

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 555**

51 Int. Cl.:

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2010 PCT/US2010/040949**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.01.2011 WO11003085**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2010 E 10794828 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 2448959**

54 Título: **HYR1 como objetivo para la inmunización activa y pasiva contra Candida**

30 Prioridad:

03.07.2009 US 223005 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.03.2017

73 Titular/es:

**LOS ANGELES BIOMEDICAL RESEARCH
INSTITUTE AT HARBOR-UCLA MEDICAL
CENTER (100.0%)
1124 West Carson Street
Torrance, CA 90502, US**

72 Inventor/es:

**FU, YUE;
LUO, GUANPINGSHENG;
IBRAHIM, ASHRAF;
SPELLBERG, BRAD, J. y
EDWARDS, JOHN, E., JR.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 606 555 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

HYR1 como objetivo para la inmunización activa y pasiva contra *Candida*

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a proteínas de pared celular hifal de *Candida*, a anticuerpos que resultan de una respuesta inmunitaria a la vacunación con proteínas de pared celular hifal de *Candida* y a métodos para la prevención y/o tratamiento de la candidiasis y otras infecciones bacterianas con proteínas de pared celular hifal de *Candida*.

Antecedentes de la invención

- 10 Cada año en los Estados Unidos [1] se producen aproximadamente 60.000 casos de candidiasis diseminada que resultan en gastos de miles de millones de dólares en asistencia sanitaria. Dada la tasa de mortalidad del 40 % en dichas infecciones, existe la necesidad de identificar nuevos objetivos profilácticos o terapéuticos para intervención.

- 15 El mecanismo de defensa primario del hospedador contra la candidiasis diseminada es la destrucción fagocítica del organismo [2, 3]. Solo los fagocitos son capaces de destruir directamente a *Candida in vitro* [4]. Además, treinta minutos después de la inoculación intravenosa de *Candida* en ratones, conejos, perros o humanos, las levaduras quedan retenidas dentro del sistema reticuloendotelial, especialmente en el hígado. El hígado, con abundantes macrófagos de Kupffer, es capaz de eliminar el 99,9 % de la levadura en el sistema porta durante una pasada simple [5], enfatizando la eficacia de los mecanismos de defensa fagocíticos contra el hongo. Por consiguiente, la resistencia de *C. albicans* a la destrucción fagocítica es una función de la virulencia del organismo importante.

- 20 Las proteínas ancladas por glicosilfosfatidilinositol (GPI, por sus siglas en inglés) en la superficie celular están en la principal interfaz entre el patógeno y el hospedador, lo que convierte a estas proteínas en probables participantes de las interacciones hospedador-patógeno [6].

La patente US 7.241.613B1 describe diversos polipéptidos que se encuentran en la pared celular de los organismos *Candida*, incluido HYR1 como la SEQ ID N.º:236 y la SEQ ID N.º:326 con la aspiración de prevenir o tratar la candidiasis.

- 25 La identificación de efectores en las vías de regulación del organismo que contribuyen a la virulencia ofrece la oportunidad de una intervención terapéutica con métodos o composiciones que son superiores a los agentes antifúngicos existentes. La identificación de proteínas de superficie celular o proteínas hifales que afectan una vía de regulación relacionada con la virulencia es particularmente prometedora porque la caracterización de la proteína posibilita técnicas inmunoterapéuticas que son probablemente superiores o sinérgicas con los agentes antifúngicos existentes para combatir una infección por *Candida*.

- 30 La virulencia de *C. albicans* se regula mediante diversos factores de virulencia putativos de los cuales la adherencia a los constituyentes del hospedador y la capacidad de transformarse de levadura a hifas están entre los más esenciales para determinar la patogenicidad. Aunque existen agentes antifúngicos potentes que son microbicidas para *Candida*, la mortalidad atribuible a candidemia es aproximadamente del 38 %, incluso con tratamiento con agentes antifúngicos potentes tales como anfotericina B. Además, los agentes existentes tales como anfotericina B tienden a exhibir una toxicidad indeseable. Aunque se pueden desarrollar antifúngicos adicionales que son menos tóxicos que la anfotericina B, es improbable que se desarrollen agentes más potentes. Por lo tanto, la inmunoterapia pasiva o activa para tratar o prevenir la candidiasis diseminada es una alternativa prometedora a la terapia antifúngica convencional.

- 40 Por consiguiente, existe la necesidad de inmunógenos eficaces que proporcionarán protección inmunitaria del hospedador y protección inmunitaria pasiva contra *Candida* y otros patógenos relacionados inmunogenéticamente. La presente invención satisface esta necesidad y proporciona además otras ventajas relacionadas.

Compendio de la invención

- 45 La presente invención se refiere al antígeno polipeptídico HYR1 de *Candida* y a los usos terapéuticos de dicho antígeno. El antígeno polipeptídico HYR1 de la presente invención puede utilizarse para tratar o prevenir la infección por *Candida* en un sujeto.

- 50 Al someter a barrido un nuevo sistema de sobreexpresión/supresión condicional enfocado en las proteínas ancladas por GPI en *C. albicans*, hemos identificado a *HYR1* como un factor de virulencia. *HYR1* es un gen coexpresado en hifas, cuya cepa con mutación completa no exhibe ninguna anomalía morfológica *in vitro* [7]. Más adelante proporcionamos resultados que demuestran que *HYR1* media la resistencia a la destrucción fagocítica *in vitro*, modula la carga fúngica tisular *in vivo* y es, por lo tanto, un objetivo de vacunación para reducir la gravedad de la candidiasis diseminada.

Definiciones

Un polipéptido «HYR1» un polipéptido que es sustancialmente idéntico a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 1. El fragmento del polipéptido HYR1 según la presente invención tiene al menos 95 %, 99 % o incluso 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 2.

- 5 Los fragmentos de HYR1 adicionales deseables contienen una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras en la secuencia de SEQ ID N.º: 2 y/o al menos un aminoácido flanqueador (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos flanqueadores) en el extremo N y/o C de la secuencia de SEQ ID N.º: 2. Otros fragmentos de HYR1 preferidos contienen siete o más aminoácidos continuos de la secuencia de SEQ ID N.º: 2.

- 10 «Sustancialmente idéntico» significa un polipéptido que exhibe al menos 95 % y de forma más deseable 99 % de identidad en la secuencia de aminoácidos con respecto a una secuencia de aminoácidos de referencia. La longitud de las secuencias de comparación es la secuencia de aminoácidos de longitud completa.

- 15 La identidad de secuencia se puede medir utilizando un programa informático de análisis de secuencias con su configuración predeterminada (por ejemplo, el Sequence Analysis Software Package del Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Dicho programa informático puede hacer coincidir secuencias similares al asignar grados de homología a diversas sustituciones, supresiones y otras modificaciones. También se pueden alinear múltiples secuencias utilizando el programa Clustal W(1.4) (producido por Julie D. Thompson y Toby Gibson del European Molecular Biology Laboratory, Alemania y el Desmond Higgins of European Bioinformatics Institute, Cambridge, RU) configurado en el modo de alineación en pares «lento» y con la inclusión en los parámetros de alineación en pares de una penalización por espacio abierto de 10,0 y una penalización por espacio de extensión de 0,1, con una configuración de matriz de similitud «blosun».
- 20 Además, los parámetros de alineación múltiple pueden incluir una penalización por espacio abierto de 10,0, una penalización por espacio de extensión de 0,1, así como una configuración de matriz de similitud «blosun», el divergente de retardo en 40 % y la distancia del espacio en 8.

- 25 Una «sustitución de aminoácidos conservadora», tal como se usa en la presente, significa un reemplazo en una secuencia de aminoácidos de un aminoácido por otro dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados por la naturaleza química de sus cadenas laterales.

- 30 Los aminoácidos codificados genéticamente se pueden dividir en cuatro familias: ácidos (aspartato, glutamato); básicos (lisina, arginina, histidina); no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano); y polares no cargados (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). Algunas veces, la fenilalanina, el triptófano y la tirosina se agrupan como aminoácidos aromáticos. De forma similar, los aminoácidos también se pueden separar en los siguientes grupos: ácidos (aspartato, glutamato); básicos (lisina, arginina, histidina); alifáticos (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina), con la agrupación opcional de serina y treonina por separado como alifáticos-hidroxilo; aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptófano); amida (asparagina, glutamina); y que contienen azufre (cisteína, metionina).

- 35 Se puede determinar si un cambio en la secuencia de aminoácidos resulta en un homólogo funcional evaluando la capacidad del péptido variante para funcionar de forma similar a la proteína natural mediante métodos estándares tales como los ensayos descritos en la presente.

- 40 Las realizaciones deseables de la invención incluyen al menos una sustitución de aminoácidos conservadora en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 2; y de forma más deseable 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácidos conservadoras en la secuencia de SEQ ID N.º: 2.

- 45 Un «aminoácido flanqueador» significa un aminoácido en una secuencia polipeptídica que está inmediatamente adyacente al extremo N o C de una secuencia definida específica. De forma deseable, un aminoácido flanqueador está presente en el extremo N y/o C de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 2 y de forma más deseable 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos flanqueadores están presentes en el extremo N y/o C de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 2.

Tal como se usa en la presente «proteína de fusión» hace referencia a un polipéptido que consiste en (1) el fragmento de HYR1; y (2) un compañero de fusión.

- 50 Tal como se usa en la presente «compañero de fusión» hace referencia a una secuencia heteróloga que puede fusionarse con el fragmento de HYR1. Los ejemplos de compañeros de fusión se describen en la presente e incluyen marcadores de detección, dominios estabilizadores o secuencias que auxilian en la producción o purificación de la proteína.

Tal como se usa en la presente, «respuesta inmunitaria» hace referencia a la activación de un sistema inmunitario del organismo en respuesta a un antígeno o agente infeccioso. En los vertebrados, la misma puede incluir, pero no se limita a, uno o más de los siguientes: maduración de linfocitos B indiferenciados en linfocitos B de memoria;

producción de anticuerpos mediante células plasmáticas (linfocitos B efectores); inducción de la inmunidad mediada por células; activación y liberación de citocina por parte de los linfocitos T CD4⁺; activación y liberación de citocina por parte de los linfocitos T CD8⁺; reclutamiento de citocina y activación de fagocitos (por ejemplo, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos); y/o activación del complemento.

5 «Inmunógeno» significa cualquier sustancia que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto.

«Sal farmacéuticamente aceptable» significa cualquier sal de adición de ácido o complejo metálico no tóxico que se utiliza en la industria farmacéutica. Los ejemplos de sales de adición de ácido incluyen ácidos orgánicos tales como ácido acético, láctico, pamoico, maleico, cítrico, málico, ascórbico, succínico, benzoico, palmítico, subérico, salicílico, tartárico, metanosulfónico, toluenosulfónico o trifluoroacético o similares; ácidos poliméricos tales como ácido tánico, carboximetilcelulosa o similares; y ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico o similares. Los complejos metálicos incluyen cinc, hierro y similares.

10 «Vehículo farmacéuticamente aceptable» significa cualquier disolución utilizada para solubilizar y administrar un agente a un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable deseable es solución salina. En realizaciones deseables, un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye un adyuvante. En la presente se describen adyuvantes de ejemplo. Otros vehículos farmacéuticamente aceptables y sus formulaciones son conocidos para un experto en la técnica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, (20ª edición), ed. A. Gennaro, 2003, Lippincott Williams & Wilkins.

20 «Aislado» significa una proteína (o un fragmento de la misma) que se ha separado de los componentes que la acompañan naturalmente. Típicamente, el polipéptido está sustancialmente «aislado» cuando está al menos 60 %, en peso, libre de las proteínas y otras moléculas orgánicas de origen natural con las cuales se asocia naturalmente. La definición también se extiende a un polipéptido separado de sus aminoácidos flanqueadores (por ejemplo, para una secuencia de aminoácidos, aislada hace referencia a una secuencia que está libre de los aminoácidos flanqueadores con los cuales se asocia naturalmente la secuencia en un polipéptido). Preferentemente, el polipéptido está al menos 75 %, más preferentemente al menos 90 % y más preferentemente al menos 99 %, en peso, aislado. Se puede obtener un polipéptido aislado mediante técnicas convencionales, por ejemplo, mediante extracción de una fuente natural (por ejemplo, purificación a partir de una célula infectada con *Candida*); mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica para un fragmento de HYR1; o mediante una proteína de fusión del mismo, sintetizando químicamente el polipéptido. El grado de pureza se puede medir mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliácridamida o análisis HPLC.

30 Una «cantidad terapéuticamente eficaz» significa una cantidad de un compuesto inmunógeno (por ejemplo, polipéptido, fragmento, proteína de fusión o vacuna) necesaria para generar en un sujeto uno o más de los siguientes efectos: una respuesta inmunitaria; una disminución en el nivel de infección por *Candida* (por ejemplo, una reducción de al menos 5 %, 10 %, 20 % o 30 %; de forma más deseable 40 %, 50 %, 60 % o 70 %; y de forma más deseable 80 % o 90 %); una disminución (por ejemplo, al menos una reducción de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o incluso del 100 %) en uno o más síntomas de la infección por *Candida* en un paciente; o resistencia aumentada a una nueva infección por *Candida* (por ejemplo, un aumento de al menos 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %; de forma más deseable 60 %, 70 %, 80 % o 90 %; o de forma más deseable 100 %, 200 % o 300 %).

40 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente Descripción detallada, los dibujos y las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Expresión condicional de *HYR1* potenciada por destrucción de *C. albicans*. mediada por neutrófilos y macrófagos. (A) Confirmación de la sobreexpresión/supresión condicional de *HYR1* de la cepa CAAH-31. Resultados de RT-PCR de *HYR1* que demuestran la sobreexpresión del gen en el medio -DOX y la ausencia de expresión en el medio +DOX. El fragmento de *EFB1* se coamplificó y sirvió como testigo. La ausencia de contaminación por ADN genómico en las preparaciones de ADNc se demostró por la ausencia de la banda de 919 bp que contenía el intrón de *EFB1*. THE31 fue la cepa testigo natural. (B) Se cultivaron cepas de *C. albicans* en YPD con DOX (supresión de *HYR1*) y sin DOX (sobreexpresión de *HYR1*) a 30°C durante toda la noche y luego se cocultivaron con neutrófilos humanos; (C) *C. albicans* cocultivado con neutrófilos derivados de HL-60; (D) con macrófagos derivados de HL-60.

Figura 2. La expresión de *HYR1* de *Candida albicans* aumentó la resistencia a la destrucción por neutrófilos humanos en el mutante completo *bcr1* o la cepa *C. glabrata*. (A y B) La expresión autónoma de *HYR1* en una cepa deficiente *bcr1* de *C. albicans* complementó completamente la hipersusceptibilidad de la cepa genitora a la resistencia a la destrucción por neutrófilos. Las cepas de *C. albicans* DAY 185 (natural), CJN702 (mutante completo *bcr1*) y CJN698 (*BCR1* complementada) CJN114, CJN1153, CJN1222, CJN1259, CJN1276, CJN1281 y CJN1288 (que expresan autónomamente *ALS1*, *ALS3*, *HWP1*, *HYR1*, *RBT5*, *CHT2* y *ECE1* en un fondo de mutante completo

bcr1, respectivamente) se cultivaron en YPD durante toda la noche a 30 °C. Los datos se muestran como la mediana $\pm$ intercuartil. * $P < 0,04$ con respecto a la cepa natural y complementada con *BCR1*. (C) La expresión heteróloga del gen *HYR1* de *C. albicans* aumentó la resistencia de *C. glabrata* a la destrucción mediada por neutrófilos derivados de HL-60. * $P < 0,0001$.

Figura 3. Detección de la expresión de *HYR1* durante la candidiasis diseminada aunque su expresión se inhibió inicialmente mediante neutrófilos *in vitro*. (A) Se cosecharon riñones, hígados, pulmones, bazo y cerebros 6 o 24 h después de la infección intravenosa con *C. albicans*. Se utilizó RT-PCR anidada para detectar la expresión de *HYR1*. Se utilizaron EFB1 de *C. albicans* y G3PDH del gen doméstico de ratón como testigo. + denota ratones infectados, mientras que - denota ratones no infectados. (B) Neutrófilos derivados de HL-60 inhibieron la expresión de *HYR1* de *C. albicans*. Se cultivó *C. albicans* natural en RPMI 1640 más suero humano concentrado al 10 %. Sin neutrófilos, la expresión de *HYR1* se detectó media hora después de la inducción. Con neutrófilos, la expresión de *HYR1* se inhibió dos horas.

Figura 4. Expresión de *HYR1* *in vivo* y su efecto sobre la carga fúngica. Para detectar la expresión de *HYR1* durante la candidiasis diseminada, se cosecharon riñones, hígados, pulmones, bazo y cerebros 6 o 24 h después de la infección intravenosa con *C. albicans*. Se utilizó RT-PCR anidada para detectar la expresión de *HYR1*. Se utilizaron EFB1 de *C. albicans* y G3PDH del gen doméstico de ratón como testigo. + denota ratones infectados, mientras que - denota ratones no infectados (A). La expresión condicional de *HYR1* aumentó la carga fúngica en órganos con abundantes fagocitos tisulares. Carga de *C. albicans* en hígados y bazo de ratones inmunocompetentes (n=8 por grupo) infectados con *HYR1* de *C. albicans* o cepa testigo cultivados en condiciones de expresión (-DOX) o supresión (+DOX) condicional (A) y la expresión de *HYR1* *in vivo* (B). Los hígados y bazo se cosecharon un día después de la infección. Los ejes y reflejan los límites inferiores de detección del ensayo. Los datos se muestran como la mediana $\pm$ intercuartil. * $P < 0,0001$ con respecto a ausencia de expresión de la cepa *HYR1* (*HYR1*-DOX) o la cepa testigo.

Figura 5. Inmunofluorescencia indirecta con suero anti-Hyr1p demuestra la expresión superficial de Hyr1p en hifas de *C. albicans*. La formación hifal se indujo al incubar *C. albicans* en RPMI 1640 durante 90 min. Las células se tiñeron con el suero anti-Hyr1p preabsorbido de mutante completo *hyr1* (1:100) o la preparación antiproteína del suero del clon plasmídico vacío (testigo negativo) y posteriormente se tiñeron con Ab antiraton etiquetado con Alexa.

Figura 6. Extremo N recombinante de Hyr1p (rHyr1p-N) protegido de forma notable contra candidiasis diseminada hematógicamente murina. (A) Supervivencia de ratones (8 ratones por grupo) vacunados con rHyr1p-N mezclado con adyuvante completo o incompleto de Freund e infectados a través de la vena de la cola con $2,2 \times 10^5$ blastoporos de SC5314 de *Candida albicans*. (B) Supervivencia de ratones (8 ratones por grupo, excepto el grupo testigo, que tenía 17 ratones) vacunados con rHyr1p-N o rHyr1p-N destoxificado mezclado con alhidrogel al 0,1 % e infectados con 7×10^5 blastoporos de 15563 de *Candida albicans*. * $p = 0,001$ mediante prueba de rango logarítmico. (C) Efecto de $F(ab)'_2$ vacunado o testigo en el bloqueo de la destrucción por neutrófilos de ratón de *hyr1* de *C. albicans* expresado o suprimidos condicionalmente. El testigo denota el ensayo llevado a cabo en ausencia de $F(ab)'_2$. Los datos se muestran como la mediana $\pm$ rango intercuartil. * $P = 0,001$ mediante prueba de Mann-Whitney.

Descripción detallada

Candida albicans es un patógeno común en humanos. Por ejemplo, *C. albicans*, aunque normalmente es un comensal inofensivo, puede provocar una variedad de afecciones que varían de una infección mucocutánea superficial tal como candidiasis vaginal y/o orofaríngea, hasta una implicación de órganos internos en la candidiasis diseminada. Antes de provocar la enfermedad, el hongo coloniza el tracto gastrointestinal y, en algunos casos, la piel y las membranas mucosas. La adherencia a las superficies de la mucosa del hospedador es un prerrequisito clave para esta etapa inicial. Luego de la colonización, *C. albicans* ingresa al torrente sanguíneo a través de dispositivos intravasculares infectados o mediante trans migración a través de la mucosa gastrointestinal comprometida por la quimioterapia o ulceraciones por estrés. A continuación los organismos se diseminan a través del torrente sanguíneo, se unen o penetran el endotelio vascular para salir del árbol vascular e invadir los órganos internos tales como el hígado, bazo y riñón.

La identificación y caracterización funcional de un fragmento de la proteína de *HYR1* completa descrita en la presente permite que este polipéptido se utilice de forma eficaz en el tratamiento de la candidiasis.

La naturaleza de la patogénesis de *C. albicans* por medio de la adherencia a células endoteliales se comenta en la patente estadounidense No. 5.578.309. Para obtener una descripción de un gen de *HYR1* y las características del mismo, incluida la caracterización del producto génico véase, Bailey et al. (Journal of Bacteriology 178:5353-5360, 1996).

La invención proporciona una vacuna que tiene el fragmento de *HYR1* aislado y opcionalmente un adyuvante en un medio farmacéuticamente aceptable. La vacuna puede ser un fragmento de *HYR1* derivado de una especie de *Candida* tal como *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* o *Candida parapsilosis*.

La invención utiliza el producto génico de la secuencia de HYR1 de *C. albicans* como una vacuna para tratar, prevenir o aliviar la candidiasis diseminada. La vacuna es eficaz contra diferentes cepas de *C. albicans* así como contra diferentes especies de *Candida*.

Por lo tanto, según un aspecto, la invención proporciona el fragmento de HYR1 que es útil cuando se formula en una composición farmacéutica y se administra como una vacuna con o sin un adyuvante. El fragmento de HYR1 puede originarse de *Candida* y puede obtenerse, por ejemplo, de especies que pertenecen a géneros *Candida*, por ejemplo *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* y *Candida tropicalis*. El fragmento de HYR1 se puede obtener en forma aislada o purificada y, por lo tanto, según una realización de la invención el fragmento de HYR1 se formula como una vacuna para provocar una respuesta inmunitaria en un paciente para desencadenar una respuesta inmunitaria contra *Candida*.

La invención proporciona además un método para tratar o prevenir la candidiasis diseminada. El método incluye la administración de una cantidad inmunógena de una vacuna del fragmento de HYR1. La vacuna pueden administrarse con o sin un adyuvante. El fragmento de HYR1 se puede derivar de diferentes cepas de *Candida* así como de diferentes especies de *Candida* tales como *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* y *Candida parapsilosis*.

La eficacia de las vacunas de la invención contra diferentes cepas de *Candida*, diferentes especies de *Candida*, otras bacterias y agentes infecciosos y su amplio rango de actividad inmunitaria se evalúan de acuerdo con métodos estándares tales como los que se describen adicionalmente más adelante.

Dadas las enseñanzas y guías que se proporcionan en la presente, los expertos en la técnica entenderán que se pueden emplear métodos inmunoterapéuticos conocidos en la técnica con los fragmentos de HYR1 en una composición farmacéuticamente aceptable administrada como una vacuna con o sin un adyuvante. A los efectos de la presente invención, los términos «farmacéutico/a» o «farmacéuticamente aceptable» hacen referencia a composiciones formuladas mediante técnicas conocidas para que sean no tóxicas y, cuando se desea, se utilizan como vehículos o aditivos que pueden administrarse de forma segura a humanos. La administración se puede llevar a cabo utilizando vías conocidas incluidas, por ejemplo, inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea. Dichas vacunas de las invenciones también pueden utilizarse como tampones, sales u otros disolventes conocidos para estos expertos en la técnica para conservar la actividad de la vacuna en disolución. De forma similar, cualquier de una amplia gama de adyuvantes conocidos en la técnica se puede emplear con la vacuna de la invención para desencadenar, promover o potenciar una respuesta inmunitaria terapéuticamente eficaz capaz de reducir o bloquear la unión, invasión y/o infección de *Candida* en una célula hospedadora susceptible.

Se entenderá que modificaciones que no afectan sustancialmente la actividad de diversas realizaciones de la presente invención están también incluidas dentro de la definición de la invención proporcionada en la presente. Por consiguiente, los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la invención, pero no limitar, la presente invención.

Ejemplo I

Hyr1p de *Candida albicans* confiere resistencia a la destrucción por neutrófilos y es un objetivo para vacuna

Tal y como se comenta anteriormente, *Candida albicans* es la causa más común de infecciones fúngicas invasivas en humanos. No está claro cómo *C. albicans* escapa al ataque fagocítico y sobrevive al ambiente hostil sanguíneo durante infecciones sistémicas que representan un peligro de muerte. Mediante el uso de una estrategia genética de sobreexpresión/supresión, descubrimos que el gen de *HYR1* reducía la destrucción fagocítica de *C. albicans in vitro* y aumentaba la carga fúngica tisular *in vivo*. De forma coincidente con su regulación positiva mediante el factor de transcripción Bcr1p, *HYR1* complementó la hipersusceptibilidad a la destrucción mediada por fagocitos de un mutante completo *bcr1* de *C. albicans in vitro*. Además, la expresión heteróloga de *HYR1* en *Candida glabrata* volvió al organismo más resistente a la destrucción por neutrófilos. Finalmente, la vacunación con Hyr1p recombinante protegió de forma significativa a ratones contra la candidiasis diseminada de forma hematógena. Por lo tanto, Hyr1 es un factor de virulencia importante para *C. albicans*, que media la resistencia a la destrucción por fagocitos. Por consiguiente, Hyr1p es un objetivo para la vacuna u otra intervención por molécula inmunológica o pequeña para mejorar los resultados de la candidiasis diseminada.

Resultados

La expresión condicional de *HYR1* en blastoporos potenció significativamente la resistencia de *C. albicans* a la destrucción mediada por fagocitos *in vitro*

Para estudiar la función de *HYR1*, construimos una cepa de sobreexpresión/supresión condicional de *C. albicans*, CAAH-31. En CAAH-31, un alelo de *HYR1* se controló mediante un promotor regulado por tetraciclina (TR) y el otro alelo se alteró. Mediante RT-PCR semicuantitativa, confirmamos que *HYR1* se expresaba de forma abundante cuando los blastoporos de CAAH-31 se cultivaban en medios sin DOX, y no se detectó en presencia de DOX (Fig. 1A). Tal como se esperaba, *HYR1* no se detectó en blastoporos naturales (THE31) debido a que *HYR1* es un gen

coexpresado hifal (Fig. 1A).

La cepa de sobreexpresión condicional de *HYR1*, CAAH-31, y el testigo natural THE31 tuvieron tasas de crecimiento idénticas, independientemente de la presencia o ausencia de DOX (tiempo duplicado para la cepa testigo natural sin DOX= $1,51 \pm 0,29$ hr y con DOX= $1,51 \pm 0,38$ hr; tiempo duplicado para la cepa CAAH-31 sin DOX= $1,39 \pm 0,30$ hr y con DOX= $1,35 \pm 0,19$ hr). También evaluamos el impacto de la sobreexpresión de *HYR1* sobre la acumulación normal de otras proteínas ancladas por GPI en la superficie celular. Mediante inmunofluorescencia directa, confirmamos que la sobreexpresión de *HYR1* no tuvo un impacto directo sobre la acumulación de la proteína anclada por GPI Als1p (no se muestran los datos) [8].

Durante un barrido de rutina para fenotipos asociados con la virulencia, determinamos el impacto de la sobreexpresión condicional de *HYR1* en la destrucción de *Candida* mediante fagocitos humanos. *C. albicans* que expresaba *HYR1*(CAAH-31 -DOX) fue significativamente más resistente a la destrucción mediada por neutrófilos humanos que *C. albicans* natural (que no expresa *HYR1* en la fase de blastoporo) y que *C. albicans* con *HYR1* suprimido (CAAH-31 +DOX) (Fig. 1B). Este fenotipo no se debió a DOX, dado que la destrucción no fue significativamente diferente entre el testigo natural y *C. albicans* con *HYR1* suprimido (+DOX).

También llevamos a cabo ensayos de destrucción de *Candida* utilizando la línea celular HL-60, que se puede diferenciar en neutrófilos o macrófagos [9, 10]. Al igual que con neutrófilos humanos recientemente cosechados, la sobreexpresión condicional de *HYR1* redujo la destrucción de los blastoporos de *C. albicans* por neutrófilos (Fig. 1C) y macrófagos (Fig. 1D) de HL-60 *in vitro*.

Hipersusceptibilidad a la destrucción por neutrófilos del mutante completo *bcr1* de *C. albicans* se complementó mediante la expresión de *HYR1* *in vitro*

Dado que *HYR1* es un gen posterior del regulador de transcripción positivo Bcr1p [17], elaboramos la hipótesis de que la alteración de *bcr1* exacerbaría la susceptibilidad a la destrucción por neutrófilos en condiciones que promueven que *C. albicans* natural exprese *HYR1* (es decir, durante la formación hifal). Por lo tanto, inducimos la formación de tubos germinales en *C. albicans* al incubar las células en RPMI con FBS al 10 % a 37°C durante 40 min. Se sabe que esta condición induce la expresión de *HYR1* [18], y resultó en tubos germinales suficientemente cortos para que no se formaran hifas extensas, posibilitando así la cuantificación de las unidades formadoras de colonias (UFC) en nuestro ensayo de destrucción. Comparamos la destrucción por neutrófilos de la cepa mutante completo *bcr1* (CJN702), una cepa complementada con *BCR1* en el fondo de mutante completo *bcr1* (CJN698) y una cepa de *C. albicans* natural (DAY185). El mutante completo *bcr1* fue hipersusceptible a la destrucción mediada por neutrófilos en comparación con las cepas complementada con *BCR1* y natural (Fig. 2A). Además, la hipersusceptibilidad a la destrucción de *C. albicans* carente de *bcr1* se complementó de forma completa mediante la expresión autónoma de *HYR1* en el fondo del mutante *bcr1*, pero no mediante otros genes codificantes de superficie celular regulados por Bcr1p [17] (Fig. 2A y 2B).

La resistencia de *C. albicans* que sobreexpresa *HYR1* a la destrucción por fagocitos puede recapitularse mediante expresión heteróloga de *HYR1* en *C. glabrata*

Para definir adicionalmente el fenotipo de virulencia mediado por *HYR1*, expresamos el gen de forma heteróloga en *C. glabrata* BG14 [19] utilizando un plásmido pGRB2.2 portador de un promotor *PGK1* constitutivo [11]. También generamos un BG14 de *C. glabrata* transformado con el plásmido vacío, como testigo negativo. La expresión de *HYR1* en *C. glabrata* resultó en una reducción del 75 % en la destrucción por neutrófilos derivados de HL-60 *in vitro*, en comparación con *C. glabrata* transformado con un plásmido vacío (Fig. 2C).

Los neutrófilos inhiben la expresión de *HYR1* en *Candida*

Dado que la sobreexpresión condicional de *HYR1* confirió a *Candida* resistencia a la destrucción mediada por neutrófilos, utilizamos RT-PCR para estudiar la expresión de *HYR1* en *C. albicans* natural (SC5314) en respuesta a neutrófilos derivados de HL-60 *in vitro*. *HYR1* se expresó rápidamente 30 min después de la exposición a media que contenía suero y la expresión se mantuvo alta durante 2,5 hr durante el cultivo (Fig. 3A). Sin embargo, cuando *C. albicans* se expuso a neutrófilos derivados de HL-60 en cultivo, incluso en la presencia de suero, la expresión de *HYR1* se inhibió hasta 2 hr en el cocultivo (Fig. 3A).

C. albicans natural expresa *HYR1* durante la candidiasis diseminada de forma hematogena, lo que resultó en una carga fúngica tisular aumentada en órganos ricos en fagocitos

Para determinar si *HYR1* se expresaba durante la candidiasis diseminada de forma hematogena, se cosecharon cinco órganos principales, cerebro, hígado, pulmón, bazo y riñón, de ratones infectados con la cepa de *C. albicans* natural después de 6 y 24 hr de infección. Se utilizó un ensayo RT-PCR anidado mejorado [20] para evaluar la expresión de *HYR1* *in vivo*. La expresión de *HYR1* se detectó en los cinco órganos (Fig. 3B).

La sobreexpresión de *HYR1* aumentó y la supresión de *HYR1* disminuyó la carga fúngica en el hígado y el bazo

(Fig. 4A). Además, confirmamos que la cepa sobreexpresada tenía niveles significativamente más altos de *HYR1* que la cepa natural en hígados; la cepa suprimida demostró una tendencia a niveles reducidos (Fig. 4B). En cambio, la expresión de *HYR1* no alteró de forma significativa la carga fúngica en el riñón (no se muestran los datos), un órgano que carece de fagocitos residentes.

5 *rHyr1p-N* como candidato para vacuna

En función del análisis secuencial, se prevé que Hyr1p es una proteína de superficie celular [7]. Para confirmarlo, generamos un Hyr1p de extremo N recombinante en *E. coli* transformado con un clon de expresión que incluye los aminoácidos 25-350 de la secuencia codificante (rHyr1p-N). Se preabsorbió suero de ratones inmunizados con rHyr1p-N contra el mutante completo *hyr1* de *C. albicans* [7], posteriormente se procedió a la inmuno-tinción en hifas naturales. Hallamos que la pared celular de las hifas de *C. albicans* naturales presentaban tinción abundante (Fig. 5), lo que confirma que se expresa en la superficie celular y, por consiguiente, está expuesto al sistema inmunitario.

Dado que Hyr1p es como una proteína de superficie celular, que confiere resistencia a la destrucción de *Candida* por fagocitos, buscamos determinar su potencial como candidato para vacuna. Los ratones se vacunaron con rHyr1p-N más adyuvante o adyuvante solo. Dos semanas después del refuerzo, los ratones se infectaron a través de la vena de cola con SC5314 de *C. albicans* altamente virulenta. La vacunación con rHyr1p-N mejoró de forma marcada la supervivencia de ratones en comparación con aquellos vacunados solo con adyuvante (62,5 y 0 % de supervivencia a los 35 días, respectivamente) (Fig. 6A).

La vacunación con rHyr1p-N mezclado con adyuvante completo o incompleto de Freund o alumbre mejoró la supervivencia de ratones en comparación con aquellos vacunados con adyuvante solo (Figura 6A y 6B).

Destrucción por neutrófilos mejorada por suero anti-rHyr1p en ratones mediante inhibición directa de la función de resistencia a neutrófilos de Hyr1p.

El efecto protector de la vacuna rHyr1p-N sugirió que el suero anti-rHyr1p podría ser capaz de neutralizar la función protectora de Hyr1p en *C. albicans*. Para determinar si los anticuerpos anti-rHyr1p podrían inhibir directamente la función de Hyr1p, aislamos y preparamos fragmentos F(ab)₂ de la IgG total de ratones inmunizados con rHyr1p-N o el testigo (preparación producida a partir de células de *E. coli* transformadas con el plásmido vacío). Hallamos que F(ab)₂ del suero inmune pero no del testigo, fue capaz de restaurar la destrucción por neutrófilos de la cepa de expresión condicional *HYR1* hasta niveles equivalentes a los de la cepa de supresión (Figura 6C).

Compendio

En este estudio, demostramos que *HYR1*, un gen coexpresado hifal [7, 21], codifica para un factor de resistencia a fagocitos en *Candida*. La expresión condicional de *HYR1* en blastoporos de *Candida* provocó que el hongo fuese más resistente a la destrucción por fagocitos en comparación con los blastoporos de *C. albicans* natural. Además, la función de *HYR1* en *C. albicans* se recapituló al expresar de forma heteróloga el gen en *C. glabrata in vitro*. También hallamos que una cepa que carece de Bcr1p, un factor de transcripción que regula positivamente la expresión de *HYR1* [17], exhibía susceptibilidad mejorada a la destrucción mediada por fagocitos. La hipersusceptibilidad a la destrucción por fagocitos del mutante completo *bcr1* se complementó totalmente mediante *HYR1* expresado autónomamente, pero no por otros genes que codifican para proteínas de GPI reguladas positivamente por Bcr1p. Por lo tanto, *HYR1* es un gen posterior de *BCR1* en una vía de resistencia a la destrucción por fagocitos.

Es interesante que los neutrófilos derivados de HL-60 fueron capaces de inhibir la expresión de *HYR1* en *C. albicans* natural durante el contacto inicial entre los fagocitos y *Candida*. Por consiguiente, se produjo una interacción dinámica entre los fagocitos hospedadores y *C. albicans*, en la que los fagocitos mediaron un retardo en la expresión de un gen de resistencia a fagocitos en el hongo natural. Esto coincide con un hallazgo previo de que los neutrófilos humanos retardaron la formación de hifas de *C. albicans* y la expresión de los genes coexpresados de hifas [18].

La resistencia a la destrucción por fagocitos es un fenotipo complejo, probablemente atribuible a múltiples factores. Los fagocitos pueden destruir a *Candida* de forma extracelular o intracelular. Recientemente, se caracterizaron las dismutasas de superóxido de superficie celular de *C. albicans* como factores de virulencia que ayudan a los hongos a escapar de la destrucción al degradar especies de oxígeno altamente reactivas derivadas del hospedador [22]. Los neutrófilos típicamente se acoplan y expanden por las superficies de las formas hifales de los hongos, dados que las hifas extendidas son demasiado grandes para que los fagocitos las ingieran completamente. Dado que *C. albicans* expresa *HYR1* en la forma hifal, es posible que Hyr1p contribuya a la resistencia a la destrucción por fagocitos al evitar el contacto superficial con el fagocito. Alternativamente, Hyr1p podría interferir con mecanismos de destrucción oxidativos o no oxidativos de los fagocitos.

El fenotipo *in vitro* de la sobreexpresión de *HYR1* se recapituló *in vivo*. Durante la infección diseminada murina, la sobreexpresión de *HYR1* condujo a un aumento significativo, y la supresión de *HYR1* conjunto a una disminución significativa, en la carga fúngica tisular en comparación con la cepa natural en órganos con fagocitos residentes. La

falta de fenotipo en el riñón refleja probablemente el hecho de que los riñones no tienen fagocitos residentes y que el influjo de neutrófilos hacia dentro de los riñones durante la candidiasis diseminada mortal solo comienza > 24 hr de la infección [15]. Sin embargo, la vacuna con rHyr1p-N resultó en una protección considerable contra la candidiasis diseminada de forma hematógena. La eficacia observada para la vacuna de rHyr1p-N fue mayor que la observada previamente en ratones vacunados con las vacunas rAls1p-N y rAls3p-N. Por lo tanto, rHyr1p-N es una vacuna candidata prometedora para la candidiasis diseminada.

Nuestros datos también demuestran la ventaja de utilizar un abordaje de sobreexpresión/supresión condicional para explorar las potenciales funciones de virulencia de un gen dado. Los abordajes genéticos directos a gran escala para explorar los genes de virulencia *in vitro* requieren ensayos de barrido funcionales y se limitan a barridos de genes que se expresan mientras se lleva a cabo el ensayo. Cuando un gen no se expresa significativamente en la cepa natural en condiciones utilizadas para el ensayo de barrido *in vitro*, la sobreexpresión forzada permite aún así la detección de un fenómeno de adquisición de función en el ensayo, tal como es el caso de *HYR1* durante el crecimiento de los blastoporos de *Candida*. Cuando un gen se expresa intensamente, la supresión condicional del gen proporciona un fenotipo de pérdida de función en el mismo ensayo. Además, cuando la sobreexpresión y la supresión se utilizan simultáneamente, el fenotipo puede amplificarse, tal como es el caso del efecto de *HYR1* en las cargas fúngicas en hígado y bazo *in vivo*. La capacidad para detectar un fenotipo al comparar la sobreexpresión y supresión de un gen posibilita que la expresión del gen condicional supere las limitaciones de la redundancia funcional, que abunda particularmente en los abordajes genéticos directos cuando se están estudiando miembros de una familia de genes.

En resumen, utilizamos un abordaje de expresión génica condicional para identificar a Hyr1p como un factor de virulencia expresado en la superficie para *C. albicans*. La expresión de *HYR1* medió la resistencia a la destrucción por neutrófilos *in vitro* y aumentó la carga fúngica tisular *in vivo*. Finalmente, demostramos que *HYR1* es un objetivo de vacuna prometedor que debe desarrollarse adicionalmente como una estrategia profiláctica para la candidiasis diseminada.

Materiales y métodos

Los Resultados descritos anteriormente se obtuvieron utilizando los siguientes materiales y métodos.

Cepas y condiciones de cultivo

Todas las cepas utilizadas se indican en la Tabla 1 y se cultivaron tal como se describió anteriormente [8].

Construcción del mutante de sobreexpresión/supresión condicional de *HYR1*

Para generar una cepa de expresión de *HYR1* condicional, se insertó un casete promotor *HIS1-TR* [8] frente a un alelo del gen de *HYR1* de la cepa THE4, produciendo la cepa CAAH. El *URA3* en el locus *HIS1* en la cepa CAAH se puso en forma de bucle, generando CAAH-1. El segundo alelo de *HYR1* en CAAH-1 se alteró mediante un casete *URA3* reciclable, generando la cepa CAAH-2, posteriormente se puso en forma de bucle *URA3* para proporcionar la cepa CAAH-3. Se insertó un fragmento de 3,9 kb *Nhe I-Pst I* que contenía el gen *URA3-IRO1* en su locus original en el genoma de CAAH-3, proporcionado CAAH-31. Los cebadores utilizados se indican en la Tabla 1.

RT-PCR semicuantitativa

La RT-PCR semicuantitativa para detectar la expresión génica *in vitro* se describió anteriormente. Los cebadores utilizados para detectar la expresión de *EFB1* fueron EFB1a y EFB1b; los cebadores utilizados para amplificar *HYR1* fueron *HYR1* específico 1 y *HYR1* específico 2 (Tabla 1). Para estudiar el impacto de los neutrófilos en la expresión de *HYR1* de *C. albicans*, se cocultivaron durante toda la noche 1×10^6 células de SC5314 cultivadas en YPD con 1×10^7 neutrófilos derivados de HL-60 o se cultivaron solas en RPMI 1640 más suero humano concentrado al 10 %. Se tomaron muestras en intervalos de 30 min durante 3 hr hasta que se extrajo el ARN y se llevó a cabo la RT-PCR semicuantitativa.

Ensayos de destrucción por fagocitos

Se aislaron neutrófilos humanos, las células HL-60 se diferenciaron en neutrófilos o macrófagos y el ensayo de destrucción por fagocitos se llevó a cabo tal como se describió anteriormente [8-10]. Brevemente, se incubaron fagocitos con hongos durante 1 hr y luego se sometieron a ultrasonido y se cultivaron cuantitativamente. El porcentaje de destrucción se calculó al dividir la cantidad de colonias fúngicas tras la coincubación con fagocitos entre la cantidad de colonias fúngicas incubadas con medios sin fagocitos. Los neutrófilos humanos y los neutrófilos y macrófagos derivados de HL-60 se sometieron a prueba a una relación 2:1 y 20:1 fagocito:hongo, respectivamente. Para *bcr1* y mutantes relacionados, los blastoporos se pregerminaron durante 40 min en RPMI más FBS al 10 % a 37°C antes de llevar a cabo el ensayo.

Expresión heteróloga de *HYR1* en BG14 de *C. glabrata*

BG14 de *C. glabrata* se transformó con un vector de expresión de *HYR1* pGRB2.2-*HYR1* o un plásmido testigo vacío pGRB2.2 [11]. La secuencia codificante de *HYR1* se amplificó mediante CG-Hyr1-a y CG-Hyr1-b (Tabla 1) y se colonó en los sitios *Xba I*, *Xho I* de pGRB2.2 utilizando el In-Fusion™ 2.0 Dry-Down PCR Cloning Kit según las instrucciones del fabricante (Clontech Laboratories, Mountain View, CA).

5 Expresión de *HYR1* de *C. albicans* durante la infección hematológica

La expresión de *HYR1* por SC5314 *C. albicans* natural se examinó durante la candidiasis diseminada hematológicamente tal como se describe. Se recogieron cerebros, hígados, pulmones, riñones y bazo de ratones BALB/C luego de 6 y 24 hr de la infección. Los cebadores utilizados se indican en la Tabla 1. La transcripción inversa se llevó a cabo con RETROscript (Ambion, Texas). Para la amplificación del gen doméstico *G3PDH* de ratón se utilizaron los cebadores *G3PDHF* y *G3PDHR*. Para la detección de *HYR1* y *EFB1* de *C. albicans*, se llevaron a cabo dos pasadas de PCR. En la pasada uno se utilizó el conjunto de cebadores externos (*EFB1F* y *EFB1R* para *EFB1*, o *P2* y *P5* para *HYR1*); en la pasada dos se utilizó una alícuota (1 µl) del producto de PCR la pasada uno como plantilla. El conjunto de cebadores internos fue el siguiente: *EFB1nF* y *EFB1nR* (para *EFB1*), o *P2* y *P4* (para *HYR1*). Todas las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización a 95 °C, 2 min y amplificación durante 35 ciclos a 94 °C, 30 s (desnaturalización), 55 °C, 30 s (apareamiento) y 72 °C, 90 s (extensión). Para qRT-PCR el ADNc se preparó tal como se indicó anteriormente. Los ensayos de optimización de la eficacia de la amplificación y RT-PCR en tiempo real con verde SYBR se llevaron a cabo tal como se describe [12]. Se utilizó *ACT1* expresado constitutivamente como testigo para todas las reacciones. Los cálculos y análisis estadísticos se llevaron a cabo tal como se describe en ABI PRISM 7000 Sequence Detection System User Bulletin 2 (Applied Biosystems, EE. UU.).

Carga fúngica tisular

Se dio agua a los ratones con o sin DOX (2 mg/ml) disuelto en disolución de sacarosa al 5 % a lo largo de todo el período del experimento comenzando el día -3 con respecto a la infección [13] y se les dio alimentos y agua ad libitum. La carga fúngica tisular se llevó a cabo tal como se describió anteriormente [8] excepto que los órganos se retiraron 1 día después de la infección. Todos los procedimientos que se realizaron con ratones fueron aprobados por el comité de uso y cuidado animal institucional, siguiendo las directrices del NIH (siglas en inglés para Instituto nacional de salud).

Producción de rHyr1p-N

Se produjo rHyr1p-N (a partir de los aminoácidos 25-350 de Hyr1p) en un sistema de expresión pQE-32 de *Escherichia coli* (Qiagen) y la proteína etiquetada con 6XHis se purificó tal como se describe en otra parte de la presente [14], con la excepción del uso de una columna de afinidad con resina HisPur Cobalt (Thermo Scientific). Se extrajo la endotoxina de rHyr1p-N mediante el uso de Detoxi-Gel Endotoxin Removing Columns (Thermo Scientific) y se determinó el nivel de endotoxina con *Limulus Amebocyte Lysate* endochrome (Charles River) según las instrucciones del fabricante. Utilizando este procedimiento, la endotoxina se redujo hasta <0,28 EU por dosis utilizada para vacunación.

Detección de inmunofluorescencia de localización celular de Hyr1p

La inmunofluorescencia indirecta se llevó a cabo utilizando antisueros policlonales antiHyr1p generados mediante inmunización de ratones con rHyr1p-N (de los aminoácidos 25-350). Se incubó un inóculo de 1×10^7 blastoporos de la cepa completa *hyr1* en RPMI 1640 durante 90 min a 37 °C y se granularon dos veces para absorber el antisuero.

Se pregerminaron blastoporos de *C. albicans* (1×10^5) en RPMI 1640 durante 90 min a 37 °C y se transfirieron a un portaobjetos de cámara de 4 pocillos (Nalge Nunc International Corp, IL, EE.UU.). Tras la incubación a 4 °C durante 30 min, las células se bloquearon con 300 µl de 1,5 % de suero de cabra, se tiñeron con antisuero policlonal en una dilución de 1:100 o PBS como testigo negativo y luego con IgG antirratón de cabra etiquetado con isotiocianato a 1:200. Se obtuvieron imágenes de las células mediante microscopía con láser confocal de barrido [15].

45 Protocolo de inmunización

Todas las vacunas fueron subcutáneas, en la base del cuello. Se vacunó a ocho ratones C57BL/6 jóvenes (de 10 a 12 semanas) con 20 µg de rHyr1p-N purificado por afinidad en adyuvante completo de Freund y se reforzó en adyuvante incompleto de Freund (IFA) a las 3 semanas. Ocho ratones jóvenes adicionales recibieron adyuvante solo mezclado con la preparación producida a partir de células *E. coli* transformadas con el plásmido vacío. Catorce días después del refuerzo, los ratones se infectaron a través de la vena de cola con 5×10^5 células SC5314 de *C. albicans* natural [16].

La eficacia de rHyr1p-N en la protección contra la candidiasis diseminada hematológicamente también se evaluó utilizando alumbre (2% Alhydrogel; Brenntag Biosector), un adyuvante aprobado por la Dirección de Fármacos y Alimentos (de los Estados Unidos) para uso en humanos. Además, para determinar que rHyr1p-N era protectora

contra otras cepas de *C. albicans*, utilizamos otro aislado clínico, la cepa 15563. Para estos experimentos, se mezclaron 33 µg de rHyr1p-N purificado por afinidad con alhidrogel al 0,1 % y se administraron a ratones BALB/c tal como se indicó anteriormente el día 0, se reforzaron el día 21 y luego se infectaron el día 35 con *C. albicans* a través de inyección en la vena de la cola. Para todos los experimentos de vacunación, la supervivencia de los ratones durante 35 días después de la infección se utilizó como punto final.

Ensayo de bloqueo de F(ab)₂. Se recogió suero anti-Hyr1p concentrado o testigo de 5 ratones que se vacunaron con rHyr1p-N o con la preparación producida a partir de células *E. coli* transformadas con el plásmido vacío. La IgG total de ambos sueros se aisló utilizando Nab Spin Kit (Thermo Scientific). Los fragmentos F(ab)₂ se purificaron con Pierce F(ab)₂ Preparation Kit según las instrucciones del fabricante. Se opsonizaron células de *Candida* sobre hielo durante 45 min con suero del ratón normal al 5 % (Santa Cruz Biotechnology) o suero de ratón normal al 5 % más F(ab)₂ al 5 % preparado a partir de IgG de ratones vacunados con rHyr1p-N o testigo antes de mezclarlas con los neutrófilos de ratón. El ensayo de destrucción por neutrófilos de ratón se describió anteriormente.

Análisis estadístico

La destrucción mediada por fagocitos y las cargas fúngicas tisulares entre diferentes grupos se compararon mediante la prueba U de Mann-Whitney para comparaciones no apareada, según corresponda. Se utilizó la prueba de rango logarítmico no paramétrico para determinar las diferencias en los tiempos de supervivencia. Los valores P <0,05 se consideraron significativos.

Tabla 1 Cepas y oligonucleótidos utilizados en el presente estudio

Cepas		
<i>Candida albicans</i>	Genotipo	Fuente
Cepas		
THE31	<i>ade2::hisG/ade2::hisG</i>	[8]
	<i>HIS1/his1::dpl200</i>	
	<i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434::URA3-IRO1</i>	
	<i>ENO1/ENO1-tetR-ScHAP4AD-3XHA-ADE2</i>	
CAAH	<i>ade2::hisG/ade2::hisG</i>	[8]
	<i>his1::URA3-dpl200/his1::dpl200</i>	
	<i>ura3-iro1::imm434/ ura3-iro1::imm434</i>	
	<i>ENO1/ENO1-tetR-ScHAP4AD-3XHA-ADE2</i>	
	<i>HYR1/HIS1-pTR-HYR1</i>	
CAAH-1	<i>ade2::hisG/ade2::hisG</i>	Este estudio
	<i>his1::dpl200/his1::dpl200</i>	
	<i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434</i>	
	<i>ENO1/ENO1-tetR-ScHAP4AD-3XHA-ADE2</i>	
	<i>HYR1/HIS1-pTR-HYR1</i>	

Cepas		
<i>Candida albicans</i>	Genotipo	Fuente
Cepas		
CAAH-2	<i>ade2::hisG/ade2::hisG</i>	Este estudio
	<i>his1::dpl200/his1::dpl200</i>	
	<i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434</i>	
	<i>ENO1/ENO1-tetR-ScHAP4AD-3XHA-ADE2</i>	
	<i>hyr1::URA3-dpl200/HIS1-pTR-HYR1</i>	
CAAH-3	<i>ade2::hisG/ade2::hisG</i>	Este estudio
	<i>his1::dpl200/his1::dpl200</i>	
	<i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434</i>	
	<i>ENO1/ENO1-tetR-ScHAP4AD-3XHA-ADE2</i>	
	<i>hyr1::dpl200/HIS1-pTR-HYR1</i>	
CAAH-31	<i>ade2::hisG/ade2::hisG</i>	Este estudio
	<i>his1::dpl200/his1::dpl200</i>	
	<i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434::URA3-IRO1</i>	
	<i>ENO1/ENO1-tetR-ScHAP4AD-3XHA-ADE2</i>	
	<i>hyr1::dpl200/HIS1-pTR-HYR1</i>	
DAY185	<i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434</i>	[17]
	<i>his1::hisG::pHIS1/his1::hisG</i>	
	<i>arg4::hisG::ARG4-URA3/arg4::hisG</i>	
CJN702	<i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434</i>	[17]
	<i>his1::hisG::pHIS1/his1::hisG</i>	
	<i>arg4::hisG/arg4::hisG</i>	
	<i>bcr1::ARG4/bcr1::URA3</i>	

Cepas		
<i>Candida albicans</i>	Genotipo	Fuente
Cepas		
CJN698	<i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434</i>	[17]
	<i>his1::hisG::pHIS1-BCR1/his1::hisG</i>	
	<i>arg4::hisG/arg4::hisG</i>	
	<i>bcr1::ARG4/bcr1::URA3</i>	
CJN1144	<i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434</i>	[17]
	<i>his1::hisG::pHIS1-P_{TEF1}-ALS1-t_{TEF1}/his1::hisG</i>	
	<i>arg4::hisG/arg4::hisG</i>	
	<i>bcr1::ARG4/bcr1::URA3</i>	
CJN1153	<i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434</i>	[17]
	<i>his1::hisG::pHIS1-P_{TEF1}-ALS3-t_{TEF1}/his1::hisG</i>	
	<i>arg4::hisG/arg4::hisG</i>	
	<i>bcr1::ARG4/bcr1::URA3</i>	
CJN1222	<i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434</i>	[17]
	<i>his1::hisG::pHIS1-P_{TEF1}-HWP1-t_{TEF1}/his1::hisG</i>	
	<i>arg4::hisG/arg4::hisG</i>	
	<i>bcr1::ARG4/bcr1::URA3</i>	
CJN1259	<i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434</i>	[17]
	<i>his1::hisG::pHIS1-P_{TEF1}-HYR1-t_{TEF1}/his1::hisG</i>	
	<i>arg4::hisG/arg4::hisG</i>	
	<i>bcr1::ARG4/bcr1::URA3</i>	
CJN1276	<i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434</i>	[17]
	<i>his1::hisG::pHIS1-P_{TEF1}-RBT51-t_{TEF1}/his1::hisG</i>	
	<i>arg4::hisG/arg4::hisG</i>	

Cepas		
<i>Candida albicans</i>	Genotipo	Fuente
Cepas		
	<i>bcr1::ARG4/bcr1::URA3</i>	
CJN1281	<i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434</i>	[17]
	<i>his1::hisG::pHIS1-P_{TEF1}-CHT2-t_{TEF1}/his1::hisG</i>	
	<i>arg4::hisG/arg4::hisG</i>	
	<i>bcr1::ARG4/bcr1::URA3</i>	
CJN1288	<i>ura3-iro1::imm434/ura3-iro1::imm434</i>	[17]
	<i>his1::hisG::pHIS1-P_{TEF1}-ECE1-t_{TEF1}/his1::hisG</i>	
	<i>arg4::hisG/arg4::hisG</i>	
	<i>bcr1::ARG4/bcr1::URA3</i>	
Cepa BG14 de <i>Candida glabrata</i>	<i>ura3Δ(-85 + 932)::Tn903NeoR</i>	[17]
Oligonucleótidos		
Oligonucleótidos utilizados para producir y confirmar la cepa de sobreexpresión/supresión condicional de <i>HYR1</i>		
P1	5'-ACTTGGCACCAGGAACAAC	
P2	5'- ACAGCTTTATCTCAGAAAACTAGTAATAACAACATGAAAGTGGTATCA	
P3	5'- CGACAAACACAACGGCACATTCTGGTTTCAACAACTGGAATACTTTG	
P4	5'-AGCAGTAACACAACCACTACCT	
PH1	5'-GTCGTCGCTGTGTTTGTC	
PH2	5'-CGTTGGAGAAGGTAATTGTGA	
P5	5'-CAGCATGAACAATCAAAGACGA	
P6	5'-CAAAGTATTCCAGTTTGTGAAACC	
Oligonucleótidos utilizados para detectar la expresión <i>in vitro</i>		
HER1 específico1	5'-CGTCAACCTGACTGTTACATC	

Cepas		
<i>Candida albicans</i>	Genotipo	Fuente
Cepas		
HYR1 específico2	5'-TCTACGGTGGTATGTGGAAC	
EFB1a	5'-ATTGAACGAATTCTTGGCTGAC	
EFB1b	5'-CATCTTCTRCAACAGCAGCTTG	
Oligonucleótidos utilizados para la expresión <i>in vivo</i>		
EFB1F	5'-CACAAACCAATACATAATG	
EFB1R	5'-GTAGACAGTGACATCAGC	
EFB1nF	5'-TCAGATTCTCTAAAGTCG	
EFB1nR	5'-TGACATCAGCTTGAGTGG	
G3PDHF	5'-GTCTTCACCACCATGGAGAAGG	
G3PDHR	5'-TCGCTGTTGAAGTCAGAGGAGA	
Oligonucleótidos utilizados para confirmar <i>URA3-IRO1</i> en su locus original		
<i>URA3</i> Conf1	5'-TGCTGGTTGGAATGCTTATTTG	
<i>URA3</i> Conf2	5'-TGCAAATTCTGCTACTGGAGTT	
Oligonucleótidos utilizados para la construcción de expresión de <i>HYR1</i> en <i>C. glabrata</i>		
CG-Hyr1-a	5'-ATATAAAACATCTAGATGAAAGTGGTATCAAACCTTTATATTC	
CG-Hyr1-b	5'-GGGTTGTGTTCTCGATCACATGAATAAAACAACCATG	

Ejemplo II

rHyr1p-N es una vacuna contra la candidiasis diseminada

- 5 Antecedentes: Hallamos que la sobreexpresión de *HYR1* en *Candida albicans* media la resistencia a la destrucción por neutrófilos *in vitro*. Buscamos determinar el impacto de la sobreexpresión de *HYR1* sobre la carga fúngica tisular *in vivo* durante la infección y definir el potencial de vacunación con rHyr1p-N para proteger contra candidiasis diseminada en ratones.

- 10 Métodos: Se infectó a los ratones a través de la vena de la cola con *C. albicans* con sobreexpresión/supresión de *HYR1* o natural. Se cosecharon los hígados y bazo 1 día después de la infección y se determinaron los niveles de expresión de *HYR1* y la carga fúngica tisular mediante qRT-PCR y cultivo cuantitativo, respectivamente. Para la vacunación, se produjo rHyr1p-N en el sistema de expresión pQE-32 de *E. coli* y se purificó según las instrucciones del fabricante (Qiagen). Se vacunó a los ratones con 20 µg de rHyr1p-N en adyuvante completo de Freund (CFA), se los reforzó en adyuvante incompleto de Freund (IFA) a las 3 semanas y se los infectó con la cepa SC5314 de *C. albicans* dos semanas después del refuerzo. Los ratones testigo recibieron adyuvante más extracto celular de *E. coli*
- 15 transformado con plásmido vacío.

Resultados: La sobreexpresión de *HYR1* aumentó significativamente la carga fúngica en los hígados y bazo en comparación con la cepa testigo. La supresión de *HYR1* redujo significativamente la carga fúngica en los hígados y bazo en comparación con la cepa testigo. El nivel relativo de expresión de *HYR1* fue de 2,5 y 0,8 en hígados infectados con la cepa de sobreexpresión o supresión con respecto a la cepa testigo, respectivamente. La vacuna de rHyr1p-N resultó en 62,5 % de supervivencia a largo plazo de ratones infectados con respecto a 0 % de supervivencia en ratones testigo.

Conclusiones: La expresión de *HYR1* afecta la capacidad de *C. albicans* para infectar tejidos in vivo. Además, la vacunación con rHyr1p-N protegió de forma marcada a los ratones contra la candidiasis diseminada. La vacuna de rHyr1p-N es útil para prevenir la candidiasis diseminada.

REFERENCIAS

1. Spellberg BJ, Filler SG y Edwards JE, Jr. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. Clin Infect Dis. 2006;42:244-251
2. Del Poeta M. Role of Phagocytosis in the Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Eukaryot Cell 2004;3:1067-1075
3. Koh AY, Kohler JR, Cogshall KT, Van Rooijen N y Pier GB. Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. PLoS Pathog. 2008;4:DOI:10.1371/journal.ppat.0040035.
4. Gulay Z, Imir T. Anti-candidial activity of natural killer (NK) and lymphokine activated killer (LAK) lymphocytes in vitro. Immunobiology 1996;195:220-230
5. Stone HH. Studies in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of *Candida* sepsis in children. J Pediatr Surg. 1974;9:127-133
6. Richard M, Ibatá-Ombetta S, Dromer F, Bordon-Pallier F, Jouault T y Gaillardin C. Complete glycosylphosphatidylinositol anchors are required in *Candida albicans* for full morphogenesis, virulence and resistance to macrophages. Mol. Microbiol. 2002;44
7. Bailey DA, Feldmann PJ, Bovey M, Gow NA y Brown AJ. The *Candida albicans* *HYR1* gene, which is activated in response to hyphal development, belongs to a gene family encoding yeast cell wall proteins. J Bacteriol. 1996;178:5353-5360
8. Fu Y, Luo G., Spellberg BJ, Edwards JE, Jr y Ibrahim AS. Gene overexpression/suppression analysis of candidate virulence factors of *Candida albicans*. Eukaryot Cell. 2008;7:483-492
9. Nusing R, Goerig M, Habenicht AJ and Ullrich V. Selective eicosanoid formation during HL-60 macrophage differentiation. Regulation of thromboxane synthase. Eur J Biochem 1993;212:371-376
10. Spellberg BJ, Collins M, French SW, Edwards JE, Jr., Fu Y y Ibrahim AS. A phagocytic cell line markedly improves survival of infected neutropenic mice. J Leukoc Biol 2005;78:338-344
11. Eiden-Plach A, Zagorc T, Heintel T, Carius Y, Breinig F. Viral preprotoxin signal sequence allows efficient secretion of green fluorescent protein by *Candida glabrata*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Schizosaccharomyces pombe*. Appl. Environ. Microbiol 2004;70:961-966
12. Avrova AO, Venter E, Birch PR y Whisson SC. Profiling and quantifying differential gene transcription in *Phytophthora infestans* prior to and during the early stages of potato infection. Fungal Genetics & Biology 2003;40:4-14
13. Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C y Lopez-Ribot JL. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. Eukaryot Cell 2003;2:1053-1060.
14. Spellberg B, Ibrahim AS, Yeaman MR, et al. The antifungal vaccine derived from the recombinant N terminus of Als3p protects mice against the bacterium *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 2008;76:4574-4580
15. Fu Y, Ibrahim AS, Sheppard DC, Chen YC, French SW y Cutler JE. *Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the EFG1 filamentation pathway. Mol Microbiol 2002;44:61-72
16. Ibrahim AS, Spellberg BJ, Avenissian V, Fu Y, Filler SG y Edwards JE. Vaccination with rAls1p-N improves survival during murine disseminated candidiasis by enhancing cell-mediated, not humoral, immunity. Infect Immun 2005;73:999-1005
17. Nobile CJ, Andes DR, Nett JE, et al. Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. PLoS Pathog. 2006;2:e63

18. Fradin C, De Groot P, MacCallum D, et al. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Molecular Microbiology* 2005;56:397-415
19. Castano I, Pan SJ, Zupancic M, Hennequin C, Dujon B y Cormack BP. Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* 2005;55:1246-1258
- 5 20. Schofield DA, Westwater C, Warner T, Nicholas PJ, Paulling EE y Balish E. Hydrolytic gene expression during oroesophageal and gastric candidiasis in immunocompetent and immunodeficient gnotobiotic mice. *J Infect Dis* 2003;188:591-599
21. Kumamoto CA, Vines MD. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol.* 2005;7:1546-1554
- 10 22. Frohner IE, Bourgeois C, Yatsyk K, Majer O y Kuchler K. *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. *Mol Microbiol* 2009;71:240-252

LISTA DE SECUENCIAS

<110> LOS ANGELES BIOMEDICAL RESEARCH INSTITUTE AT HARBOR-UCLA MEDICAL CENTER FU, Yue LUO, Guanpingsheng IBRAHIM, Ashraf SPELLBERG, Brad J. EDWARDS, Jr., John E.

<120> HYR1 COMO OBJETIVO PARA LA INMUNIZACIÓN ACTIVA Y PASIVA CONTRA CANDIDA

5 <130> 50665/003WO2

<140> No asignado aún

< 141> 2010-07-02

<150>US 61/223.005

< 151> 2009-07-03

10 <160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

< 211> 937

< 212> PRT

15 < 213> Candida albicans

<400> 1

Met Lys Val Val Ser Asn Phe Ile Phe Thr Ile Leu Leu Thr Leu Asn
1 5 10 15

Leu Ser Ala Ala Leu Glu Val Val Thr Ser Arg Ile Asp Arg Gly Gly
20 25 30

Ile Gln Gly Phe His Gly Asp Val Lys Val His Ser Gly Ala Thr Trp
35 40 45

Ala Ile Leu Gly Thr Thr Leu Cys Ser Phe Phe Gly Gly Leu Glu Val
50 55 60

Glu Lys Gly Ala Ser Leu Phe Ile Lys Ser Asp Asn Gly Pro Val Leu
65 70 75 80

Ala Leu Asn Val Ala Leu Ser Thr Leu Val Arg Pro Val Ile Asn Asn
85 90 95

Gly Val Ile Ser Leu Asn Ser Lys Ser Ser Thr Ser Phe Ser Asn Phe
100 105 110

Asp Ile Gly Gly Ser Ser Phe Thr Asn Asn Gly Glu Ile Tyr Leu Asp
115 120 125

Ser Ser Gly Leu Val Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Tyr Ala Arg Glu Trp

ES 2 606 555 T3

130	135	140
Thr Asn Asn Gly Leu Ile Val Ala Tyr Gln Asn Gln Lys Ala Ala Gly 145 150 155 160		
Asn Ile Ala Phe Gly Thr Ala Tyr Gln Thr Ile Thr Asn Asn Gly Gln 165 170 175		
Ile Cys Leu Arg His Gln Asp Phe Val Pro Ala Thr Lys Ile Lys Gly 180 185 190		
Thr Gly Cys Val Thr Ala Asp Glu Asp Thr Trp Ile Lys Leu Gly Asn 195 200 205		
Thr Ile Leu Ser Val Glu Pro Thr His Asn Phe Tyr Leu Lys Asp Ser 210 215 220		
Lys Ser Ser Leu Ile Val His Ala Val Ser Ser Asn Gln Thr Phe Thr 225 230 235 240		
Val His Gly Phe Gly Asn Gly Asn Lys Leu Gly Leu Thr Leu Pro Leu 245 250 255		
Thr Gly Asn Arg Asp His Phe Arg Phe Glu Tyr Tyr Pro Asp Thr Gly 260 265 270		
Ile Leu Gln Leu Arg Ala Asp Ala Leu Pro Gln Tyr Phe Lys Ile Gly 275 280 285		
Lys Gly Tyr Asp Ser Lys Leu Phe Arg Ile Val Asn Ser Arg Gly Leu 290 295 300		
Lys Asn Ala Val Thr Tyr Asp Gly Pro Val Pro Asn Asn Glu Ile Pro 305 310 315 320		
Ala Val Cys Leu Ile Pro Cys Thr Asn Gly Pro Ser Ala Pro Glu Ser 325 330 335		
Glu Ser Asp Leu Asn Thr Pro Thr Thr Ser Ser Ile Glu Thr Ser Ser 340 345 350		
Tyr Ser Ser Ala Ala Thr Glu Ser Ser Val Val Ser Glu Ser Ser Ser 355 360 365		
Ala Val Asp Ser Leu Thr Ser Ser Ser Leu Ser Ser Lys Ser Glu Ser 370 375 380		
Ser Asp Val Val Ser Ser Thr Thr Asn Ile Glu Ser Ser Ser Thr Ala 385 390 395 400		

ES 2 606 555 T3

Ile Glu Thr Thr Met Asn Ser Glu Ser Ser Thr Asp Ala Gly Ser Ser
 405 410 415
 Ser Ile Ser Gln Ser Glu Ser Ser Ser Thr Ala Ile Thr Ser Ser Ser
 420 425 430
 Glu Thr Ser Ser Ser Glu Ser Met Ser Ala Ser Ser Thr Thr Ala Ser
 435 440 445
 Asn Thr Ser Ile Glu Thr Asp Ser Gly Ile Val Ser Gln Ser Glu Ser
 450 455 460
 Ser Ser Asn Ala Leu Ser Ser Thr Glu Gln Ser Ile Thr Ser Ser Pro
 465 470 475 480
 Gly Gln Ser Thr Ile Tyr Val Asn Ser Thr Val Thr Ser Thr Ile Thr
 485 490 495
 Ser Cys Asp Glu Asn Lys Cys Thr Glu Asp Val Val Thr Ile Phe Thr
 500 505 510
 Thr Val Pro Cys Ser Thr Asp Cys Val Pro Thr Thr Gly Asp Ile Pro
 515 520 525
 Met Ser Thr Ser Tyr Thr Gln Arg Thr Val Thr Ser Thr Ile Thr Asn
 530 535 540
 Cys Asp Glu Val Ser Cys Ser Gln Asp Val Val Thr Tyr Thr Thr Asn
 545 550 555 560
 Val Pro His Thr Thr Val Asp Ala Thr Thr Thr Thr Thr Ser Thr
 565 570 575
 Gly Gly Asp Asn Ser Thr Gly Gly Asn Glu Ser Gly Ser Asn His Gly
 580 585 590
 Pro Gly Asn Gly Ser Thr Glu Gly Ser Gly Asn Gly Ser Gly Ala Gly
 595 600 605
 Ser Asn Glu Gly Ser Gln Ser Gly Pro Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly
 610 615 620
 Ser Glu Gly Gly Ser Asn Asn Gly Ser Gly Ser Asp Ser Gly Ser Asn
 625 630 635 640
 Asn Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Ser Thr
 645 650 655

ES 2 606 555 T3

Glu Gly Ser Glu Gly Gly Ser Gly Ser Asn Glu Gly Ser Gln Ser Gly
 660 665 670
 Ser Gly Ser Gln Pro Gly Pro Asn Glu Gly Ser Glu Gly Gly Ser Gly
 675 680 685
 Ser Asn Glu Gly Ser Asn His Gly Ser Asn Glu Gly Ser Gly Ser Gly
 690 695 700
 Ser Gly Ser Gly Ser Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gln Ser Gly
 705 710 715 720
 Ser Gly Ser Gly Ser Gln Ser Gly Ser Glu Ser Gly Ser Asn Ser Gly
 725 730 735
 Ser Asn Glu Gly Ser Asn Pro Gly Ala Gly Asn Gly Ser Asn Glu Gly
 740 745 750
 Ser Gly Gln Gly Ser Gly Asn Gly Ser Glu Ala Gly Ser Gly Gln Gly
 755 760 765
 Ser Gly Pro Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly His Asn Asp Gly Ser Gly
 770 775 780
 Ser Gly Ser Asn Gln Gly Ser Asn Pro Gly Ala Gly Ser Gly Ser Gly
 785 790 795 800
 Ser Glu Ser Gly Ser Lys Ala Gly Ser His Ser Gly Ser Asn Glu Gly
 805 810 815
 Ala Lys Thr Asp Ser Ile Glu Gly Phe His Thr Glu Ser Lys Pro Gly
 820 825 830
 Phe Asn Thr Gly Ala His Thr Asp Ala Thr Val Thr Gly Asn Ser Val
 835 840 845
 Ala Asn Pro Val Thr Thr Ser Thr Glu Ser Asp Thr Thr Ile Ser Val
 850 855 860
 Thr Val Ser Ile Thr Ser Tyr Met Thr Gly Phe Asp Gly Lys Pro Lys
 865 870 875 880
 Pro Phe Thr Thr Val Asp Val Ile Pro Val Pro His Ser Met Pro Ser
 885 890 895
 Asn Thr Thr Asp Ser Ser Ser Ser Val Pro Thr Ile Asp Thr Asn Glu
 900 905 910
 Asn Gly Ser Ser Ile Val Thr Gly Gly Lys Ser Ile Leu Phe Gly Leu
 915 920 925
 Ile Val Ser Met Val Val Leu Phe Met
 930 935

<210> 2

< 211> 326

< 212> PRT

< 213> Candida albicans

5 <400> 2

Thr Ser Arg Ile Asp Arg Gly Gly Ile Gln Gly Phe His Gly Asp Val
1 5 10 15

Lys Val His Ser Gly Ala Thr Trp Ala Ile Leu Gly Thr Thr Leu Cys
20 25 30

Ser Phe Phe Gly Gly Leu Glu Val Glu Lys Gly Ala Ser Leu Phe Ile
35 40 45

Lys Ser Asp Asn Gly Pro Val Leu Ala Leu Asn Val Ala Leu Ser Thr
50 55 60

Leu Val Arg Pro Val Ile Asn Asn Gly Val Ile Ser Leu Asn Ser Lys
65 70 75 80

Ser Ser Thr Ser Phe Ser Asn Phe Asp Ile Gly Gly Ser Ser Phe Thr
85 90 95

Asn Asn Gly Glu Ile Tyr Leu Ala Ser Ser Gly Leu Val Lys Ser Thr
100 105 110

Ala Tyr Leu Tyr Ala Arg Glu Trp Thr Asn Asn Gly Leu Ile Val Ala
115 120 125

Tyr Gln Asn Gln Lys Ala Ala Gly Asn Ile Ala Phe Gly Thr Ala Tyr
130 135 140

Gln Thr Ile Thr Asn Asn Gly Gln Ile Cys Leu Arg His Gln Asp Phe
145 150 155 160

Val Pro Ala Thr Lys Ile Lys Gly Thr Gly Cys Val Thr Ala Asp Glu
165 170 175

Asp Thr Trp Ile Lys Leu Gly Asn Thr Ile Leu Ser Val Glu Pro Thr
180 185 190

His Asn Phe Tyr Leu Lys Asp Ser Lys Ser Ser Leu Ile Val His Ala
195 200 205

ES 2 606 555 T3

Val	Ser	Ser	Asn	Gln	Thr	Phe	Thr	Val	His	Gly	Phe	Gly	Asn	Gly	Asn	
210						215					220					
Lys	Leu	Gly	Leu	Thr	Leu	Pro	Leu	Thr	Gly	Asn	Arg	Asp	His	Phe	Arg	
225					230					235					240	
Phe	Glu	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Gly	Ile	Leu	Gln	Leu	Arg	Ala	Ala	Ala	
				245				250						255		
Leu	Pro	Gln	Tyr	Phe	Lys	Ile	Gly	Lys	Gly	Tyr	Asp	Ser	Lys	Leu	Phe	
			260					265					270			
Arg	Ile	Val	Asn	Ser	Arg	Gly	Leu	Lys	Asn	Ala	Val	Thr	Tyr	Asp	Gly	
	275						280					285				
Pro	Val	Pro	Asn	Asn	Glu	Ile	Pro	Ala	Val	Cys	Leu	Ile	Pro	Cys	Thr	
	290					295					300					
Asn	Gly	Pro	Ser	Ala	Pro	Glu	Ser	Glu	Ser	Asp	Leu	Asn	Thr	Pro	Thr	
305					310					315					320	
Thr	Ser	Ser	Ile	Glu	Thr											
				325												

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna que comprende
 - a) un polipéptido aislado opcionalmente fusionado con un compañero de fusión heterólogo; y
 - b) un vehículo farmacéuticamente aceptable, donde la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos representada por la secuencia con SEQ ID N.º:2.
2. La vacuna de la reivindicación 1, que además comprende un adyuvante.
3. La vacuna de cualquiera de las reivindicaciones mencionadas anteriormente, donde la secuencia de aminoácidos se representa mediante la secuencia con SEQ ID N.º:2.
4. La vacuna de cualquiera de las reivindicaciones mencionadas anteriormente, donde dicho polipéptido se obtiene de una célula transformada.
5. La vacuna de cualquiera de las reivindicaciones mencionadas anteriormente, donde dicha célula transformada es una célula de *Saccharomyces cerevisiae* transformada.
6. Una cantidad inmunógena de una vacuna de cualquiera de las reivindicaciones mencionadas anteriormente para uso en el tratamiento o prevención de una infección por candidiasis.
7. La vacuna de la reivindicación 6 para utilizar en el tratamiento de candidiasis diseminada.
8. La vacuna para uso según la reivindicación 6 o 7, que se administra a través de inmunización activa, inmunización pasiva o una combinación de las mismas.
9. Un polipéptido aislado opcionalmente fusionado con un compañero de fusión heterólogo, donde la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos representada por la secuencia con SEQ ID N.º:2 para uso en el tratamiento o prevención de una infección por candidiasis.
10. El polipéptido aislado para uso en el tratamiento o prevención de una infección por candidiasis según la reivindicación 9, donde dicho polipéptido consiste en la secuencia representada por SEQ ID N.º:2.
11. El polipéptido aislado para uso en el tratamiento o prevención de una infección por candidiasis según la reivindicación 10, donde dicho polipéptido se obtiene de una célula transformada.
12. El polipéptido aislado para uso en el tratamiento o prevención de una infección por candidiasis según la reivindicación 11, donde dicha célula transformada es una célula de *Saccharomyces cerevisiae* transformada.
13. La vacuna o polipéptido aislado de cualquiera de las reivindicaciones mencionadas anteriormente, donde dicho compañero de fusión heterólogo comprende una secuencia líder heteróloga.
14. La vacuna o polipéptido aislado de cualquiera de las reivindicaciones mencionadas anteriormente, donde dicho compañero de fusión heterólogo comprende una etiqueta o una secuencia conectora.
15. La vacuna o polipéptido aislado de la reivindicación 14, donde dicha etiqueta es una etiqueta de histidina.

Figura 1

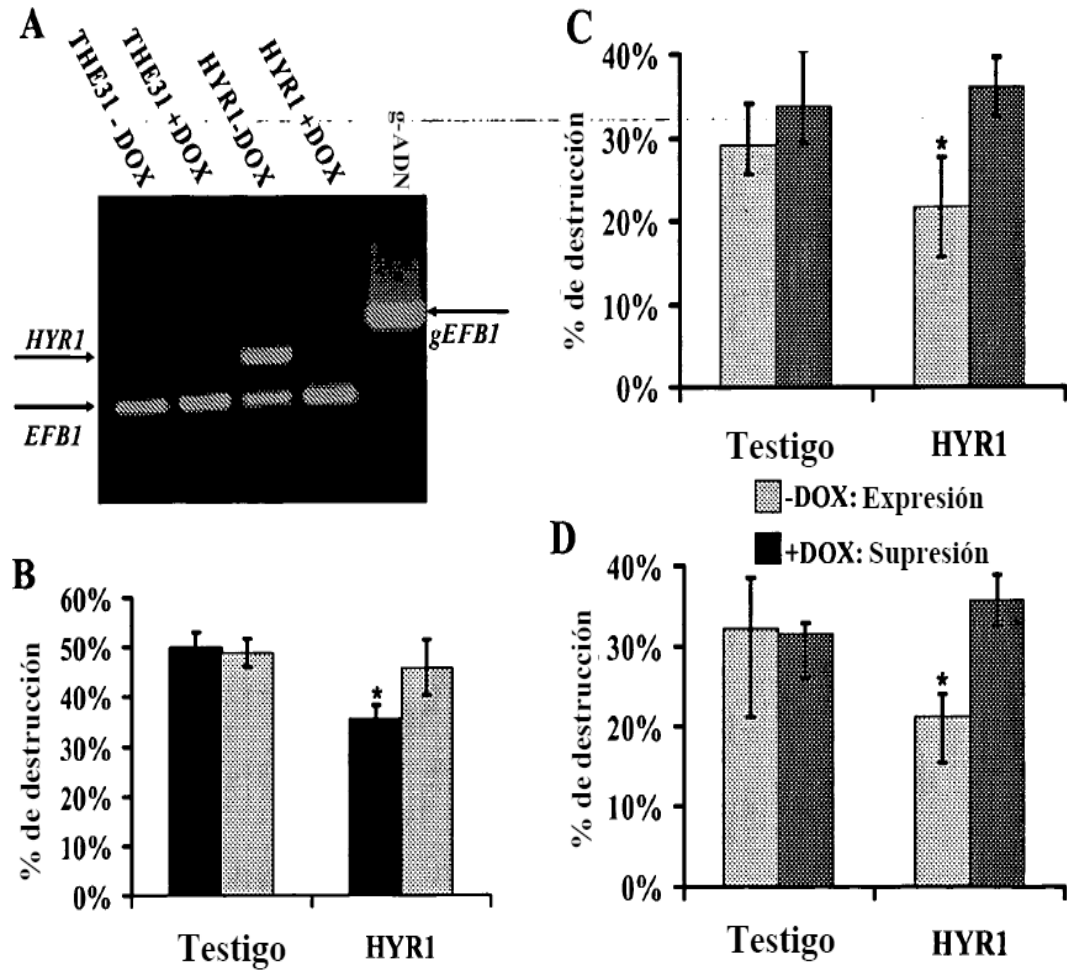


Figura 2

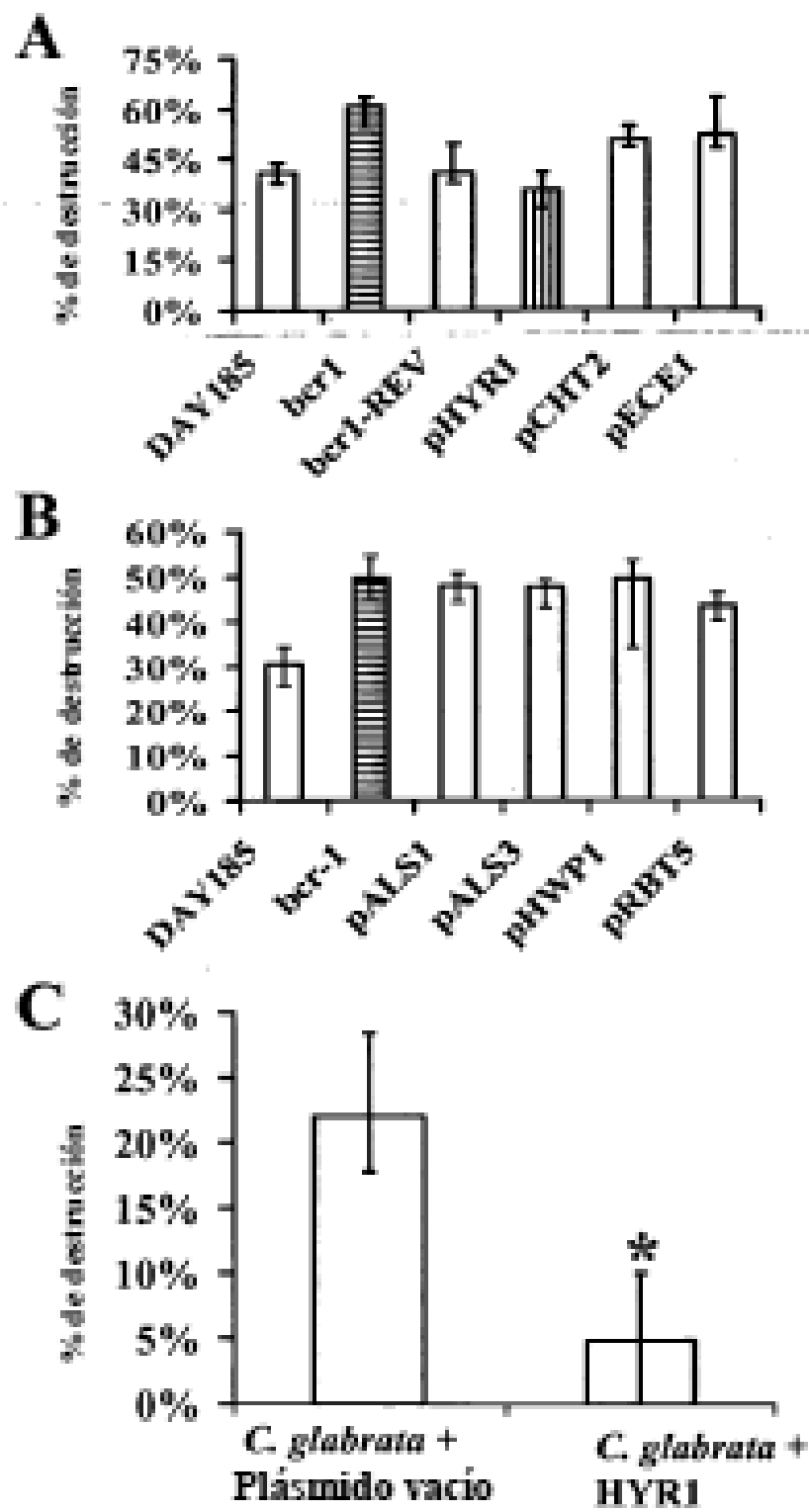


Figura 3

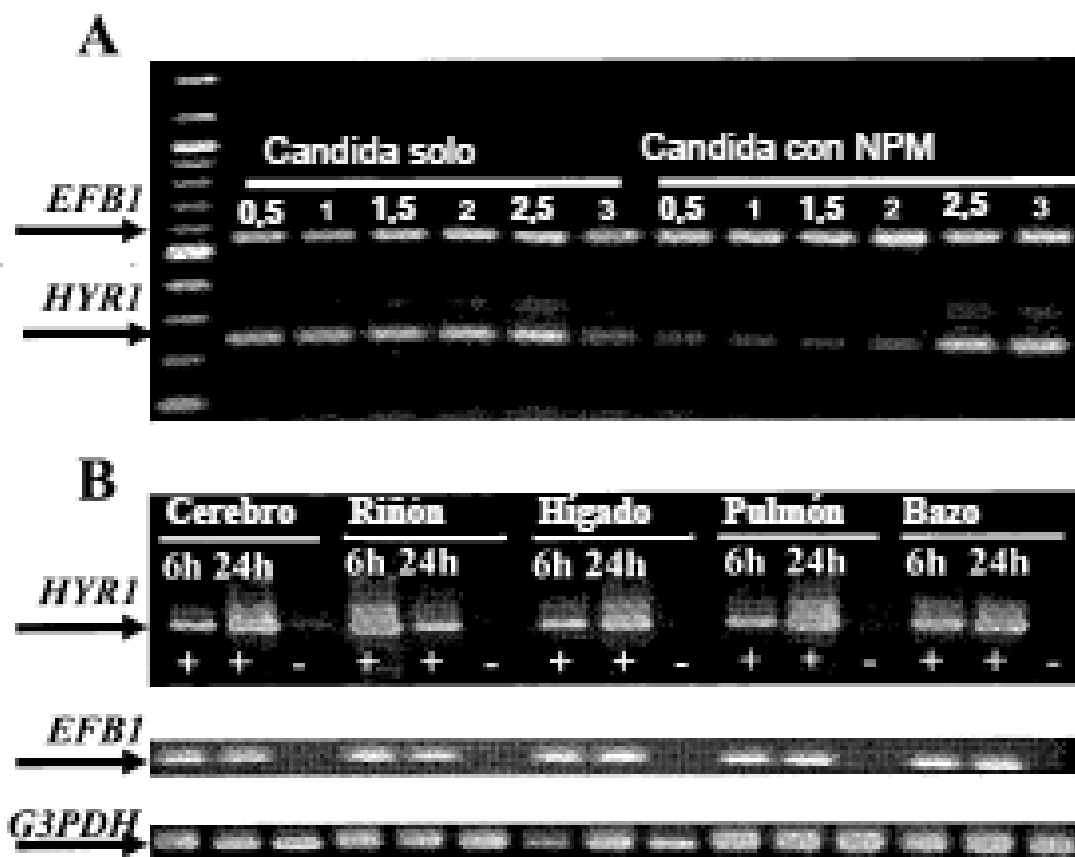


Figura 4

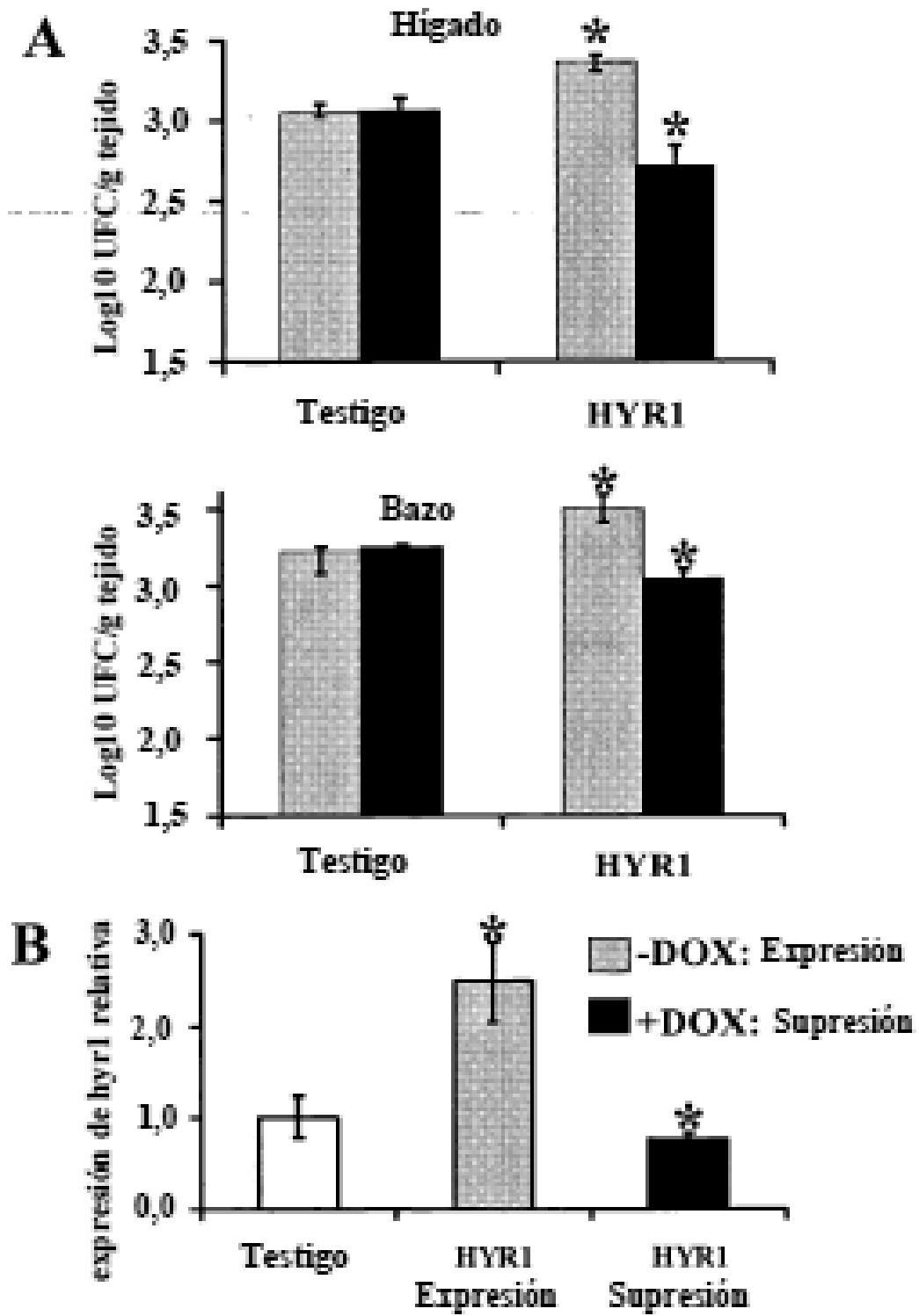


Figura 5

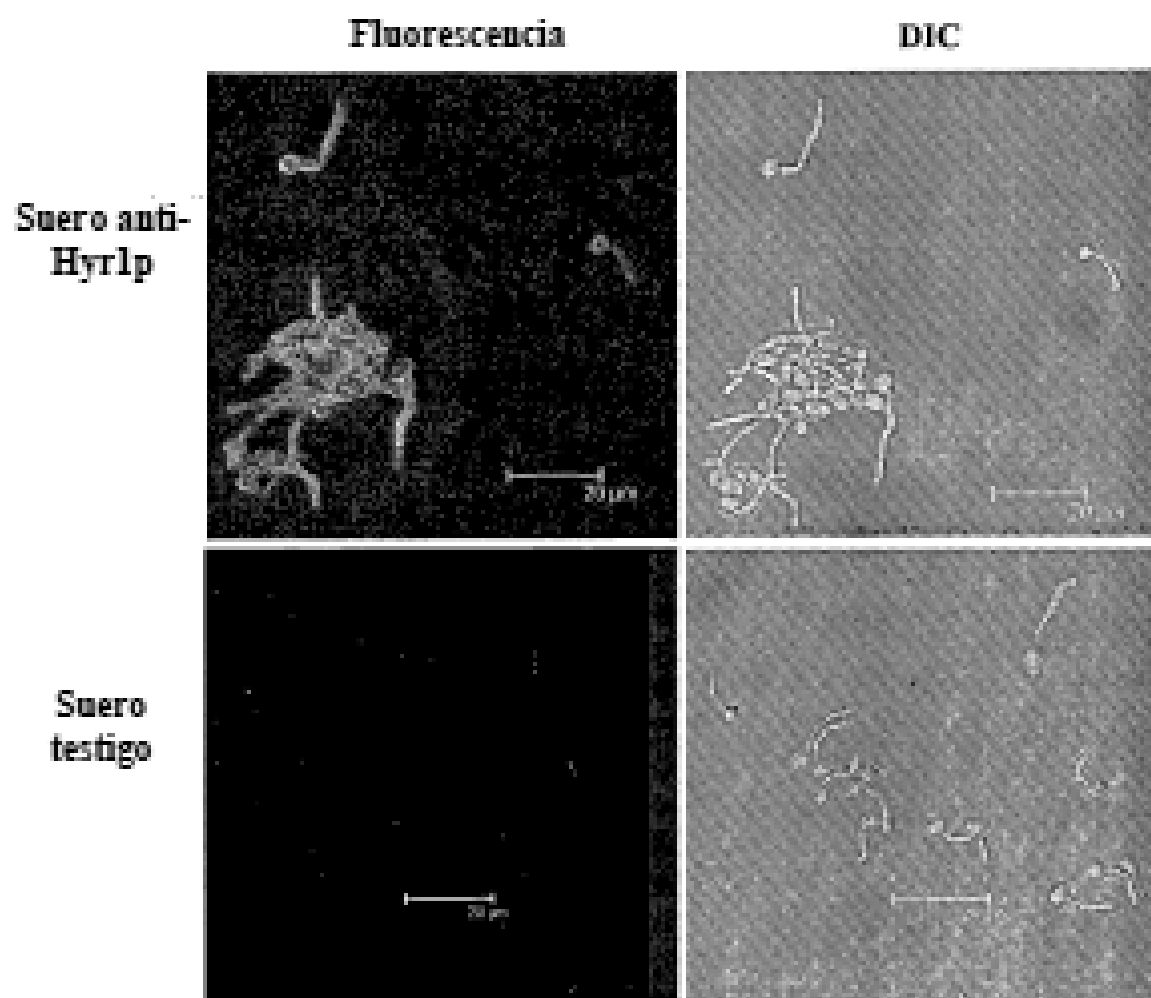


Figura 6

