipéptido según la invención como inmunógeno y/o antígeno. En una realización preferida, el polipéptido según la invención se usa en una composición de vacuna. Además, la presente invención se refiere al uso de al menos uno de los polipéptidos y/o al menos uno de los polinucleótidos según la invención para preparar una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de una infección por *Candida*. Preferiblemente, la infección por *Candida* es una infección por *Candida albicans*.

- 25 Los usos según la invención pueden implicar el uso de uno o más componentes adicionales seleccionados de excipientes, diluyentes, adyuvantes, vehículos de suministro o similares. En una realización preferida, el vehículo de suministro es un virosoma. Si se usa un virosoma, el polipéptido y/o polinucleótido según la invención puede estar unido a la superficie del virosoma. Alternativa o adicionalmente, el polipéptido y/o polinucleótido puede estar contenido en el lumen del virosoma. Una alternativa adicional es el uso del polipéptido y/o polinucleótido según la invención junto con un virosoma, en el que el virosoma se usa como un componente individual.
- 30

En una realización preferida, la infección por *Candida* es mucosa y/o sistémica. En otra realización preferida, la infección por *Candida* es mucosa y la enfermedad provocada por dicha infección se selecciona de candidiasis vulvovaginal o esofágica.

- 35 La presente invención proporciona una vacuna peptídica novedosa frente a la candidiasis que no lleva el riesgo o los efectos secundarios tóxicos asociados con el uso de Sap2 de tipo natural y que muestra una estabilidad aumentada en comparación con Sap2 de tipo natural, al tiempo que proporciona una potente estimulación de respuestas inmunitarias frente a infección por *C. albicans*. Se proporciona una forma truncada y estable de Sap2 que puede producirse de manera recombinante y supera las dificultades bien conocidas en la obtención, purificación y normalización del antígeno nativo (de Bernardis, *Infect and Imm.* 2002 70, 2725-2729). De manera conveniente, el polipéptido Sap2 novedoso que carece de los 76 primeros aminoácidos del extremo N-terminal de la forma de tipo natural, puede producirse en células procariontas o eucariotas como un producto recombinante, opcionalmente como una proteína con etiqueta de 6 histidinas (HIS) para la facilidad de su purificación. El polipéptido Sap2 truncado (tSap2) de la presente invención es muy estable. Esta tSap2 recombinante es altamente reactiva en inmunotransferencias tipo Western con un anticuerpo monoclonal generado contra la Sap2 nativa, así como con anticuerpos anti-Sap presentes en sueros humanos de pacientes infectados. Además, anticuerpos monoclonales generados contra tSap2 reconocen a la enzima de tipo natural.
- 40
- 45

- 50 La inmunización con tSap2 confiere protección mediada por anticuerpos frente a infección por *C. albicans* en un modelo experimental de vaginitis de rata. La presente invención muestra que los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el polipéptido tSap2 proporcionan protección pasiva frente a la exposición vaginal con el hongo (figura 7). Por tanto, la presente invención proporciona herramientas novedosas para la protección activa y pasiva frente a una infección en mujeres muy común, con frecuencia crónica y algunas veces que no responde al tratamiento antimicótico.

Para potenciar adicionalmente el efecto inmunoestimulante del polipéptido tSap2 de la presente invención, las composiciones pueden comprender polipéptido tSap2 y uno o más adyuvantes.

Alternativamente, el polipéptido tSap2 puede acoplarse a la superficie de vehículos de suministro, tales como virosomas, mediante los métodos dados a conocer en el presente documento. Alternativamente, el polipéptido tSap2 puede encapsularse en vehículos de suministro mediante métodos dados a conocer en el presente documento. Como alternativa, el polipéptido tSap2 puede tanto encapsularse en como unirse a la superficie de los vehículos de suministro. Además, la composición que comprende el polipéptido tSap2 acoplado al, o capsulado en el, o encapsulado en el y unido a la superficie del vehículo de suministro puede contener adicionalmente uno o más adyuvantes.

El adyuvante puede seleccionarse de adyuvante de Freund (completo e incompleto), micobacterias tales como BCG, *M. vaccae*, o *Corynebacterium parvum*, toxina del cólera o toxina del tétano, toxina termolábil de *E. coli*, mezclas de quil-saponina tales como QS-21 (SmithKline Beecham), MF59 (Chiron) y diversas emulsiones de aceite/agua (por ejemplo IDEC-AF), MALP-2, ISCOM. Otros adyuvantes que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a: sales minerales o geles minerales tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y fosfato de calcio; sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, hemocianinas de lapa californiana y dinitrofenol, moléculas inmunoestimulantes, tales como saponinas, dipéptidos de muramilo y derivados tripeptídicos, tramos de ácido nucleico cortos tales como dinucleótidos CpG, oligonucleótidos CpG, monofosforil-lípido A y polifosfacenos, adyuvantes particulados y microparticulados, tales como emulsiones, liposomas, virosomas, cocleatos, o adyuvantes del complejo inmunoestimulante. Las citocinas también son útiles debido a sus propiedades estimulantes de linfocitos. Un experto habitual en la técnica conocerá muchas citocinas útiles para tales fines, incluyendo interleucina 2 (IL-2), IL-12, GM-CSF y muchas otras. Además son adecuados ligandos de la familia de quimiocina, tales como RANTES, una lipoproteína, un lipopéptido, un componente de pared celular de levadura, un ARN bicatenario, un lipopolisacárido (LPS) de superficie de célula bacteriana, flagelina, un ARN viral monocatenario rico en U, un ARN de interferencia pequeño supresor de la señalización de citocina 6f (ARNip de SOCS), un epítipo Pan DR (PADRE) y mezclas de los mismos.

El polipéptido tSap2 de la presente invención puede producirse mediante síntesis química, o puede ser de origen recombinante. El polipéptido tSap2 puede producirse de manera recombinante usando una molécula de ácido nucleico que codifica para la proteína. Además, su secuencia puede modificarse siempre que conserve la capacidad para estimular las respuestas inmunitarias frente a *C. albicans* dadas a conocer en el presente documento.

Además, la invención abarca variantes funcionales del polipéptido tSap2. Tal como se usa en el presente documento, una "variante funcional" o "variante" del polipéptido tSap2 es una proteína que contiene una o más modificaciones con respecto a la secuencia de aminoácidos primaria del polipéptido tSap2 inmunoestimulante al tiempo que conserva el efecto inmunoestimulante dado a conocer en el presente documento. Si una variante funcional del polipéptido tSap2 implica una sustitución de aminoácido, normalmente se preferirán sustituciones de aminoácidos conservativas, es decir, sustituciones que conservan una propiedad del aminoácido original tal como carga, hidrofobicidad, conformación, etc. Los ejemplos de sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen sustituciones realizadas entre aminoácidos dentro de los siguientes grupos: (1) M, I, L, V; (2) F, Y, W; (3) K, R, H; (4) A, G; (5) S, T; (6) Q, N y (7) E, D.

Pueden realizarse modificaciones que generan variantes funcionales del polipéptido tSap2 con el fin de potenciar la estabilidad de la proteína en un sistema de expresión, para potenciar la estabilidad de la unión proteína-proteína tal como unión HLA-péptido, o para aumentar la avidéz de receptores inmunitarios. Puede emplearse cualquier método para preparar proteínas modificadas o variantes, tal como síntesis de la proteína modificada o variante o su producción recombinante usando una molécula de ácido nucleico mutada.

La identificación de polipéptidos tSap2 inmunoestimulantes adicionales u optimizados también puede incluir la etapa de comparar la estimulación de células T o B mediante el polipéptido tSap2 y la estimulación de células T o B mediante la variante funcional como determinación de la eficacia de la estimulación de células efectoras inmunitarias mediante la variante funcional. Comparando la variante funcional del polipéptido tSap2 con un polipéptido tSap2 conocido pueden prepararse proteínas con propiedades estimulantes de células inmunitarias aumentadas.

El polipéptido tSap2 individual también puede tener uno o más aminoácidos añadidos a cualquiera de, o a ambos extremos. Por tanto, por ejemplo, pueden añadirse aminoácidos ligadores o separadores al extremo N o C-terminal de la proteína o a ambos, para permitir un acoplamiento conveniente de los péptidos a un vehículo de suministro tal como un virosoma. En algunos casos, puede ser deseable añadir una etiqueta de histidina al polipéptido tSap2, para facilidad de la purificación y/o manipulación experimental.

La presente invención también demuestra que la combinación de virosomas como agentes de suministro inmunopotenciadores compatibles con seres humanos con el polipéptido tSap2 de la presente invención potencia la generación de respuestas inmunitarias eficaces frente a la candidiasis. Por tanto, la invención proporciona un polipéptido tSap2 novedoso cuya eficacia inmunogénica puede potenciarse adicionalmente mediante su combinación con un sistema de suministro inmunopotenciador y/o uno o más adyuvantes. Aunque los virosomas de influenza reconstituidos inmunopotenciadores (IRIV) están bien adecuados, también están disponibles varios otros vehículos de suministro, tales como liposomas, partículas de tipo virus, péptidos de antígenos múltiples (MAP) y similares para un experto en la técnica. Los virosomas consisten en partículas de tipo virus esféricas, unilaminares preparadas a partir de una mezcla de fosfolípidos y glicoproteínas de la superficie del virus influenza, pero no

5 contienen ningún ácido nucleico viral. La glicoproteína de membrana hemaglutinina del virus influenza desempeña un papel clave en el modo de acción de virosomas. Este antígeno principal del virus influenza es un componente de inducción de fusión de membrana, lo que facilita el suministro de antígeno a células inmunocompetentes. Se sabe que los virosomas actúan como medios eficientes y altamente eficaces de potenciación de la respuesta inmunitaria con un excelente perfil de seguridad.

10 El sistema de suministro de virosoma de la invención potencia adicionalmente la respuesta inmunitaria frente a infecciones por *Candida* provocada por el polipéptido tSap2 de la presente invención. Los virosomas pueden cargarse además simultáneamente con varios epítomos de células B y células T diferentes (Polti-Frank, F. *et al.*, Clin. Exp. Immunol., 1999, 117, 496; Moreno, A. P. *et al.*, J. Immunol., 1993, 151: 489) incluyendo epítomos de células T cooperadoras universales (Kumar, A. *et al.*, J. Immunol. 1992, 148, 1499-1505) y otros epítomos conocidos por los expertos en la técnica.

15 Tal como se demuestra por los resultados mostrados en el presente documento, los virosomas tienen un enorme potencial en el diseño de sistemas de vacuna/adyuvante combinados. Además, se espera que las vacunas de proteína basadas en virosoma sean seguras, ya que las vacunas de proteína basadas en virosoma ya han mostrado un perfil de seguridad muy bueno en seres humanos (Glueck, R., Vaccine 1999, 17, 1782). La acción concertada del polipéptido tSap2 de la presente invención, opcionalmente combinado con un adyuvante tal como CT (toxina del cólera) o HLT (una proteína de superficie mucosa derivada de *E. coli*) junto con el uso de virosomas como sistema de suministro eficaz compatible con seres humanos, representa un avance significativo en el diseño de vacunas profilácticas así como terapéuticas frente a candidiasis, ya sea vaginal, esofágica o sistémica.

20 La presente invención también proporciona el uso de las composiciones inmunoestimulantes, tales como el polipéptido tSap2 en combinación con un adyuvante adecuado y/o virosomas o vehículos de suministro equivalentes en una formulación farmacéutica adecuada. Por consiguiente, pueden usarse uno o más polipéptidos o composiciones que contienen polipéptido de la invención para preparar una vacuna profiláctica o terapéutica para la administración a un individuo que lo necesita. Una vacuna de este tipo que contiene una o más de las  
25 composiciones que contienen polipéptido tSap2 de la presente invención, como principio activo principal o miembro, puede administrarse en una amplia variedad de formas farmacéuticas terapéutica/profiláctica en los vehículos convencionales para la administración tópica, mucosa (nasal, vaginal, oral), sistémica, local y parenteral. Por tanto, la invención proporciona composiciones para su administración parenteral que comprenden una disolución del polipéptido tSap2 opcionalmente en combinación con un adyuvante adecuado y/o virosomas o vehículos de  
30 suministro equivalentes disueltos o suspendidos en un portador aceptable, preferiblemente un portador acuoso. Puede usarse una variedad de portadores acuosos, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3%, ácido hialurónico y similares. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas, o pueden esterilizarse por filtración. Las disoluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso como tales, o liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una  
35 disolución estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes tamponantes y de ajuste del pH, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitano, oleato de trietanolamina, entre muchos otros. Los expertos en la técnica conocerán métodos reales para preparar compuestos que pueden administrarse por vía parenteral, o resultarán evidentes para ellos, y se describen en más detalle, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy ("Remington's Pharmaceutical Sciences") Gennaro AR ed. 20ª edición, 2000: Williams & Wilkins PA, EE.UU., que se incorpora en el presente documento como referencia.

40 La vía y el régimen de administración variarán dependiendo de la fase o la gravedad del estado que va a tratarse, y debe determinarse por el médico experto. Por ejemplo, el polipéptido tSap2 y las composiciones que lo contienen pueden usarse para preparar una composición farmacéutica que puede administrarse en forma subcutánea, intradérmica, o tópica o mucosa (vaginal, nasal) o intramuscular. En realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas según la invención pueden administrarse por vía intravaginal. Todas estas formas las conocen bien los expertos habituales en las técnicas farmacéuticas.

50 Ventajosamente, pueden administrarse formulaciones adecuadas de la presente invención por ejemplo en una dosis diaria que puede repetirse diaria, semanal o mensualmente. Además, pueden administrarse los compuestos de la presente invención, particularmente los que contienen virosomas o liposomas, en forma intravaginal o intranasal, o por medio de vías transdérmicas tal como conocen los expertos habituales en la técnica. Para administrarse en forma de un sistema de administración transdérmica, la administración de la dosificación será evidentemente  
55 continua en vez de intermitente a lo largo de todo el régimen de dosificación.

60 El polipéptido tSap2 y las composiciones que lo contienen de la presente invención pueden usarse para preparar una composición farmacéutica que comprende el principio activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable adaptado para la administración intravaginal. Las composiciones farmacéuticas intravaginales pueden estar, por ejemplo, en forma de una disolución, crema, pomada, gel, loción, espuma o formulación de aerosol adaptada para su aplicación a la mucosa. Habitualmente estas composiciones farmacéuticas intravaginales que contienen los compuestos de la presente invención incluyen aproximadamente del 0,005% al 5%

en peso del principio activo en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones profilácticas o terapéuticas de la presente invención son para la administración en preparaciones farmacéuticamente aceptables. Tales preparaciones pueden contener de manera rutinaria concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes tamponantes, conservantes, portadores compatibles, agentes inmunopotenciadores complementarios tales como adyuvantes y citocinas y opcionalmente otros agentes terapéuticos. Las preparaciones de la invención se administran en cantidades eficaces. Una cantidad eficaz es la cantidad de una preparación farmacéutica que sola, o junto con dosis adicionales, estimula la respuesta deseada. Generalmente, dosis de inmunógenos que oscilan entre 0,01 µg/kilogramo y 500 µg/kilogramo de peso corporal, dependiendo del modo de administración, se consideran eficaces. Se cree que el intervalo preferido es de entre 0,1 µg/kilogramo y 10 µg/kilogramo de peso corporal. La cantidad absoluta dependerá de una variedad de factores, incluyendo la composición seleccionada para la administración, si la administración es en una única dosis o en múltiples dosis, y parámetros del paciente individual incluyendo edad, estado físico, tamaño, peso y la fase de la enfermedad. Estos factores los conocen bien los expertos habituales en la técnica y pueden tratarse simplemente con experimentación de rutina.

El régimen de dosificación usando las composiciones de la presente invención se selecciona según una variedad de factores, incluyendo por ejemplo la especie, edad, peso y estado médico del paciente, la fase y la gravedad del estado que va a tratarse, y el compuesto particular de la misma empleado. Un médico de experiencia habitual puede determinar fácilmente y recetar la cantidad eficaz de la vacuna requerida para prevenir, contrarrestar o detener la progresión de una enfermedad infecciosa o maligna. La precisión óptima para lograr la concentración de fármaco con el intervalo que proporciona eficacia o bien sin toxicidad o bien con toxicidad aceptable requiere un régimen basado en la cinética de la disponibilidad del fármaco en los sitios diana. Este proceso implica una consideración de la distribución, el equilibrio y la eliminación del fármaco, y está dentro de la capacidad del médico experto.

En los usos de la presente invención, los compuestos descritos en detalle en el presente documento pueden formar el principio activo y normalmente se administran en mezcla con diluyentes o excipientes farmacéuticos adecuados seleccionados adecuadamente con respecto a la forma prevista de administración, es decir, comprimidos orales, cápsulas, elixires, jarabes y similares, y compatible con prácticas farmacéuticas convencionales. Por ejemplo, para la administración vaginal en forma de un comprimido o cápsula, el componente de vacuna activo puede combinarse con un portador inerte farmacéuticamente aceptable no tóxico tal como etanol, glicerol, agua y similares. Además, cuando se desea o es necesario, también pueden incorporarse en la mezcla aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes adecuados. Los aglutinantes adecuados incluyen, sin limitación, almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes usados en estas formas farmacéuticas incluyen, sin limitación, oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, aga, bentonita, goma xantana y similares.

Para la administración parenteral, se desean suspensiones y disoluciones estériles. Se emplean preparaciones isotónicas que generalmente contienen conservantes adecuados cuando se desea una administración intravenosa. Pueden mezclarse preparaciones intravaginales o intraesofágicas que contienen el componente farmacológico activo con una variedad de materiales portadores bien conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, alcoholes, gel de aloe vera, alantoína, glicerina, aceites de vitaminas A o E, aceite mineral, propionato de PPG2-miristilo, y similares, para formar, por ejemplo, disoluciones alcohólicas, limpiadores tópicos, cremas limpiadoras, geles, espumas y lociones, en formulaciones de crema o gel especialmente adecuadas para aplicaciones mucosas.

El polipéptido tSap2, las composiciones o la formulación del mismo de la presente invención pueden acoplarse a una clase de polímeros biodegradables útiles para lograr la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, poli(ácido láctico), poli(epsilon-caprolactona), poli(ácido hidroxibutírico), poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros en bloque entrecruzados o anfipáticos de hidrogeles. Generalmente, los sujetos pueden recibir una administración intravaginal de una cantidad eficaz del polipéptido tSap2 y composiciones o bien en combinación con vectores de suministro, tales como virosomas y/o adyuvantes adicionales, o bien por sí mismos. El polipéptido tSap2 de la presente invención también puede usarse para preparar una composición farmacéutica que puede administrarse en forma de sistemas de suministro de liposomas, tales como vesículas unilaminares pequeñas, vesículas unilaminares grandes y vesículas multilaminares. Los liposomas pueden formarse a partir de una variedad de compuestos, incluyendo por ejemplo colesterol, estearilamina y diversas fosfatidilcolinas.

Las dosis iniciales pueden ir seguidas por dosis de refuerzo, siguiendo protocolos de inmunización convencionales en la técnica. El efecto inmunoestimulante de las composiciones y los métodos de la presente invención pueden aumentarse adicionalmente combinando cualquiera de las composiciones de polipéptido tSap2 mencionadas anteriormente, incluyendo su combinación con virosomas, con un compuesto potenciador de la respuesta inmunitaria. Los compuestos potenciadores de la respuesta inmunitaria se clasifican o bien como adyuvantes o bien como citocinas. Los adyuvantes pueden potenciar la respuesta inmunológica proporcionando un depósito de antígeno (extracelularmente o dentro de macrófagos), activando macrófagos y estimulando conjuntos específicos de linfocitos.

En el caso de usar el polipéptido según la invención para preparar una composición farmacéutica para tratar una enfermedad infecciosa, tal como candidiasis, la respuesta deseada es controlar la infección y/o el aclaramiento del agente infeccioso del sistema. En el caso de la profilaxis, la respuesta deseada es la inmunidad protectora frente al agente, medida mediante respuestas inmunitarias secundarias tras la exposición al agente o a un antígeno del mismo. Estas respuestas deseadas pueden monitorizarse mediante métodos de rutina o pueden monitorizarse según métodos de diagnóstico de la invención comentados en el presente documento. El alcance de la presente invención no debe limitarse por las realizaciones específicas descritas en el presente documento. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las descritas en el presente documento resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior, así como de los ejemplos. Se pretende que tales modificaciones se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor la invención reivindicada. En la medida en que se mencionan materiales específicos, esto es simplemente con fines de ilustración y no se pretende que limiten la invención. A menos que se especifique lo contrario, se usan procedimientos bioquímicos y de biología molecular, tales como los expuestos en Voet, Biochemistry, Wiley, 1990; Stryer 1995; Peptide Chemistry. A Practical Textbook, 2ª ed., Miklos Bodanszky, Springer-Verlag, Berlín, 1993; Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (2001), Ausubel *et al.* (Eds.) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (2000).

### Ejemplo 1: Materiales y métodos

#### 1.1 Microorganismos y condiciones de crecimiento

Se usó *C. albicans* ATCC20955 como fuente de ADN fúngico en este estudio. Se hizo crecer en Winge (extracto de levadura al 0,3%, glucosa al 0,2%, Difco). Se usó *Escherichia coli* M15 (nal<sup>S</sup>, str<sup>S</sup>, rif<sup>S</sup>, lac<sup>-</sup>, ara<sup>-</sup>, gal<sup>-</sup>, mtl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, recA<sup>+</sup>, uvr<sup>+</sup>, [pUHA1]) como cepas huésped para plásmidos recombinantes. Se hicieron crecer típicamente células *E. coli* en caldo LB (triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl 0,5, pH 7,00) o placas de LB (triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl al 0,5%, agar al 1,5%, pH 7,00) complementado cuando era necesario con ampicilina (50 mg ml<sup>-1</sup>), kanamicina (50 mg ml<sup>-1</sup>) (Boehringer). Para la vaginitis experimental se usó *C. albicans* SA-40 inicialmente aislado de la secreción vaginal de un sujeto con vaginitis aguda. Las modalidades de crecimiento fúngico, inducción y evaluación de infección vaginal experimental en ratas ovariectomizadas fueron tal como se describió anteriormente (Cassone A. *et al.*, Infect. Immun. (1995), 63: 2619-2624; De Bernardis F. *et al.*, Infect. Immun. (1997), 65: 3309-3405).

#### 1.2 Clonación de la secuencia codificante de SAP2

Para la clonación molecular de la secuencia codificante de SAP2, se amplificó la secuencia codificante de SAP2 mediante PCR a partir del ADN genómico usando oligonucleótidos Ca70 y Ca71. Se corrió un gel de agarosa al 1% para verificar el tamaño correcto del producto de PCR, y sólo estaba presente una única banda con un tamaño estimado de aproximadamente 1200 pb. Tras la digestión con enzimas de restricción, se escindió el producto de PCR del gel y se purificó. Se ligó la secuencia codificante en el vector digerido para dar el plásmido pRLV141. Para verificar la secuencia de los insertos y el marco de las proteínas con etiqueta de His recombinantes, se secuenciaron completamente pRLV141 y pRLV143 por Genenco (Italia).

#### 1.3 Expresión y purificación de proteínas de *C. albicans* recombinantes

Se obtuvo la expresión de 6xhis-Sap2 recombinante en *E. coli* M15 que llevaba el plásmido pUHA1 productor de represor *lac* (La Valle R. *et al.*, Infect. Immu. (1995), 63: 4039-4045; Hochuli E. *et al.*, Bio/Technology (1988), 6: 1321-1325). Se realizó la inducción en medio LB que contenía kanamicina y ampicilina, mediante la adición de isopropil-b-D-tio-galacto-piranosido (IPTG; Boehringer) con una concentración final de 1 mM, a un cultivo con una DO<sub>600</sub> de 0,7, seguido por 5 h adicionales de incubación a 37°C. Se purificó la proteína con etiqueta de 6xhis recombinante mediante cromatografía de afinidad con quelato de níquel (Hochuli E. *et al.*, Bio/Technology (1988), 6: 1321-1325) según las instrucciones del fabricante (Qiagen; condiciones desnaturalizantes). Se combinaron las fracciones que contenían el polipéptido purificado y se precipitaron con 3 volúmenes de etanol absoluto, se resuspendieron en agua y se almacenaron a -20°C. En las células inducidas, se observó una nueva banda de proteína con un tamaño molecular de aproximadamente 48 kDa, que concuerda con el tamaño previsto de 6xhis-SAP2.

### Ejemplo 2

#### 2.1 Construcción de plásmidos recombinantes y producción de Sap2 recombinante truncada (tSap2)

Se clonó SAP de longitud completa tal como se describió en el ejemplo 1. Para la producción de una forma truncada de Sap2, se digirió el plásmido pRLV141 con BamHI para escindir el fragmento correspondiente a los nucleótidos que codifican para los aminoácidos 1-76 de la secuencia codificante de SAP2. Volvió a ligarse el plásmido digerido para dar pRLV143 y se usó para transformar las células bacterianas. Se analizaron las colonias resultantes para detectar la longitud de inserto de ADN mediante mapeo de restricción, PCR y secuenciación de ADN (datos no

mostrados).

Alternativamente se produjo sintéticamente una Sap2 truncada que incluía la etiqueta de His y con un sitio de escisión de proteasa adicional (trombina) entre la etiqueta de His y tSap2 (Geneart, Regensburg, Alemania). Para la expresión óptima en un sistema huésped se adaptó el uso de codones al uso de codones del huésped (por ejemplo por Geneart, Regensburg, Alemania). Se sintetizó el gen de tSap2 con los dos sitios de restricción NdeI (extremo 5') y BamHI (extremo 3') y se clonó en los sitios de restricción NdeI/BamHI del vector de expresión pET14b (Novagen / Merck Biosciences, Darmstadt, Alemania), dando como resultado el plásmido pET14-tSap2. Se confirmó la secuencia de nucleótidos de tSap2 en este vector mediante secuenciación.

Alternativamente se produjo sintéticamente una Sap2 truncada que carecía de etiqueta de His (Geneart, Regensburg, Alemania). Para la expresión óptima en un sistema huésped se adaptó el uso de codones al del huésped (Geneart, Regensburg, Alemania). Se sintetizó el gen de tSap2 con los dos sitios de restricción NcoI (extremo 5') y BamHI (extremo 3') y se clonó en los sitios de restricción NcoI/BamHI del vector de expresión pET-14b (Novagen / Merck Biosciences, Darmstadt, Alemania), dando como resultado el plásmido pET-tSap2. Se confirmó la secuencia de nucleótidos de tSap2 en este vector mediante secuenciación.

## 2.2 Expresión y purificación de proteínas de *C. albicans* recombinantes

Se obtuvo la expresión de polipéptido 6xhis-tSAP2 recombinante (6xhis-SAP2<sup>77-398</sup>) en *E. coli* M15 que llevaba el plásmido pUHA1 productor de represor *lac* (La Valle R. *et al.*, Infect. Immun. (1995), 63: 4039-4045; Hochuli E. *et al.*, Bio/Technology (1988), 6: 1321-1325). Se realizó la inducción en medio LB que contenía kanamicina y ampicilina, mediante la adición de isopropil-b-D-tio-galacto-piranosido (IPTG; Boehringer) con una concentración final de 1 mM, a un cultivo con una DO<sub>600</sub> de 0,7, seguido por 5 h adicionales de incubación a 37°C. Se purificó la proteína con etiqueta de 6xhis recombinante mediante cromatografía de afinidad con quelato de níquel (Hochuli E. *et al.*, Bio/Technology (1988), 6: 1321-1325) según las instrucciones del fabricante (Qiagen; condiciones desnaturalizantes). Se combinaron las fracciones que contenían el polipéptido purificado y se precipitaron con 3 volúmenes de etanol absoluto, se resuspendieron en agua y se almacenaron a -20°C. En las células inducidas, se observó una nueva banda de proteína con un tamaño molecular de aproximadamente 35,5 kDa que concuerda con el tamaño previsto de 6xhis-tSAP2.

Se realizó la expresión de pET14-tSap2 y pET-tSap2 en sistemas huésped de expresión que son lisógenos de bacteriófago λDE3, por ejemplo *E. coli* BL21(DE3) o *E. coli* Origami(DE3) (Novagen / Merck Biosciences, Darmstadt, Alemania), en condiciones tal como se describió anteriormente.

La eliminación proteolítica de la etiqueta de His y el aislamiento/purificación de la proteína tSAP2 recombinante resultante sin etiqueta de His se realizó de la siguiente manera:

se purificó proteína con etiqueta de 6xhis con un sitio de escisión de trombina (del vector pET14-tSap2) mediante cromatografía de afinidad con quelato de níquel sobre una columna a HiTrap FF Crude según las instrucciones del fabricante (GE Healthcare, Dübendorf, Suiza). Se trató la combinación de la proteína purificada con la proteasa trombina para eliminar la etiqueta de 6xhis de la proteína tSap2. Por tanto, se incubó la proteína purificada con perlas de trombina-agarosa durante 5 h a TA tal como recomienda el fabricante (Sigma, Buchs, Suiza). Se cargó la proteína tSap2 sin etiqueta sobre una columna de cromatografía de intercambio iónico (HiTrap Q FF, GE Healthcare, Dübendorf, Suiza) y se eluyó con tampón B (1 x PBS, pH 7,4; NaCl 1,5 M) con un gradiente hasta el 100% de tampón B a lo largo de 5 volúmenes de columna (CV). Se combinaron las fracciones que contenían tSap2 y se dializaron frente a 1xPBS, pH 7,4.

El aislamiento/purificación de proteína tSAP2 recombinante sin etiqueta de His se realizó de la siguiente manera:

Se realizó la expresión del vector pET-tSap2 en *E. coli* tal como se describió anteriormente para pET14-tSap2. Tras el cultivo, se centrifugaron las células hasta obtener un sedimento y se trataron con reactivo BugBuster tal como indica el fabricante (Novagen / Merck Biosciences, Darmstadt, Alemania) para aislar los cuerpos de inclusión (IB). Finalmente, se resuspendieron los IB en 20 ml de tampón de lisis por litro de cultivo de bacterias (tampón de lisis: 1x PBS, pH 7,4; urea 4 M). Se cargó este material sobre una columna HiTrap Q FF (GE Healthcare, Dübendorf, Suiza) y se eluyó con tampón B (1 x PBS, pH 7,4; urea 4 M, NaCl 1 M) con un gradiente hasta el 100% de tampón B a lo largo de 5 volúmenes de columna (CV). Se combinaron las fracciones que contenían tSap2 y se dializaron frente a 1x PBS, pH 7,4, urea 0,25 M en varias etapas (urea 4 M -> urea 2 M -> urea 1 M -> urea 0,5 M -> urea 0,25 M), cada vez durante 24 h a 4°C, volumen de 1 l. Posteriormente, se cargó este material sobre una columna HiTrap Q FF (GE Healthcare, Dübendorf, Suiza), con tampón A (1x PBS, pH 7,4, NaCl 10 mM) y tampón B (1x PBS, pH 7,4, NaCl 1,5 M), y un gradiente hasta el 100% de tampón B a lo largo de 5 CV. Se combinaron las fracciones que contenían tSap2 y se concentraron sobre una columna Amicon Ultra 10K (Millipore, Zug, Suiza) según las instrucciones. Se cambió el tampón por 1x PBS, pH 7,4, NaCl 1,5 M mediante la adición de NaCl. Se cargó este material sobre una columna HiTrap Phenyl FF (GE Healthcare, Dübendorf, Suiza), con tampón A (1x PBS, pH 7,4, NaCl 1,5 M) y tampón B (1x PBS, pH 7,4, NaCl 10 mM), y un gradiente hasta el 100% de tampón B a lo largo de 10 CV. Se combinaron las fracciones que contenían tSap2 y se concentraron sobre una columna Amicon Ultra 10K (Millipore, Zug, Suiza) y se lavaron tres veces con 1x PBS, pH 7,4, NaCl 10 mM. Se almacenó la proteína en alícuotas a 4°C y

se congelaron.

### Ejemplo 3: Estabilidad de Sap y tSap2 recombinantes

5 Se expresaron Sap2 y tSap2 recombinantes y se purificaron tal como se describió en los ejemplos 1 y 2. Se incubaron 3 µg de Sap2 y tSap2 recombinantes en PBS durante diferentes periodos de tiempo (de 30 min. a 24 ó 48 horas) o bien a temperatura ambiente o bien a 37°C. Tras la incubación, se sometieron ambas preparaciones a SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie.

10 La Sap2 recombinante truncada era completamente estable y completamente reactiva con el suero anti-Sap2 durante 24 horas (figura 1A) y 48 horas (datos no mostrados), sin ningún signo de degradación. Tras la incubación a TA (a 37°C), esta preparación de proteína también era muy estable y sólo mostró un poco de degradación con bandas de bajo peso molecular reactivas con suero a las 24-48 horas. En cambio, la preparación de Sap2 de tipo natural era lábil tras la incubación durante de 6 a 24 horas incluso a temperatura ambiente y totalmente degradable incluso tras una incubación corta, de 30 min. a 37°C (figura 1B).

### Ejemplo 4

#### Métodos convencionales usados en los siguientes experimentos:

#### 15 4.1 Inmunogenicidad de Sap2 y tSap2 recombinantes

##### 4.1.1 Animales

Se usaron ratas Wistar hembra ovariectomizadas (80-100 g) de Charles River Breeding Laboratories (Calco, Italia) a lo largo de todo el estudio. El cuidado global y mantenimiento de los animales fue tal como se describe en otra parte (De Bernardis F. *et al.*, Infect. Immun. (1997), 65: 3309-3405).

#### 20 4.1.2 Inmunización intravaginal en ratas

Para la inmunización activa, se administraron a grupos de cinco ratas, un total de tres veces, por vía intravaginal (i.v.g.) a intervalos semanales 1-100 µg de preparación de SAP2 y tSAP2 recombinantes y opcionalmente junto con adyuvantes (por ejemplo HLT ug). Los animales de control sólo recibieron solución salina estéril.

##### 4.1.3 Lavado vaginal

25 Se lavó la cavidad vaginal de las ratas mediante inyección suave y posterior aspiración de 0,5 ml de PBS. Se combinaron los fluidos recogidos para cada grupo experimental; se centrifugaron los 2,5 ml resultantes durante 15 minutos a 3500 x g en una centrifugadora Biofuge refrigerada, y se sometió a ensayo el sobrenadante para detectar anticuerpos vaginales.

#### 4.2 ELISA para detectar Ac frente a constituyentes de *C. albicans* en fluidos vaginales

30 Se sometió a ensayo la presencia de anticuerpos en los lavados vaginales mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) descrito anteriormente (Cassone A. *et al.*, Infect. Immun. (1995), 63: 2619-2624; De Bernardis F. *et al.*, Infect. Immun. (2000), 68: 3297-3304). Se usaron 200 µl de una preparación de Sap2 nativa purificada (generosamente proporcionada por P.A. Sullivan, Massey, University, Palmerston North, Nueva Zelanda) (5 µg/ml en carbonato de sodio 0,2 M) como antígeno de recubrimiento para la detección de anticuerpos y se dispuso en los pocillos de una placa de microtitulación de poliestireno, que se mantuvo durante la noche a 4°C. Tras tres lavados con tampón Tween 20-PBS, se distribuyeron diluciones 1:2 de fluidos vaginales en pocillos por triplicado y se incubaron las placas durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavó de nuevo cada pocillo con tampón Tween 20-PBS y se añadieron diluciones óptimas predeterminadas de anticuerpos de oveja anti-inmunoglobulina IgG o IgA de rata conjugados con fosfatasa alcalina (obtenida de Serotec Ltd; Kidlington, Oxford, Reino Unido). Se detectó la fosfatasa alcalina unida mediante la adición de una disolución de fosfato de para-nitrofenilo en tampón de dietanolamina y se leyeron las placas a A 405 con microlector automatizado (Labsystem Multiscan, MS, Finlandia) purgado con aire. El fluido vaginal se consideró positivo para un determinado anticuerpo cuando la DO era superior a 2 veces el valor del pocillo recubierto con el mismo antígeno y sometido a prueba con el fluido vaginal de ratas no inmunizadas, no infectadas.

45 Se sometieron a prueba variables cuantitativas para determinar la distribución normal y se compararon mediante la prueba de la t de Student bilateral. Se evaluaron diferencias en las proporciones de grupos mediante el uso de la prueba de  $\chi^2$  o, para números pequeños, con la prueba exacta de Fisher. Se usó un análisis de la varianza ANOVA para comparar muestras pareadas. Se usó una prueba bilateral con significación a un nivel de  $p < 0,05$  para determinar la significación estadística. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa de software Intercooled Stata (Stata Corporation, Texas).

### Ejemplo 5: Detección de anticuerpos frente a tSAP2 en ratas inmunizadas

Se inmunizaron dos grupos de cinco ratas hembra ovariectomizadas por vía intravaginal tres veces a intervalos

semanales: un grupo recibió 100 µg/dosis de Sap2 de tipo natural mientras que al segundo grupo se le administraron 20 µg/dosis de Sap2 truncada. Una semana tras la última inmunización, se recogieron combinaciones de lavados vaginales de cada grupo y después se diluyeron 1:2 para el ensayo ELISA (métodos convencionales expuestos en el ejemplo 4). Se usó una preparación de Sap2 de tipo natural como antígeno de recubrimiento para la detección de anticuerpos en el ensayo inmunológico. La presencia de anticuerpo específico para la Sap2 de tipo natural en los fluidos vaginales se expresa en cuanto a absorbancia, que se leyó a  $\lambda=405$  nm. Se observa el aumento en la producción de anticuerpos principalmente para IgA, la principal inmunoglobulina implicada en la inmunidad mucosa. Los resultados se muestran en la figura 2 y demuestran que la Sap2 truncada (tSap2) induce niveles superiores de anticuerpos a la Sap2 de tipo natural (Sap2) enzimáticamente activa en fluidos vaginales de ratas inmunizadas.

5

10 Ejemplo 6: Protección frente a exposición de *C. albicans* tras la vacunación Sap2 y tSap2

Una semana tras la última inmunización, se sometieron todos los animales a exposición i.v.g. con  $10^7$  células de *C. albicans*, y se monitorizó la infección mediante recuento de unidades formadoras de colonias (UFC), tal como se notifica en otra parte (De Bernardis F. *et al.*, Infect. Immun. (1997), 65: 3309-3405; De Bernardis F. *et al.*, Infect. Immun. (2000), 68: 3297-3304). Se llevaron a cabo dos experimentos independientes. Para el análisis de anticuerpos (Ac), se tomaron muestras de fluidos vaginales a intervalos regulares de cada animal lavando suavemente la cavidad vaginal con 0,5 ml de PBS, tal como se describe en otra parte (De Bernardis F. *et al.*, Infect. Immun. (1997), 65: 3309-3405; De Bernardis F. *et al.*, Infect. Immun. (2000), 68: 3297-3304). Se centrifugó el fluido recogido a 3500 x g durante 15 min. en una centrifugadora Biofuge refrigerada, y se sometió a ensayo el sobrenadante tal como se describió anteriormente. Los resultados se muestran en la figura 3.

15

20 Ejemplo 7: Las formulaciones basadas en virosoma que contienen tSap2 inducen niveles superiores de IgG e IgA

Se inmunizaron tres grupos de cinco ratas por vía intravaginal tres veces a intervalos semanales: el primer grupo recibió 20 µg/dosis de proteína truncada sola; el segundo grupo recibió 20 µg/dosis de proteína truncada unida a la superficie del virosoma, y el tercer grupo se trató con tampón. Una semana tras la última inmunización se recogieron combinaciones de lavados vaginales de cada grupo y se diluyeron 1:2 para el ensayo ELISA. Se usó una preparación de Sap2 de tipo natural como antígeno de recubrimiento para la detección de anticuerpos en el ensayo inmunológico. La presencia de anticuerpo en los fluidos vaginales se expresa en cuanto a absorbancia, que se leyó a  $\lambda = 405$  nm. Los resultados se muestran en la figura 4.

25

30 Ejemplo 8: Las formulaciones basadas en virosoma que contienen tSap2 proporcionan una tasa superior de aclaramiento de la infección

Específicamente, se inmunizaron tres grupos de 5 ratas hembra ovariectomizadas con diferentes preparaciones siguiendo el esquema de inmunización habitual: el primer grupo recibió 20 µg/dosis de proteína truncada sola, el segundo grupo recibió 20 µg/dosis de proteína truncada unida a la superficie del virosoma, y el tercer grupo se trató con tampón. Cuatro semanas tras la última inmunización se sometieron todas las ratas a exposición con una dosis vaginopática de la cepa SA-40 de *C. albicans* y se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) de *Candida* 1, 2, 7, 13, 21 y 28 días tras la exposición. Los resultados se muestran en la figura 5.

35

Se inmunizaron cuatro grupos de ratas hembra ovariectomizadas por vía intravaginal tres veces a intervalos semanales con las siguientes preparaciones: 1) proteína truncada Sap2 unida a virosomas (20 µg/dosis); 2) proteína truncada Sap2 unida a virosomas y combinada con HLT (20 µg/dosis); 3) proteína truncada sola (20 µg/dosis); 4) tampón. Un mes tras el último tratamiento se sometieron todas las ratas a exposición con una cantidad vaginopática de *C. albicans*. Se monitorizó el transcurso de la infección vaginal durante 28 días. Los resultados se muestran en la figura 6.

40

45 Ejemplo 9: Los virosomas que contienen la proteína tSap2 confieren una mejor protección

En este experimento *in vivo*, se inmunizaron dos grupos de ratas hembra ovariectomizadas por vía intravaginal tres veces a intervalos semanales con virosomas que contenían la proteína truncada y la proteína truncada sola, respectivamente. Cuatro semanas tras la última inmunización se sometieron todas las ratas a exposición con una dosis vaginopática de la cepa SA-40 de *C. albicans*. Se monitorizó el estado de la infección vaginal durante 28 días mediante recuento de unidades formadoras de colonias (UFC). Se consideró que una rata estaba infectada cuando  $UFC \geq 1 \times 10^3$  /ml de fluido vaginal. Los resultados se muestran en la tabla 1.

45

Tabla 1

Formulaciones	Día = 0		Día = 7	
	UFC/ml de fluidos vaginales x $10^3$	Ratas infectadas	UFC/ml de fluidos vaginales x $10^3$	Ratas infectadas
tSap2+IRIV	>100	5/5	4±3	2/5
tSap2	>100	5/5	6±2	3/5
PBS	>100	5/5	>100	5/5

Tabla 1: La tabla muestra que los virosomas que contienen la proteína truncada confieren una mejor protección en un modelo de exposición de animal que la proteína sola. Específicamente, el número de ratas infectadas inmunizadas con la formulación basada en virosoma es inferior al número de ratas tratadas con la proteína sola, una semana tras la exposición.

## 5 Ejemplo 10: Acoplamiento Sap2/tSap2 a fosfoetanolamina

### 10.1 Acoplamiento de proteína de *Candida* a fosfoetanolamina mediante grupos cisteína

10 Para una preparación virosomal de 4 ml, se toma la cantidad indicada de la proteína y se resuspende en 1 ml de OEG 100 mM en PBS. Se transfiere esta disolución a 50 mg de tris-(2-carboxietil)fosfina (TCEP) inmovilizada sobre perlas de Amberlite (Merck Biosciences Novabiochem, Läufelfingen, Suiza) y se incuban durante 30 min. a TA. Se retiran las perlas y se transfiere la disolución a 4 mg de N-MCC-PE reciente (aproximadamente 4,3  $\mu$ mol; Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama) y se incuban a 30°C con agitación durante al menos 4 h. Finalmente, se consumen los grupos maleimida no usados en la fosfoetanolamina mediante la adición de cantidades traza de tampón Tris pH 7,4. Se almacena la disolución a 4°C hasta su uso.

### 10.2 Acoplamiento de proteína de *Candida* a fosfoetanolamina mediante grupos amino primarios

15 Para una preparación virosomal de 4 ml, se toma la cantidad indicada de la proteína y se resuspende en 0,1-0,5 ml de PBS pH 7,4, EDTA 10 mM. Se añade esta disolución a 12,5 mg de reactivo sulfo-SMCC (aproximadamente 25  $\mu$ mol; Apollo Scientific, Cheshire, Reino Unido) y se incuban durante 1 h a TA con agitación lenta. Se elimina el reactivo sulfo-SMCC no usado mediante filtración en gel sobre una columna Sephadex (GE Healthcare, Otelfingen, Suiza) y se complementa con OEG 100 mM en PBS hasta un volumen final de 1 ml. Entonces se añade esta mezcla a 4 mg de N-MCC-PE reciente (aproximadamente 4,3  $\mu$ mol; Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama) y se incuban a temperatura ambiente con agitación durante al menos 4 h. Finalmente, se consumen los grupos maleimida no usados en la fosfoetanolamina mediante la adición de cantidades traza de tampón Tris pH 7,4. Se almacena la disolución a 4°C hasta su uso.

## 25 Ejemplo 11: Vacuna que contiene Sap2 o tSap2 en combinación con virosomas

### 11.1 Reactivos usados en la preparación y los ejemplos de trabajo

30 Reactivos: se adquirió octaetilenglicol-mono-(n-dodecil)éter (OEG, C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>) de Fluka Chemie GmbH (Buchs, Suiza). Se adquirió sacarosa (Eur. Phar.) de Merck (Dietikon, Suiza). Se obtuvo fosfatidilcolina de huevo (PC) de Lipoid (Cham, Suiza). Se obtuvo 1-oleoil-3-palmitoil-rac-glicero-2-fosfoetanolamina de Bachem (Bubendorf, Suiza). Se adquirieron perlas Bio-Beads SM2 de Bio-Rad Laboratories (Glattbrugg, Suiza). Se adquirió cloruro de N(trimetilamonioetil)carbamato de colesterilo (TC-chol) de Merck Eprova (Schaffhausen, Suiza).

35 Se obtuvieron virus influenza de la cepa A/Singapore/6/86 (A/Sing) y otras cepas de influenza A, propagadas en la cavidad alantoica de huevos embrionados (Gerhard, W. (1976), J. Exp. Med. 144: 985-995), de Berna Biotech AG (Bern, Suiza) y se purificaron tal como se describe (Skehel, J. *et al.*, (1971), Virology 44: 396). Se determinó la razón de hemaglutinina / fosfolípido según Böttcher (Böttcher *et al.* (1961). Anal. Chim. Acta 24, 203), y se realizó una cuantificación de HA tras SDS-PAGE usando el método de extracción de Coomassie tal como se describe por Ball (Ball (1986). Anal. Biochem. 155, 23).

### 11.2 Preparación de los virosomas

40 Para la preparación de PE-mimético-IRIV, se centrifugó una disolución de hemaglutinina de Influenza A/Singapore purificada (4 mg) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 30 min. a 100.000 g y se disolvió el sedimento en PBS (1,33 ml) que contenía octaetilenglicolmonododecil éter 100 mM (PBS-OEG). Se disolvieron conjugados de péptido amiloide-fosfatidiletanolamina (4 mg), fosfatidilcolina (32 mg; Lipoid, Ludwigshafen, Alemania) y fosfatidiletanolamina (6 mg) en un volumen total de 2,66 ml de PBS-OEG. Se mezclaron los fosfolípidos y las disoluciones de hemaglutinina y se sonicaron durante 1 min. Se centrifugó esta disolución durante 1 hora a 100.000 g y se esterilizó el sobrenadante mediante filtración. Se formaron virosomas mediante eliminación de detergente (SM BiaBeads, BioRad, Glattbrugg, Suiza).

### 11.3 Preparación de SAP2/tSAP2 acoplada a virosomas (proteína-GIRIV)

50 Se preparan proteína-GIRIV mediante el método de eliminación de detergente. Para un volumen final de 4 ml, se disuelven 32 mg de PC de huevo y 4 mg de PE en 2 ml de PBS, OEG 100 mM (PBS/OEG) y se añade el conjugado de proteína-PE preparado (1 ml; véase anteriormente) a esta mezcla. Se centrifugan 2 mg de HA de virus influenza A/Singapore/6/86 inactivado a 100.000 x g durante 1 h a 4°C y se disuelve el sedimento en 1 ml de PBS/OEG. Se mezclan los fosfolípidos solubilizados con detergente y los virus y se sonicaron durante 1 min. Se centrifuga esta mezcla a 100.000 x g durante 1 h a 18°C y se toma el sobrenadante para etapas adicionales. Entonces se forman los virosomas mediante eliminación del detergente usando dos veces 1,5 g de perlas SM2 Bio-Beads húmedas durante 1 h cada vez a temperatura ambiente con agitación. Se almacena la disolución de virosomas a 4°C.

Ejemplo 12: Vacuna que contiene Sap2 o tSap2 en combinación con virosomas liofilizados*12.1 Preparación de virosomas que contienen TC-Chol*

5 Se preparan virosomas que contienen TC-Chol mediante el método de eliminación de detergente. Para un volumen final de 4 ml, se disuelven 32 mg de PC de huevo, 8 mg de OPPE y 5 mg de cloruro de N(trimetilamonioetil)carbarnato de colesterilo (TC-chol) en 2,6 ml de PBS, OEG 100 mM (PBS/OEG). Se centrifugan 2 mg de HA de virus influenza A/Singapore/6/86 inactivado u otra cepa de influenza A a 100.000 x g durante 1 h a 4°C y se disuelve el sedimento en 1 ml de PBS/OEG. Se mezclan los fosfolípidos solubilizados con detergente y los virus con 0,4 ml de sacarosa al 50% (p/v) y se sonicán durante 1 min. Se centrifuga esta mezcla a 100.000 x g durante 1 h a 18°C. Se forman virosomas mediante eliminación del detergente usando dos veces 1,5 g de perlas SM2 Bio-Beads húmedas durante 1 h cada vez a temperatura ambiente con agitación. Entonces se esterilizan por filtración los virosomas recién formados (0,22 µm) y se extraen alícuotas en viales de vidrio estériles. Se congelan los viales cerrados a -70°C y después se liofilizan a -40°C durante 20 h y 10°C durante 2 h. Los viales cerrados se almacenan congelados hasta su uso.

*12.2 Preparación de SAP2/tSAP2 acoplada a virosomas liofilizables (proteína-TIRIV)*

15 Para obtener TIRIV con proteína de *Candida* acoplada a un anclaje de fosfolípido, se acopla la proteína a PE tal como se describió anteriormente y se disuelve en la disolución que contiene PC de huevo, PE y TC-Chol en PBS/OEG, antes de combinar con la HA viral solubilizada con detergente de virus influenza H1N1 inactivado. Se mezclan los fosfolípidos solubilizados con detergente y los virus con sacarosa hasta una concentración final del 5% (p/v) y se sonicán durante 1 min. Se centrifuga esta mezcla a 100.000 x g durante 1 h a 18°C. Entonces se forman virosomas con la proteína de *Candida* acoplada a su membrana mediante eliminación del detergente usando dos veces 1,5 g de perlas Bio-Beads SM2 húmedas durante 1 h cada vez a temperatura ambiente con agitación. Se esterilizan los virosomas por filtración (0,22 µm) y se extraen alícuotas en viales de vidrio estériles. Se congelan los viales cerrados a -70°C y después se liofilizan a -40°C durante 20 h y 10°C durante 2 h. Los viales cerrados se almacenan congelados hasta su uso.

25 Se realiza la reconstitución de los TIRIV liofilizados con un volumen igual de agua estéril. Se mezcla el vial poco tiempo durante aproximadamente 10 s con vórtex de nivel intermedio y se almacena a 4°C hasta su uso.

Ejemplo 13: Los AcM frente a polipéptido tSAP2 proporcionan protección pasiva

30 Se inocularon grupos de cinco ratas por vía intravaginal con anticuerpos anti-tSAP2 que se eluyeron de fluidos vaginales inmunitarios mediante absorción con perlas Dynabeads recubiertas con tSAP2, 30 minutos antes de la administración de una dosis de exposición de  $10^7$  células de *C. albicans* (cepa SA40). Se usaron los anticuerpos monoclonales (AcM) anti-tSAP2 a la concentración de 100 µg/ml. Los AcM usados a lo largo de todo este estudio fueron AcM NL2/2A8, AcM NL2/9B9 que se dirigen contra la proteína Sap2 truncada, y AcM NL2/7C9 que se dirige contra la proteína recombinante enolasa.

35 Se sometieron a prueba variables cuantitativas para determinar la distribución normal y se compararon mediante la prueba de la t de Student bilateral. Se evaluaron diferencias en las proporciones de grupos mediante el uso de la prueba de  $\chi^2$  o, para números pequeños, con la prueba exacta de Fisher. Se usó un análisis de la varianza ANOVA para comparar muestras pareadas. Se usaron pruebas bilaterales con significación a un nivel de  $p < 0,05$  para determinar la significación estadística. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa de software Intercooled Stata.

40 Tal como se muestra en la figura 7, ambos AcM anti-tSap2 (NL2/2A8 y NL2/9B9) confirieron protección a ratas, induciendo un aclaramiento muy rápido de células fúngicas de la vagina en comparación con los controles, concretamente, ratas que sólo recibieron células de *C. albicans* o un AcM anti-enolasa. En las condiciones sometidas a prueba, el efecto de AcM anti-tSap2 fue sustancialmente comparable al obtenido con tratamiento con fluconazol, un fármaco antifúngico popular, o con pepstatina, un inhibidor de Sap bien conocido.

Lista de secuencias

<110> Pevion Biotech AG  
 <120> Composiciones y métodos para el tratamiento y la prevención de candidiasis  
 <130> Ep51550HVSEpau  
 5 <140> aún no asignado  
 <141> con el presente documento  
 <160> 10  
 <170> PatentIn versión 3.3  
 <210> 1  
 10 <211> 322  
 <212> PRT  
 <212> *Candida albicans*  
 <220>  
 <223> tSAP2 aa  
 15 <400> 1

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

Ser Leu Gly Ser Val Glu Val Ser Gly Lys Thr Ile Asn Thr Asp Asn  
 180 185 190  
 Val Asp Val Leu Leu Asp Ser Gly Thr Thr Ile Thr Tyr Leu Gln Gln  
 195 200 205  
 Asp Leu Ala Asp Gln Ile Ile Lys Ala Phe Asn Gly Lys Leu Thr Gln  
 210 215 220  
 Asp Ser Asn Gly Asn Ser Phe Tyr Glu Val Asp Cys Asn Leu Ser Gly  
 225 230 235 240  
 Asp Val Val Phe Asn Phe Ser Lys Asn Ala Lys Ile Ser Val Pro Ala  
 245 250 255  
 Ser Glu Phe Ala Ala Ser Leu Gln Gly Asp Asp Gly Gln Pro Tyr Asp  
 260 265 270  
 Lys Cys Gln Leu Leu Phe Asp Val Asn Asp Ala Asn Ile Leu Gly Asp  
 275 280 285  
 Asn Phe Leu Arg Ser Ala Tyr Ile Val Tyr Asp Leu Asp Asp Asn Glu  
 290 295 300  
 Ile Ser Leu Ala Gln Val Lys Tyr Thr Ser Ala Ser Ser Ile Ser Ala  
 305 310 315 320

Leu Thr

<210> 2

<211> 966

<212> ADN

5 <212> *Candida albicans*

<220>

<223> tSAP2 ADN

<400> 2

```

ggatccaata atcaaaaact taatgttatt gttgatactg gatcatctga tttatggggt      60
cctgatgtta atgttgattg tcaagtcact tatagtgatc aaactgcaga tttctgtaaa      120
caaaagggga catatgatcc aagtggttca tcagcttcac aagatttgaa tactccattc      180
aaaattgggt atggtgatgg atcttcatct caaggtactt tatataagga taccgttgga      240
tttgggtggg tttcgattaa aatcaagtt ttagctgatg ttgattctac ttcaattgat      300
caaggtattt taggagttgg ttataaaacc aatgaagccg gtggtagtta tgataatgct      360
cctgtcactt taaaaaaca aggagtcatt gctaagaatg cttattcact ttatcttaat      420
tctccagatg ctgccacggg acaaataatt ttcggtgggg ttgataatgc taaatatagt      480
ggttcattaa ttgcattacc agttacttct gatcgtgaat taagaattag tttggggttca      540
    
```

gttgaagttt ctggtaaaac catcaatact gataatgtcg atgttctttt ggattcaggt 600  
 accaccatta cttatttgca acaagatctt gctgatcaaa tcattaaagc tttcaatggt 660  
 aaattaactc aagattccaa tggtaattca ttctatgaag ttgattgtaa tttgtcaggg 720  
 gatgttgat tcaattttag taaaaatgct aaaatttccg ttccagcttc cgaatttgct 780  
 gcttctttac aagggtgatga tggtaacca tatgataaat gtcaattact tttcgatggt 840  
 aatgatgcta acattcttgg tgataacttt ttgagatcag cttatattgt ttatgatttg 900  
 gatgataatg aaatttcttt ggctcaagtc aaatatactt ctgcttccag tatttctgcc 960  
 ttgacc 966

<210> 3

<211> 398

<212> PRT

5 <212> *Candida albicans*

<220>

<223> wtSAP2 de longitud completa aa

<400> 3

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

Ser Ile Lys Asn Gln Val Leu Ala Asp Val Asp Ser Thr Ser Ile Asp  
 165 170 175

Gln Gly Ile Leu Gly Val Gly Tyr Lys Thr Asn Glu Ala Gly Gly Ser  
 180 185 190

Tyr Asp Asn Val Pro Val Thr Leu Lys Lys Gln Gly Val Ile Ala Lys  
 195 200 205

Asn Ala Tyr Ser Leu Tyr Leu Asn Ser Pro Asp Ala Ala Thr Gly Gln  
 210 215 220

Ile Ile Phe Gly Gly Val Asp Asn Ala Lys Tyr Ser Gly Ser Leu Ile  
 225 230 235 240

Ala Leu Pro Val Thr Ser Asp Arg Glu Leu Arg Ile Ser Leu Gly Ser  
 245 250 255

Val Glu Val Ser Gly Lys Thr Ile Asn Thr Asp Asn Val Asp Val Leu  
 260 265 270

Leu Asp Ser Gly Thr Thr Ile Thr Tyr Leu Gln Gln Asp Leu Ala Asp  
 275 280 285

Gln Ile Ile Lys Ala Phe Asn Gly Lys Leu Thr Gln Asp Ser Asn Gly  
 290 295 300

Asn Ser Phe Tyr Glu Val Asp Cys Asn Leu Ser Gly Asp Val Val Phe  
 305 310 315 320

Asn Phe Ser Lys Asn Ala Lys Ile Ser Val Pro Ala Ser Glu Phe Ala  
 325 330 335

Ala Ser Leu Gln Gly Asp Asp Gly Gln Pro Tyr Asp Lys Cys Gln Leu  
 340 345 350

Leu Phe Asp Val Asn Asp Ala Asn Ile Leu Gly Asp Asn Phe Leu Arg  
 355 360 365

Ser Ala Tyr Ile Val Tyr Asp Leu Asp Asp Asn Glu Ile Ser Leu Ala  
 370 375 380

Gln Val Lys Tyr Thr Ser Ala Ser Ser Ile Ser Ala Leu Thr  
 385 390 395

<210> 4

<211> 1194

<212> ADN

<212> *Candida albicans*

<220>

<223> wtSAP2 de longitud completa ADN

5 <400> 4

<b>atgtttttaa</b>	<b>agaatatttt</b>	<b>cattgctctt</b>	<b>gctattgctt</b>	<b>tattagtcga</b>	<b>tgctactcca</b>	<b>60</b>
<b>acaacaacca</b>	<b>aaagatcagc</b>	<b>tggtttcggt</b>	<b>gcttttagatt</b>	<b>tcagtgttgt</b>	<b>gaaaactcct</b>	<b>120</b>
<b>aaagcattcc</b>	<b>cagttactaa</b>	<b>tggtcaagaa</b>	<b>ggtaaaactt</b>	<b>ccaaaagaca</b>	<b>agctgtccca</b>	<b>180</b>
<b>gtgactttac</b>	<b>acaatgaaca</b>	<b>agtcacttat</b>	<b>gctgctgata</b>	<b>ttaccgttgg</b>	<b>atccaataat</b>	<b>240</b>
<b>caaaaactta</b>	<b>atgttattgt</b>	<b>tgatactgga</b>	<b>tcatctgatt</b>	<b>tatgggttcc</b>	<b>tgatgttaat</b>	<b>300</b>
<b>gttgattgtc</b>	<b>aagtcactta</b>	<b>tagtgatcaa</b>	<b>actgcagatt</b>	<b>tctgtaaaca</b>	<b>aaaggggaca</b>	<b>360</b>
<b>tatgatccaa</b>	<b>gtggttcatc</b>	<b>agcttcacaa</b>	<b>gatttgaata</b>	<b>ctccattcaa</b>	<b>aattggttat</b>	<b>420</b>
<b>ggtgatggat</b>	<b>cttcacttca</b>	<b>aggtacttta</b>	<b>tataaggata</b>	<b>ccgttggatt</b>	<b>tggtgggtgtt</b>	<b>480</b>
<b>tcgattaaaa</b>	<b>atcaagtttt</b>	<b>agctgatggt</b>	<b>gattctactt</b>	<b>caattgatca</b>	<b>aggtatttta</b>	<b>540</b>
<b>ggagttgggt</b>	<b>ataaaaccaa</b>	<b>tgaagccggt</b>	<b>ggtagttatg</b>	<b>ataatgtccc</b>	<b>tgctacttta</b>	<b>600</b>
<b>aaaaaacaag</b>	<b>gagtcattgc</b>	<b>taagaatgct</b>	<b>tattcacttt</b>	<b>atcttaattc</b>	<b>tccagatgct</b>	<b>660</b>
<b>gccacgggac</b>	<b>aaataatttt</b>	<b>cggtgggggt</b>	<b>gataatgcta</b>	<b>aatatagtgg</b>	<b>ttcattaatt</b>	<b>720</b>
<b>gcattaccag</b>	<b>ttactttctga</b>	<b>tcgtgaatta</b>	<b>agaattagtt</b>	<b>tggtttcagt</b>	<b>tgaagtttct</b>	<b>780</b>
<b>ggtaaaacca</b>	<b>tcaatactga</b>	<b>taatgtcgat</b>	<b>gttcttttgg</b>	<b>attcaggtac</b>	<b>caccattact</b>	<b>840</b>
<b>tatttgcaac</b>	<b>aagatcttgc</b>	<b>tgatcaaatc</b>	<b>attaaagctt</b>	<b>tcaatggtaa</b>	<b>attaactcaa</b>	<b>900</b>
<b>gattccaatg</b>	<b>gtaattcatt</b>	<b>ctatgaagtt</b>	<b>gattgtaatt</b>	<b>tgtcagggga</b>	<b>tgttgtattc</b>	<b>960</b>
<b>aatttttagta</b>	<b>aaaatgctaa</b>	<b>aatttccggt</b>	<b>ccagcttccg</b>	<b>aatttgctgc</b>	<b>ttctttacaa</b>	<b>1020</b>
<b>ggtgatgatg</b>	<b>gtcaaccata</b>	<b>tgataaatgt</b>	<b>caattacttt</b>	<b>tcgatgttaa</b>	<b>tgatgctaac</b>	<b>1080</b>
<b>attcttggtg</b>	<b>ataacttttt</b>	<b>gagatcagct</b>	<b>tatattgttt</b>	<b>atgatttggga</b>	<b>tgataatgaa</b>	<b>1140</b>
<b>atttctttgg</b>	<b>ctcaagtcaa</b>	<b>atatacttct</b>	<b>gcttccagta</b>	<b>tttctgcctt</b>	<b>gacc</b>	<b>1194</b>

<210> 5

<211> 56

<212> PRT

10 <212> *Candida albicans*

<220>

<223> wtSAP2 secuencia pre-pro aa

<400> 5

Met Phe Leu Lys Asn Ile Phe Ile Ala Leu Ala Ile Ala Leu Leu Val  
 1 5 10 15

Asp Ala Thr Pro Thr Thr Thr Lys Arg Ser Ala Gly Phe Val Ala Leu  
 20 25 30

Asp Phe Ser Val Val Lys Thr Pro Lys Ala Phe Pro Val Thr Asn Gly  
 35 40 45

Gln Glu Gly Lys Thr Ser Lys Arg  
 50 55

<210> 6

<211> 168

<212> ADN

5 <212> *Candida albicans*

<220>

<223> wtSAP2 secuencia pre-pro ADN

<400> 6

atgtttttaa agaataatattt cattgctctt gctattgctt tattagtcga tgctactcca 60  
 acaacaacca aaagatcagc tggtttcggt gctttagatt tcagtgttgt gaaaactcct 120  
 aaagcattcc cagttactaa tggccaagaa ggtaaaactt ccaaaga 168

10 <210> 7

<211> 342

<212> PRT

<212> *Candida albicans*

<220>

15 <223> wtSAP2 madura aa

<400> 7

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

Ser Pro Asp Ala Ala Thr Gly Gln Ile Ile Phe Gly Gly Val Asp Asn  
 165 170 175

Ala Lys Tyr Ser Gly Ser Leu Ile Ala Leu Pro Val Thr Ser Asp Arg  
 180 185 190

Glu Leu Arg Ile Ser Leu Gly Ser Val Glu Val Ser Gly Lys Thr Ile  
 195 200 205

Asn Thr Asp Asn Val Asp Val Leu Leu Asp Ser Gly Thr Thr Ile Thr  
 210 215 220

Tyr Leu Gln Gln Asp Leu Ala Asp Gln Ile Ile Lys Ala Phe Asn Gly  
 225 230 235 240

Lys Leu Thr Gln Asp Ser Asn Gly Asn Ser Phe Tyr Glu Val Asp Cys  
 245 250 255

Asn Leu Ser Gly Asp Val Val Phe Asn Phe Ser Lys Asn Ala Lys Ile  
 260 265 270

Ser Val Pro Ala Ser Glu Phe Ala Ala Ser Leu Gln Gly Asp Asp Gly  
 275 280 285

Gln Pro Tyr Asp Lys Cys Gln Leu Leu Phe Asp Val Asn Asp Ala Asn  
 290 295 300

Ile Leu Gly Asp Asn Phe Leu Arg Ser Ala Tyr Ile Val Tyr Asp Leu  
 305 310 315 320

Asp Asp Asn Glu Ile Ser Leu Ala Gln Val Lys Tyr Thr Ser Ala Ser  
 325 330 335

Ser Ile Ser Ala Leu Thr  
 340

<210> 8

<211> 1026

<212> ADN

5 <212> *Candida albicans*

<220>

<223> wtSAP2 madura ADN

<400> 8

**caagctgtcc cagtgacttt acacaatgaa caagtcactt atgctgctga tattaccggt 60**  
**ggatccaata atcaaaaact taatgttatt gttgatactg gatcatctga tttatggggt 120**  
**cctgatgtta atgttgattg tcaagtcact tatagtgatc aaactgcaga tttctgtaaa 180**  
**caaaagggga catatgatcc aagtggttca tcagcttcac aagattttaa tactccattc 240**  
**aaaattgggt atggtgatgg atcttcatct caaggtactt tatataagga taccggttga 300**  
**tttgggtggg tttcgattaa aaatcaagtt ttagctgatg ttgattctac ttcaattgat 360**  
**caaggtattt taggagttgg ttataaaacc aatgaagccg gtggtagtta tgataatgct 420**  
**cctgtcactt taaaaaaca aggagtcatt gctaagaatg cttattcact ttatcttaat 480**  
**tctccagatg ctgccacggg acaataaatt ttcggtgggg ttgataatgc taaatatagt 540**  
**ggttcattaa ttgcattacc agttacttct gatcgtgaat taagaattag tttgggttca 600**  
**gttgaagttt ctggtaaac catcaatact gataatgtcg atgttctttt ggattcaggt 660**  
**accaccatta cttatttgca acaagatctt gctgatcaaa tcattaaagc tttcaatggt 720**  
**aaattaactc aagattccaa tggtaattca ttctatgaag ttgattgtaa tttgtcaggg 780**  
**gatgttgat tcaattttag taaaaatgct aaaatttccg ttccagcttc cgaatttgct 840**  
**gcttctttac aaggtgatga tggtaacca tatgataaat gtcaattact tttcgatgtt 900**  
**aatgatgcta acattcttgg tgataacttt ttgagatcag cttatattgt ttatgatttg 960**  
**gatgataatg aaatttcttt ggctcaagtc aaatatactt ctgcttcag tatttctgcc 1020**  
**ttgacc 1026**

<210> 9

<211> 34

5 <212> ADN

<212> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 9

10 **gggggatcca tctttttaaa gaatattttc attg 34**

<210> 10

<211> 35

<212> ADN

<212> Artificial

15 <220>

<223> cebador

<400> 10

**cctaagcttg gtcaaggcag aaatactgga agcag 35**

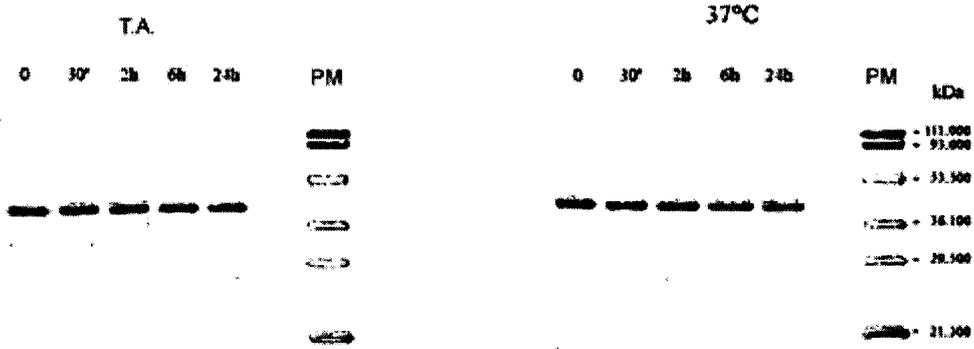
**REIVINDICACIONES**

1. Polipéptido que consiste en cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos:
  - (a) la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1; y
  - 5 (b) una secuencia de aminoácidos que es un fragmento de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, en el que dicha secuencia de aminoácidos tiene al menos 15 aminoácidos de longitud, y en el que dicha secuencia de aminoácidos define un polipéptido que muestra una antigenicidad equivalente al polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1.
2. Polinucleótido que consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada de las siguientes:
  - (a) la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 2;
  - 10 (b) una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia de (a);
  - (c) una secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1; y
  - 15 (d) una secuencia de ácido nucleico que es un fragmento de la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 2, en el que dicha secuencia de ácido nucleico tiene al menos 45 nucleótidos de longitud, y en el que dicha secuencia de ácido nucleico codifica para un polipéptido que muestra una antigenicidad equivalente al polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1.
3. Vector que comprende el polinucleótido según la reivindicación 2.
4. Célula huésped que comprende el vector según la reivindicación 3.
5. Composición que comprende al menos uno de los polipéptidos según la reivindicación 1.
- 20 6. Composición que comprende al menos uno de los polinucleótidos según la reivindicación 2.
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, que es una vacuna.
8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 5-7, que comprende uno o más componentes adicionales seleccionados de excipientes, diluyentes, adyuvantes, virosomas o similares.
9. Uso del polipéptido según la reivindicación 1, como inmunógeno y/o antígeno.
- 25 10. Uso del polipéptido según la reivindicación 1, en una composición de vacuna.
11. Uso de al menos uno de los polipéptidos según la reivindicación 1 y/o al menos uno de los polinucleótidos según la reivindicación 2, para preparar una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de infección por *Candida*.
12. Uso según la reivindicación 11, en el que la infección por *Candida* es una infección por *Candida albicans*.
- 30 13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en el que se usa uno o más componentes adicionales seleccionados de excipientes, diluyentes, adyuvantes, vehículos de suministro o similares.
14. Uso según la reivindicación 13, en el que el vehículo de suministro es un virosoma.
15. Uso según la reivindicación 14, en el que el polipéptido y/o polinucleótido está unido a la superficie del virosoma.
- 35 16. Uso según la reivindicación 14, en el que el polipéptido y/o polinucleótido está contenido en el lumen del virosoma.
17. Uso según la reivindicación 14, en el que el polipéptido y/o polinucleótido está tanto unido a la superficie, como contenido en el lumen, del virosoma.
18. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 11-17, en el que la infección es mucosa y/o sistémica.
- 40 19. Uso según la reivindicación 18, en el que la infección es mucosa y la enfermedad provocada por dicha infección se selecciona de candidiasis vulvovaginal o esofágica.
20. Kit que comprende al menos uno de los polipéptidos según la reivindicación 1 y/o al menos uno de los polinucleótidos según la reivindicación 2.
21. Kit según la reivindicación 20, para el diagnóstico *in vitro* de una infección por *Candida*.

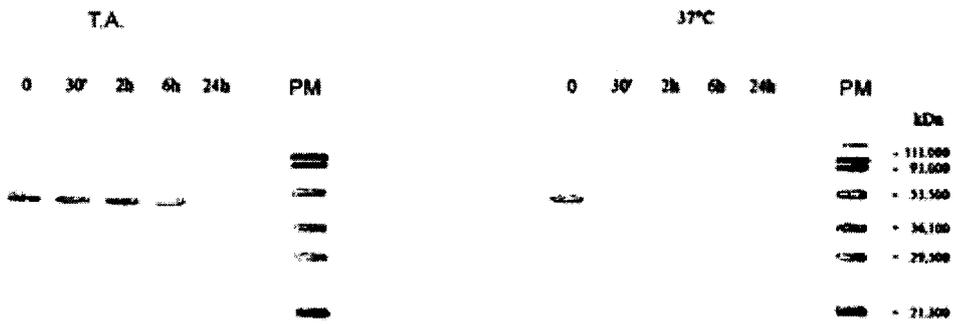
22. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 20-21, en el que la infección por *Candida* es una infección por *Candida albicans*.
23. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 20-22, que comprende además un reactivo para detectar complejos que incluyen el polipéptido.

**Figura 1**

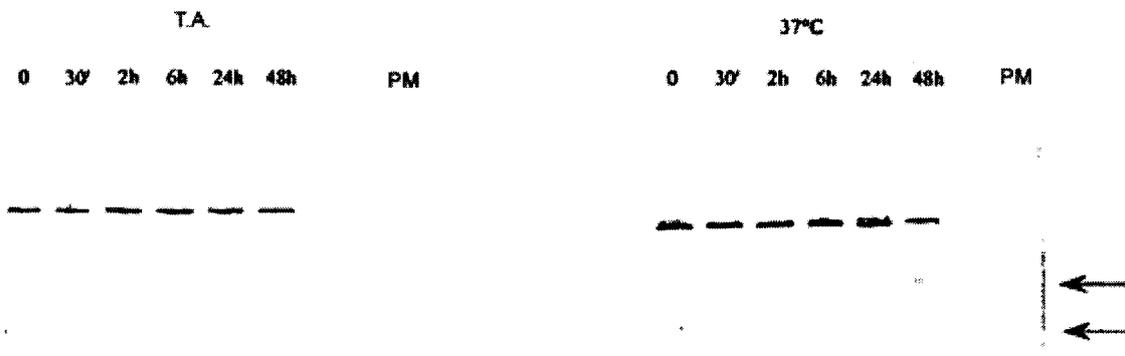
**A. tSap2**



**B. wtSap2**



**C. tSap2: Inmunotransferencia tipo Western usando anticuerpos anti-Sap2**



**Figura 2**

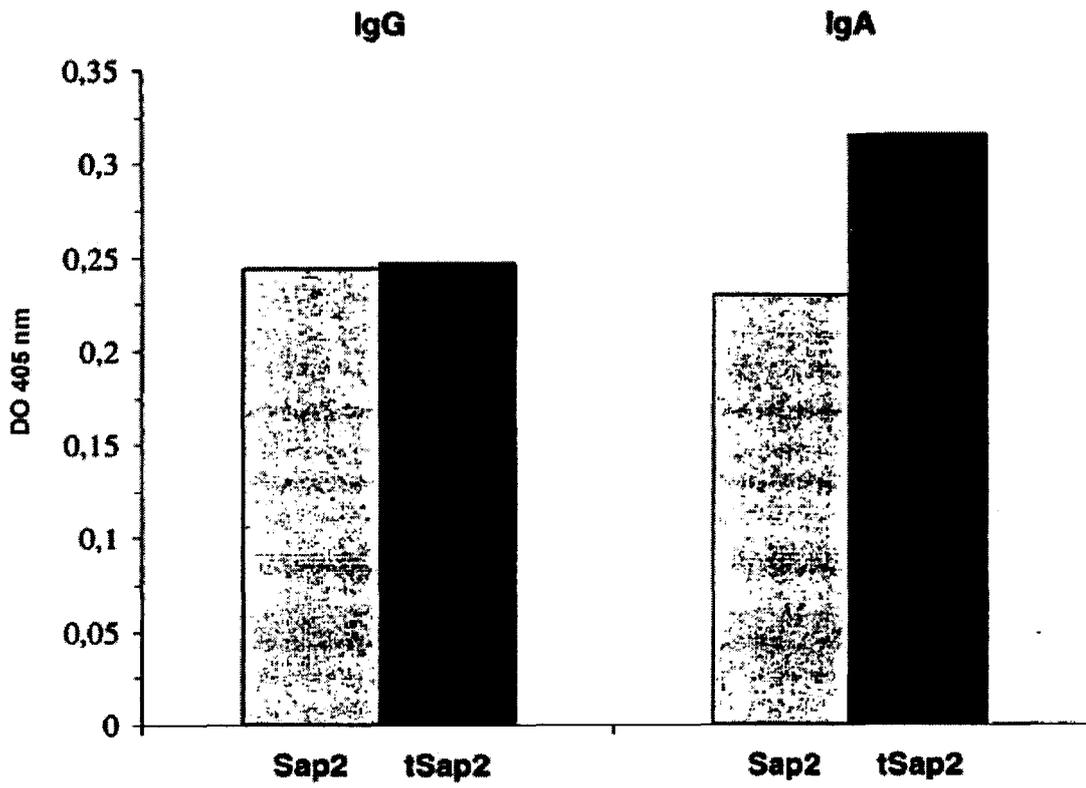
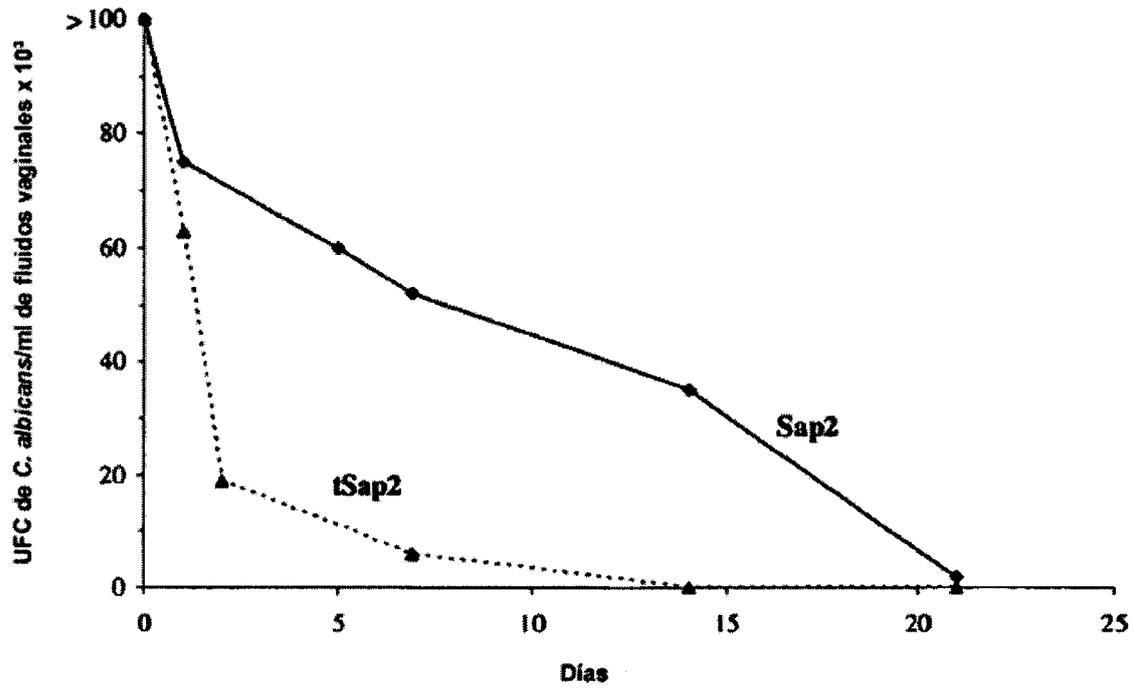


Figura 3



**Figura 4**

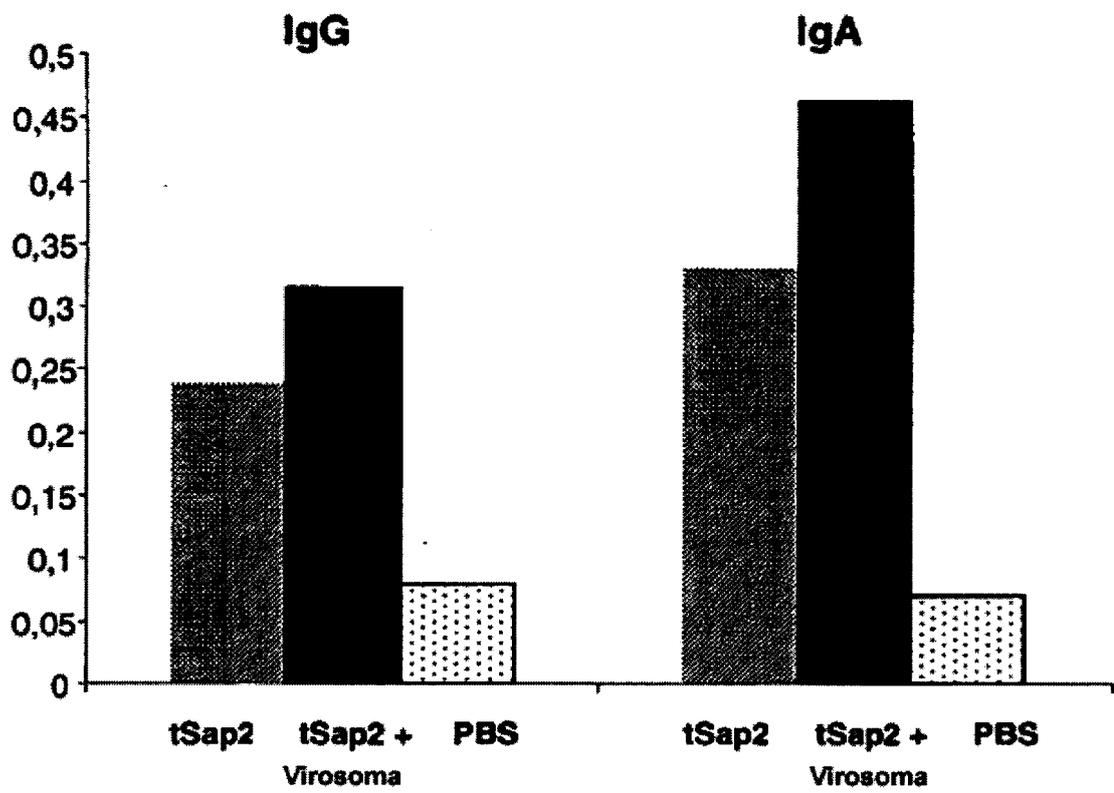


Figura 5

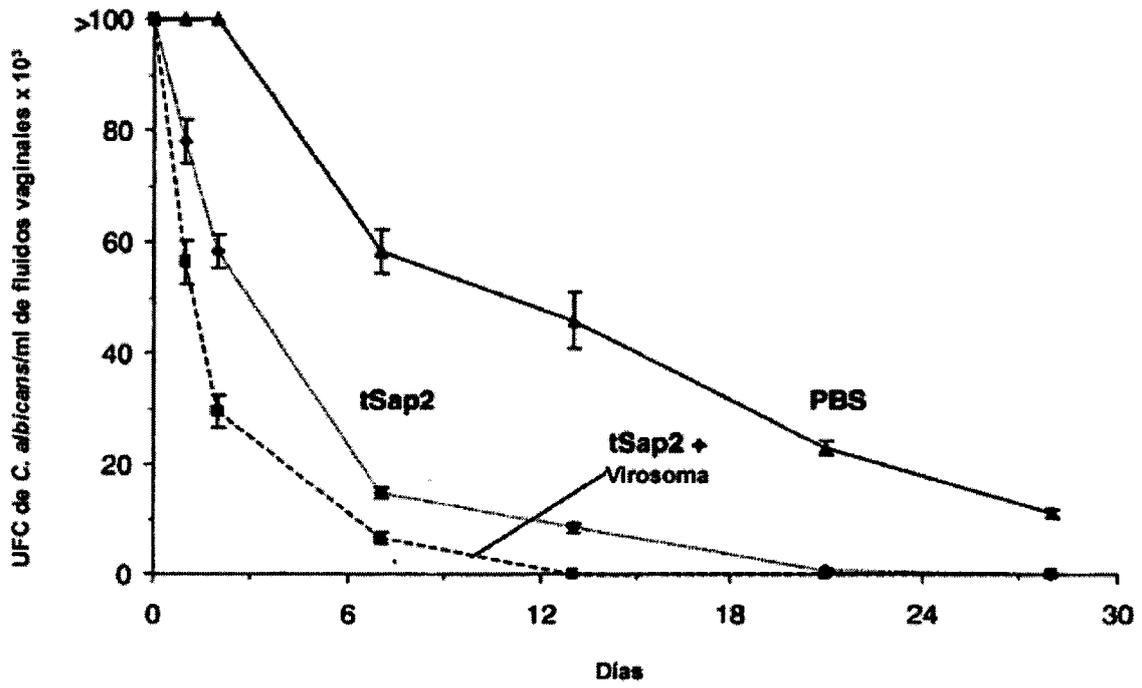


Figura 6

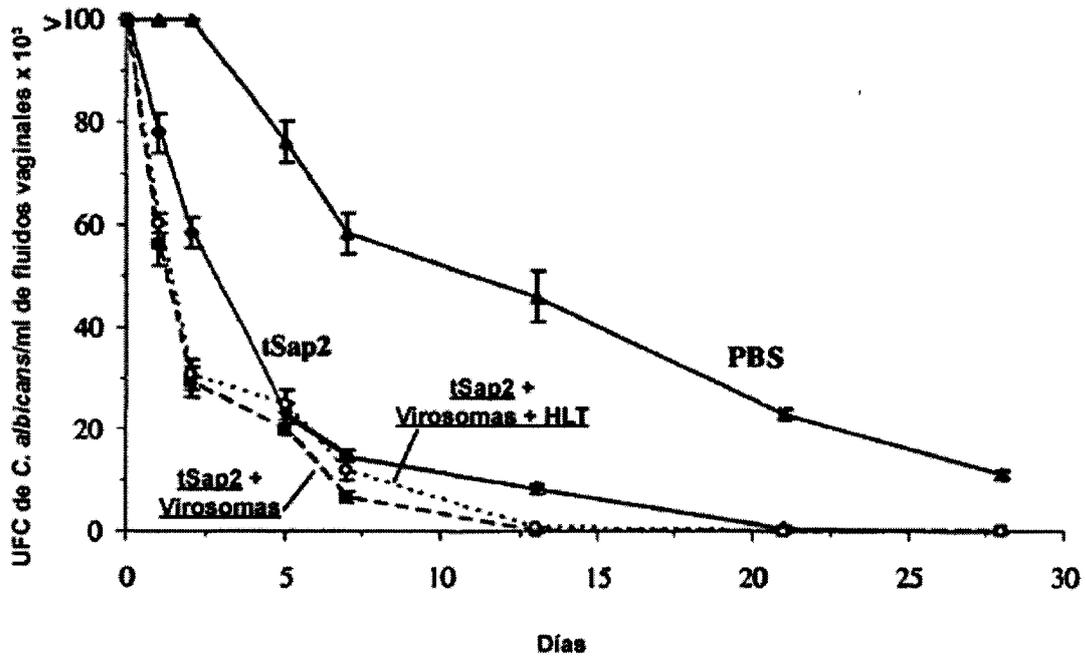


Figura 7

COLONIZACIÓN VAGINAL CON *C. ALBICANS* EN RATAS  
TRATADAS POR VÍA INTRAVAGINAL CON AcM

