

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 631 877**

21 Número de solicitud: 201630250

51 Int. Cl.:

C12N 1/15 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

03.03.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

05.09.2017

71 Solicitantes:

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (75.0%)

Avda. Blasco Ibañez, 13

46010 Valencia ES;

UNIVERSIDAD DE CASTILLA LA MANCHA

(10.0%);

UNIVERSIDAD DE MURCIA (10.0%) y

FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN DEL

HOSPITAL UNIVERSITARIO Y POLITECNICO LA

FE (5.0%)

72 Inventor/es:

VALENTÍN GÓMEZ, Eulogio;

MAICAS PRIETO, Sergi;

MICÓ GARCÍA, Miguel;

MARTÍNEZ PÉREZ-ROMERO, Ana Isabel;

DE GROOT, Petrus Wilhelmus Johannes ;

MARTÍNEZ-ESPARZA ALVARGONZÁLEZ, María y

PEMÁN GARCÍA, Francisco Javier

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

54 Título: **Mutante de Candida albicans y uso en terapia contra candidiasis**

57 Resumen:

Mutante de Candida albicans y uso en terapia contra candidiasis.

La presente invención proporciona mutantes de Candida albicans que carece de copias funcionales de su gen PIR1, preferentemente por delección en todas las copias del mismo, así como un procedimiento para obtenerlos. Dichos mutantes son cepas atenuadas que no producen síntomas de candidiasis pero que confieren protección frente a la misma cuando se inyectan a un animal previamente a la infección con una cepa infectiva. La invención comprende el uso de dichos mutantes para desencadenar una respuesta protectora contra la candidiasis, o específicamente como vacunas vivas atenuadas, especialmente contra la candidiasis diseminada.

ES 2 631 877 A1

DESCRIPCIÓN

Mutante de *Candida albicans* y uso en terapia contra candidiasis

Campo de la invención

La presente invención se refiere al proceso de construcción de una cepa mutante de la
5 levadura *Candida albicans* y posterior utilización de esta cepa para inmunizar ratones
frente a candidiasis, constituyendo esto un modelo para su posterior aplicación en el
tratamiento de la candidiasis en seres humanos.

Antecedentes de la invención

Candida albicans es un hongo patógeno oportunista, polimórfico, diploide del que no se
10 conoce su ciclo sexual. Se aísla habitualmente a partir de la piel y otros tejidos humanos
y, por lo tanto, supone en condiciones normales un microorganismo comensal inocuo que
forma parte de la microbiota de piel y mucosas habitual en el ser humano. Sin embargo,
bajo determinadas condiciones, es capaz de producir tanto infecciones superficiales
como sistémicas, pudiendo incluso conllevar, en los casos más críticos, un grave peligro
15 para la vida del paciente.

Las infecciones fúngicas son un problema de importancia creciente en los últimos años,
fundamentalmente en ambientes hospitalarios, ya que suponen la cuarta causa de
infecciones nosocomiales. Y, entre el amplio grupo de hongos patógenos, tiene especial
relevancia el género *Candida* (154 especies) y concretamente la especie *C. albicans*,
20 pues constituye el principal agente causal. También es habitual en los aislados clínicos
encontrar otras seis especies no-*albicans* de entre las cuales cabe destacar *C.*
parapsilosis, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* y *C. lusitaniae*.

Desde la aparición de los primeros casos de infección por *Candida* hasta hoy se han
desarrollado distintas técnicas encaminadas al estudio de este microorganismo y
25 fundamentalmente enfocadas a aquellas características diferenciales de las células
eucariotas humanas, con objeto de diseñar antifúngicos selectivos y eficientes en el
tratamiento de estas enfermedades. Sin embargo, la tasa de muerte asociada a
infecciones causadas por *Candida* en este tipo de pacientes, incluso tras el tratamiento
con estos antifúngicos, alcanza niveles de entre el 30% y el 40%.

30 La vacunación de grupos de alto riesgo es una estrategia prometedora que permitiría
evitar candidiasis en ocasiones puntuales, p.ej. de manera previa a una cirugía invasiva o
a tratamientos agresivos con corticosteroides. No es menos interesante citar la ventaja

económica que supone disminuir el número de pacientes afectados por candidiasis, ya que cada uno de ellos lleva asociado un elevado coste de tratamiento y hospitalización (2-4 billones de dólares en EEUU al año) (Perlroth J, Choi B, Spellberg B: Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol* 2007, 45:321-46).

5 Para un desarrollo de vacunas efectivas, es importante un adecuado conocimiento de la biología de *C. albicans* y de sus mecanismos de patogenicidad.

La secuenciación del genoma de *C. albicans*, así como la anotación de las diferentes ORF (*Open Reading Frame*: marco abierto de lectura) encontradas, llevadas a cabo por diferentes grupos, entre los que se encuentra el grupo de los presentes inventores, ha permitido el desarrollo de bases de datos que incluyen los diferentes genes que componen el genoma completo de este microorganismo. Estas bases de datos son, principalmente, la desarrollada por el Stanford Genome Technology Center (<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida>) así como la base de datos CandidaDB (<http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/>) desarrollada por el consorcio “Galar Fungail” a partir de una anotación independiente de las secuencias obtenidas de Stanford. Existe también la denominada “*Candida* Genome Database (CGD)” (<http://www.candidagenome.org/>), que se creó con la intención de complementar las secuencias con datos adicionales como herramientas de análisis adicionales o referencias más completas y depuradas a la literatura científica relacionada. La posibilidad de acceso a dichas bases de datos permite el análisis *in silico* de las posibles proteínas codificadas por estas ORF, así como su clasificación en diferentes grupos.

El estudio del genoma de *C. albicans*, así como la aplicación de técnicas de biología molecular, sistemas de transformación y sistemas de expresión han permitido obtener información genética de diferentes aspectos biológicos y patológicos de *C. albicans*.

25 La organización y composición de la pared celular es una de las características de *C. albicans* que se ha estudiado profusamente por su importancia en los mecanismos de infección y de colonización de células y tejidos de mamífero y, por ende, por su potencial para identificar antígenos de interés a partir de los cuales generar vacunas. La pared celular es la estructura más externa que protege al hongo de los mecanismos de defensa del hospedador e inicia el contacto directo con las células del hospedador adhiriéndose a su superficie. Como puede verse en distintas referencias (Stephen J. Free. 2013. Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis. In *Advances in Genetics* Vol 83: 33-82. Theodore Friedman, Jay C. Dunlop, Stephen F. Goodwin eds. Elsevier; Carol A. Munro. 2013. Chitin and Glucan the Yin and Yang of the Fungal Cell Wall. Implications for Antifungal Drug

Discovery and Therapy. In *Advances in Applied Microbiology* Vol 83: 145-172. Sima Sariaslani, Geoffrey M. Gadd eds. Academic Press; 3. Piet de Groot, Albert D, de Boer, Bernd W. Brandt, Eulogio Valentin. 2016. *Ascomycetous Cell Wall: From a Proteomic Perspective*. In *Growth, Differentiation and Sexuality*, 3rd edition *The Mycota I* pp 81-101.

5 J. Wendland Ed. Springer International Publishing, Basel Switzerland), la pared celular es principalmente de carácter polisacárido (90%) y proteico (10%). Es una estructura multiestratificada en la que los polisacáridos mayoritarios son glucano (β -1,3- y β -1,6-glucanos); manano en forma de manoproteínas y quitina como polímero minoritario. Mientras que glucanos y quitina conforman el componente microfibrilar de la pared

10 celular, las manoproteínas son el componente amorfo que se encuentra a lo largo y ancho de la estructura microfibrilar de la pared unidas por distintos tipos de enlaces. (I) Proteínas unidas mediante enlaces no covalentes del tipo puentes de hidrógeno y/o interacciones hidrofóbicas; (II) Proteínas unidas covalentemente. Dentro de estas proteínas tenemos que distinguir: (II-a) Proteínas unidas mediante enlaces por puentes

15 disulfuro a otros componentes de la pared celular; (II-b) Proteínas unidas directamente al β -1,3-glucano, mediante enlaces que son sensibles a soluciones alcalinas, tales como algunas proteínas Als (*Agglutinin-like sequences*: secuencias similares a la aglutinina) o las proteínas Pir (*Protein internal repetitions*: proteínas con repeticiones internas) de las que se habla con más detalle más adelante; (II-c) Proteínas que se encuentran unidas al

20 β -1,3-glucano y/o quitina mediante un puente de β -1,6-glucano unido a un terminal GPI (glicosil fosfatidil inositol) de la proteína, son las denominadas proteínas GPI de las que se han identificado un centenar mediante análisis proteómicos e *in silico*. Otro grupo de proteínas podría considerarse las proteínas “atípicas” de pared o proteínas “moonlighting”, que son proteínas que no poseen las características propias de las

25 proteínas de pared (péptido señal, potenciales sitios de glicosilación...); muchas de estas proteínas son proteínas citoplasmáticas que cumplen una función en el citoplasma (por ejemplo enzimas glicolíticas), pero se desconoce cual es su papel en la pared celular. La Fig. 1 muestra una representación esquemática de la estructura de la pared celular.

Actualmente, existen distintas vacunas dirigidas a *Candida* desarrolladas en entornos

30 preclínicos. Como puede verse revisado en distintas publicaciones (p.ej., Fidel P.L., Cutlet J.E.: Prospects for development of a vaccine to prevent and control vaginal candidiasis, *Curr Infect Dis Rep*. 2011, 13(1):102-107, dada la importancia de la pared celular en distintos procesos relacionados con la infección y colonización de tejidos, muchas de las estrategias de búsqueda de vacunas se han basado en utilizar como

35 antígenos componentes de la pared celular, en particular los de tipo sacarídico, o

análogos de los mismos, en ocasiones conjugados o asociados a algún coadyuvante. Así, por ejemplo, un conjugado de proteína vacuna que consta de laminarina (glucano de algas) vinculado a toxina diftérica que se derivó en una protección significativa contra la candidiasis diseminada y la vaginal en modelos murinos (Pietrella D, Rachini A, Torosantucci A, Chiani P, Brown AJ, Bistoni F, Costantino P, Mosci P, d'Enfert C, Rappuoli R, Cassone A, Vecchiarelli A: A beta-glucan-conjugate vaccine and anti-beta-glucan antibodies are effective against murine vaginal candidiasis as assessed by a novel in vivo imaging technique. *Vaccine* 2010, 28:1717-25; Torosantucci A, Bromuro C, Chiani P, De Bernardis F, Berti F, Galli C, Norelli F, Bellucci C, Polonelli L, Costantino P, Rappuoli R, Cassone A: A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *J Exp Med* 2005, 202:597-606). Una vacuna similar que utilizaba manano de *Candida* conjugado con albúmina de suero humano como proteína portadora resultó ser inmunogénica en conejos, aunque su eficacia no fue estudiada en un modelo infeccioso (Paulovicová E, Machová E, Tulinská J, Bystrický S: Cell and antibody mediated immunity induced by vaccination with novel *Candida dubliniensis* mannan immunogenic conjugate. *Int Immunopharmacol* 2007, 7:1325-33). En la misma línea Cutler *et al.* han presentado dos patentes relacionadas con la fabricación de vacunas proponiendo el fosfomanano de *C. albicans* como diana (Patente de EE.UU. US5578309 y solicitud de patente de EE.UU. publicada como US 2002/0054886-A1). Este mismo grupo solicitó también posteriormente una patente referida a vacunas contra *Candida albicans* basadas en oligosacáridos sintéticos (solicitud internacional WO03090787 y patente de EE.UU. US7722890).

Los estudios preclínicos presentados por otros grupos se han centrado en la inmunización y generación de vacunas a partir de distintas proteínas de *Candida*, en especial aquellas que se consideran que intervienen o influyen en la infección, la colonización de tejidos o la patogenicidad de la levadura, tales como:

- Las proteínas de choque térmico (Bromuro C, La Valle R, Sandini S, Urbani F, Ausiello CM, Morelli L, Fé d'Ostiani C, Romani L, Cassone A: A 70-kilodalton recombinant heat shock protein of *Candida albicans* is highly immunogenic and enhances systemic murine candidiasis. *Infect Immun* 1998, 66:2154-62).

- *Agglutinin-like sequences (Als)* de *Candida albicans*, cuyo uso ha sido propuesto por el grupo de Spellberg para la vacunación de ratones como modelos de candidiasis vaginales y bucofaríngeas (Spellberg BJ, Ibrahim AS, Avenissian V, Filler SG, Myers CL, Fu Y, Edwards JE Jr: The anti-*Candida albicans* vaccine composed of the recombinant N

terminus of Als1p reduces fungal burden and improves survival in both immunocompetent and immunocompromised mice. *Infect Immun* 2005, 73:6191-3). Esta vacuna logró aprobación para entrar en Fase I de ensayos clínicos (NCT01273922), si bien los resultados están todavía en fase de revisión.

- 5 - Proteínas de superficie tipo HYR1 (Luo G, Ibrahim AS, Spellberg B, Nobile CJ, Mitchell AP, Fu Y: *Candida albicans* Hyr1p confers resistance to neutrophil killing and is a potential vaccine target. *J Infect Dis* 2010, 201:1718-28), u otras distintas proteínas de la pared celular, tales como la enzima enolasa (Li Wq, Hu Xc, Zhang X, Ge Y, Zhao S, Hu Y, Ashman RB et al.: Immunisation with the glycolytic enzyme enolase confers effective
10 protection against *Candida albicans* infection in mice; *Vaccine* 2011, 29(33):5526-5533), todas ellas del grupo de las proteínas ancladas mediante unión a GPI.

En general, como recogen Luo *et al.* en el artículo de 2010 arriba citado, las proteínas de la superficie celular ancladas mediante unión a GPI se consideran la interfaz crítica entre patógeno y hospedador, siendo las primeras dianas con las que se encuentra el
15 mecanismo de defensa de este último, lo que las hace candidatos atractivos para el diseño de vacunas.

Las proteínas GPI han sido también objeto de interés en los estudios orientados a la búsqueda de cepas atenuadas, con el propósito de utilizarlas para desencadenar inmunidad frente a *Candida albicans* en los hospedadores, especialmente en casos de
20 candidiasis sistémica. Así, puede mencionarse, por ejemplo, los trabajos realizados con mutantes delecionados en el gen *GPI7*, un gen que codifica una proteína citoplásmica y que también está presente en la pared celular, que parece estar relacionada con el anclaje mediante glicofosfatidilinositol (GPI). Los ensayos realizados en un modelo murino al que se le inoculó por vía sistémica una cepa mutante homocigótico *GPI7/GPI7*
25 ($\Delta GPI7$), permitieron apreciar un incremento de la producción de TNF- α y reclutamiento de neutrófilos en respuesta al mutante. Esto fue interpretado por el grupo investigador de los autores de dicho artículo como un incremento en la respuesta proinflamatoria en respuesta al mutante $\Delta GPI7$ de *C. albicans* (Plaine A, Yáñez A, Murciano C, Gaillardin C, Gil ML, Richard ML, Gozalbo D: Enhanced proinflammatory response to the *Candida albicans* *gpi7* null mutant by murine cells; *Microbes and Infection* 2008, 10(4):382-389).
30 En dicho artículo no se propone la utilización de la cepa mutante $\Delta GPI7$ como vacuna viva atenuada.

También se proporciona un mutante de delección en el gen de *GPI7* de *C. albicans* en la solicitud de patente china CN103251939, donde se indica un método para su obtención y se propone su uso como vacuna viva atenuada. Debe destacarse el hecho de que el gen *GPI7* se considera no esencial, lo cual permite la generación de mutantes viables que no expresan ninguna de las copias de dicho gen a partir del genoma diploide de *C. albicans*, haciendo posible que pueda plantearse la utilización de dichos mutantes como vacunas vivas atenuadas.

Otras distintas solicitudes proporcionan también cepas atenuadas de *C. albicans* que se proponen para uso, o bien como vacuna viva atenuada o, más bien, para preparar y ensayar medicamentos. Es el caso de la solicitud de patente de China CN104342376A, donde se proporciona un mutante de delección en el gen *WIP1*, gen, de acuerdo con la base de datos CGD, parece corresponder a una proteína ribosómica (<http://www.candidagenome.org/cgi-bin/locus.pl?locus=CAGL0K09768g>). Análogamente, en la solicitud de patente CN103013846A, también de China, se propone también el uso como vacuna atenuada o para preparar y ensayar medicamentos de un mutante de delección de *C. albicans*, en este caso en el gen *ESA1*, gen que, de acuerdo con la base de datos CGD, parece corresponder a una subunidad de un complejo de histonas acetiltransferasas (Candida Genome Database, [http://www.candidagenome.org/cgi-bin/locus.pl?locus=esa1&organism=C albicans SC5314](http://www.candidagenome.org/cgi-bin/locus.pl?locus=esa1&organism=C%20albicans%20SC5314)).

En los estudios sobre posibles vacunas y, en particular, en los referidos a la protección conferida por cepas mutantes deficientes en proteínas, la utilización de modelos animales (generalmente murinos) es fundamental, ya que permiten evaluar la eficacia de la inmunización en etapas previas al ensayo clínico en humanos. Tal como recogen y discuten distintas publicaciones (p. ej., Spellberg B: Novel insights into disseminated candidiasis: pathogenesis research and clinical experience converge. PLoS Pathog 2008, 4:e38), el modelo murino estándar de candidiasis diseminada es el de infección de los ratones mediante inyección de levaduras en la vena de la cola, con lo que los microorganismos acceden directamente a la circulación sanguínea. Se trata de un modelo muy útil, porque reproduce la infección de pacientes a través de catéteres, su evolución clínica es similar a la de la candidiasis clínica diseminada no tratada, y ha demostrado servir para predecir la eficacia de agentes antifúngicos contra la infección sistémica. Existen también otros modelos murinos alternativos, como el de Koh et al. (Koh A.Y., Kohler JR, Coggshall KT, Van Rooijen N, Pier GB, Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination, PLoS Pathog 2008, 4:e35),

en el que se induce la colonización gastrointestinal, que tiene también gran utilidad, pues reproduce la ruta de infección hacia la corriente sanguínea atravesando la mucosa gastrointestinal.

5 Según los estudios realizados, y con la situación actual de estudio en fase clínica de algunos de ellos, no parece haberse encontrado aún una vacuna satisfactoria contra la candidiasis, en especial contra la candidiasis sistémica, y cuyo uso haya sido ya autorizado, por lo que es conveniente continuar buscando posibles vacunas alternativas. La creación de mutantes deficientes en alguna de dichas proteínas puede ser una vía para obtener cepas útiles para la inmunización de mamíferos.

10 Entre las proteínas de la pared celular, como se comentó más arriba, se encuentra también un grupo denominado de manera colectiva como Proteínas con Repeticiones Internas (PRI), al que se alude habitualmente de forma abreviada mediante sus siglas en inglés, PIR. Son proteínas altamente O-glicosiladas y unidas directamente a 1,3-β-glucano. Entre las proteínas PIR se encuentran las expresadas desde el gen *PIR1* de *C.*
 15 *albicans*, (<http://www.candidagenome.org/cgi-bin/locus.pl?locus=orf19.220>), denominado a veces de forma abreviada *CaPIR1* o también conocido como C2_008870C, el código de su secuencia en la base de datos de *Candida*, CGD. Se trata de una proteína de la pared celular que parece ser un constituyente estructural de la misma, en la que se encuentra unida directamente al 1,3-beta-glucano de la pared celular, O-glicosilada y con un único
 20 lugar de N-glicosilación.

De acuerdo con los trabajos previos realizados por miembros del grupo de los presentes inventores (Martínez A.I., Castillo L, Garcerá A, Elorza M.V., Valentín E., Santandreu R.: Role of Pir1 in the construction of the *Candida albicans* cell wall, 2004, *Microbiology* 150 (Pt 10):3151-61, y tal como se refleja también en el Compendio de Notas del *Candida*
 25 *Genome Database* al que puede accederse a partir del enlace antes citado, *C. albicans* expresa dos alelos de diferentes tamaños de la proteína *CaPIR1* que se expresan a igual nivel, independientemente de la morfología. También se menciona que los autores del trabajo no consiguieron obtener mutantes homocigóticos a partir de la cepa con la que se intentó, CAI4 (ATCC® MYA-682™), que es una cepa descrita inicialmente por Fonzi e
 30 Irwin en 1993 (Fonzi W.A, Irwin M.Y., Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*, (1993) *Genetics* 134:717-728) que presenta el genotipo Δ *ura3::imm434*/ Δ *ura3::imm434*. Estos resultados, confirmados utilizando dos técnicas diferentes, fueron interpretados como una indicación de que *PIR1* es un gen esencial para la viabilidad de *C. albicans*, por lo que mutante que carece de copias funcionales del

mismo es letal. Esa misma idea está reflejada también en la revisión sobre las proteínas de la pared celular de *C. albicans* realizada por W. LaJean Chaffin del 2008 antes citada (Chaffin L.A., *Candida albicans* Cell Wall Proteins, Microbiol Mol Biol Rev. 2008 Sep; 72(3): 495-544). Así, no hay publicaciones que se refieran a la generación de mutantes
5 atenuados resultantes de alteraciones de dicho gen, pues no deberían ser viables. Tampoco se ha utilizado para generación de anticuerpos o respuestas protectoras en otros organismos.

Así, dada la importancia creciente de las candidiasis, sería conveniente generar vacunas, adicionales o alternativas a las que se están probando, que permitieran la prevención de
10 la enfermedad y, especialmente, su control, particularmente en el caso de la candidiasis sistémica o diseminada.

La presente invención proporciona una solución a dicho problema.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una cepa mutante viable de *C. albicans* que carece de
15 copias funcionales del gen *PIR1*. Preferiblemente, están excluidas del alcance de la reivindicación aquellas cepas generadas mediante disrupción de todas las copias del gen *PIR1* en la cepa CAI4 (ATCC MYA-682).

Otro aspecto de la invención es el uso de la cepa mutante de *C. albicans* antes definida (la cepa mutante de *C. albicans* de la presente invención) para desencadenar una
20 respuesta inmune protectora contra la candidiasis en un mamífero. Preferiblemente, el mamífero será un ser humano.

En un aspecto unido al anterior, la invención se refiere también al uso de la cepa mutante de *C. albicans* de la presente invención para la fabricación de un medicamento. Se
25 prefiere el uso para la fabricación de una vacuna para el tratamiento de la candidiasis, con especial preferencia por la candidiasis sistémica.

En otro aspecto, la invención se refiere al procedimiento de obtención de una cepa mutante de *C. albicans* que carece de copias funcionales del gen *PIR1* de dicha especie (*CaPIR1*), que comprende las etapas de:

- a) transformar la cepa parental de *C. albicans* de partida con un vector integrativo
30 que presenta un casete de disrupción que comprende los siguientes elementos:
 - i) fragmentos flanqueantes F1 y F2 situados cada uno de ellos en

un extremo del casete, en donde los fragmentos F1 y F2 son homólogos a fragmentos del gen *CaPIR1* situados, respectivamente, aguas arriba y aguas abajo con respecto a la región del gen *CaPIR1* que se desea delecionar,

- 5
- ii) fragmentos que comprenden la secuencia de reconocimiento de una recombinasa contiguos a los fragmentos flanqueantes F1 y F2,
 - iii) la secuencia codificante de una recombinasa operativamente unida a un promotor de expresión inducible en *C. albicans*,
 - 10 iv) la secuencia codificante de un gen marcador de selección operativamente unido a un promotor de expresión constitutiva en *C. albicans*;
- b) seleccionar las células de levadura en las que se ha incorporado en el genoma el casete de disrupción cultivándolas en condiciones en las que sólo sobreviven aquellas que han incorporado en el genoma el casete de disrupción;
- 15
- c) cultivar las levaduras de *C. albicans* transformadas con el vector integrativo en condiciones en las que se induce la expresión de la recombinasa;
- d) seleccionar las levaduras en las que se ha producido la delección del fragmento del gen *CaPIR1* deseado;
- 20
- e) repetir las etapas b) a d) hasta que se haya delecionado el fragmento deseado del gen *CaPIR1* en todas las copias del mismo inicialmente presentes en la cepa parental de partida.

Otro aspecto más de la invención, complementario del anterior, es un plásmido que pueda utilizarse como vector integrativo en el procedimiento de la presente invención, es decir, un plásmido que comprende los siguientes elementos:

25

- i) fragmentos flanqueantes F1 y F2 situados cada uno de ellos en un extremo del casete, en donde los fragmentos F1 y F2 son homólogos a fragmentos del gen *CaPIR1* situados, respectivamente, aguas arriba y aguas abajo con respecto a la región del gen *CaPIR1* que se desea delecionar,
- 30 ii) fragmentos que comprenden la secuencia de reconocimiento de una recombinasa contiguos a los fragmentos flanqueantes F1 y F2,
- iii) la secuencia codificante de una recombinasa operativamente unida a un

promotor de expresión inducible en *C. albicans*,

- iv) la secuencia codificante de un gen marcador de selección operativamente unido a un promotor de expresión constitutiva en *C. albicans*.

Breve descripción de las figuras

5 Fig. 1: Esquema propuesto por el consorcio europeo Galar Fungail I para la pared celular de *C. albicans*. Está constituida por una red de β -1,6- y β -1,3-glucano y quitina. **NCL-CWP** (*non covalently linked protein*), extraíble con SDS. **RAE-CWP** (*reducing agent extractable*), extraídas con un tratamiento con β -mercaptoetanol. **ASL-CWP** (*alkali sensitive linkage cell wall proteins*), extraíbles con un tratamiento suave con álcali. **GPI-**
 10 **CWP** (*glycosylphosphatidylinostol cell wall proteins*), extraídas con un tratamiento con HF-piridina o por digestión con laminarina o zimoliasa. Se muestra también la presencia de las proteínas “moonlighting” o atípicas.

Fig. 2: Esquema de la estrategia seguida para la disrupción de dos alelos del gen *PIR1* de *C. albicans* (PRI1-1 y PRI1-2 en el esquema). La recombinación homóloga da lugar a
 15 la inserción del casete de disrupción (casete SAT) en lugar del fragmento del alelo PRI1-1 flanqueado por las secuencias homólogas a los elementos 5'-PRI y 3'-PRI; el cultivo del mutante intermedio obtenido, *pri1-2::SAT1*, en un medio que contiene maltosa, el inductor de la expresión de la recombinasa codificada en el casete (*CaFLP1*: flipasa de *C. albicans*) da lugar a la delección del casete, quedando en el correspondiente cromosoma
 20 los elementos 5'PRI y 3'-PRI flanqueando sólo una secuencia de reconocimiento por la recombinasa (FRT). La repetición del proceso da lugar a la inserción de una copia del casete en lugar del alelo *PIR1-1*, casete que resultará deleccionado de nuevo tras el cultivo en condiciones en las que se induce la expresión de la flipasa. Abreviaturas: PRI1-1 y PRI1-2: alelos del gen *PIR1*. 5'-PRI y 3'-PRI: elementos homólogos a fragmentos
 25 flanqueantes, en 5' y 3' respectivamente, del fragmento del gen *PIR1* a deleccionar; *FRT*: secuencia de reconocimiento de la flipasa; *MAL2prom*: promotor *MAL2* de *C. albicans*, inducible por maltosa; *CaFLP1*: secuencia codificante de la flipasa de *C. albicans*; *ACT1prom*: promotor del gen de la actina de *C. albicans*; *CaSAT1*: secuencia codificante de la estreptomicina acetiltransferasa.

30 Fig. 3: Representación de plásmidos utilizados en la construcción del plásmido pPDC, que contiene el casete de disrupción completo para el gen *CaPRI1*. Se parte del plásmido pSFS2A, que contiene ya los elementos principales del casete de disrupción, flanqueados por sendos elementos FRT con la secuencia de reconocimiento de la flipasa; la

incorporación sucesiva de los elementos flanqueantes F2 y F1, cada uno en un extremo del casete y contiguos (o muy próximos) a los elementos FRT, da lugar al plásmido pPDC.

Fig. 4: Gráfico que muestra la tasa de supervivencia de ratones, expresada como porcentaje sobre el total, frente a los días transcurridos tras la inmunización con la cepa salvaje SC5314 (■), la mutante PRI1-UV (∇) y un control con PBS (●).

Fig. 5: Gráfico que muestra la tasa de supervivencia de ratones, expresada como porcentaje sobre el total, frente a los días transcurridos tras la infección con la cepa de *C. albicans* SC5314, previamente infectados/inmunizados con la cepa mutante PRI1-UV obtenida por el procedimiento de la Fig. 2 (∇) y un control con PBS (●).

Fig. 6: Gráfico que muestra la tasa de supervivencia de ratones tras la inmunización con la cepa mutante PRI1-UV en dosis 5X (cinco veces superior a la utilizada en el ensayo de la Fig. 5) (■), dosis 5X+ recuerdo 1X (momento de reinfección señalado con una flecha) (∇) y un control con PBS (●).

Fig. 7: Gráfico que muestra la tasa de supervivencia de ratones tras la infección con la cepa salvaje SC5314, previamente infectados/inmunizados la cepa mutante PRI1-UV en dosis 5X (■), dosis 5X+ recuerdo 1X (∇) y un control con PBS (●).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en la generación de un mutante homocigótico de *Candida albicans* que no presenta copias funcionales del gen *Pir1* de dicho microorganismo y su uso para generar una respuesta inmune protectora en un mamífero (preferiblemente un ser humano), así como al procedimiento de preparación de dicho mutante y al plásmido con el que se obtiene.

Tal como se ha discutido previamente, los ensayos previos realizados en los que se había intentado la disrupción de dicho gen en la cepa CAI4 no habían permitido obtener un mutante nulo (carente de copias funcionales en dicho gen) por lo que se aceptaba que el gen *Pir1* de *Candida albicans* (abreviado *CaPIR1* de aquí en adelante) era esencial para la viabilidad de dicho microorganismo.

Sorprendentemente, y contrariamente a lo que se creía, se ha encontrado ahora que es posible obtener mutantes que carecen de copias funcionales de dicho gen (mutantes nulos) y que, aun así, son viables. Esto se ha comprobado utilizando para su generación

cepas de *C. albicans* distintas de la cepa CAI4, tales como la cepa SC5314 que es una cepa virulenta con fenotipo salvaje procedente de un aislado clínico de seres humanos. Además, los ensayos realizados en un modelo animal, concretamente en el modelo murino de inmunización por inyección en la vena caudal, demuestran que la cepa mutante obtenida no sólo es válida como vacuna viva atenuada que protege contra la candidiasis, proporcionando un elevado grado de inmunización (protección) frente a la posterior infección experimental con una cepa patógena silvestre de *C. albicans*. Como puede verse en los Ejemplos, una única dosis es suficiente para proteger a los modelos murinos utilizados de la infección por cepas virulentas, no siendo imprescindible, aunque puede administrarse, una segunda dosis de refuerzo de la primera. Por tanto, las cepas mutantes atenuadas de la presente invención pueden ser utilizadas para provocar una respuesta inmune en un mamífero susceptible de padecer candidiasis, preferiblemente un ser humano y, por ende, son candidatas a ser utilizadas en la preparación de un medicamento, particularmente en la preparación de una vacuna contra la candidiasis, especialmente candidiasis diseminada.

Así, la presente invención se refiere tanto a una cepa mutante de *C. albicans* que carece de copias funcionales del gen *PIR1* y a las composiciones que la comprenden, como a su uso como vacuna viva atenuada para proteger frente a la candidiasis, especialmente la candidiasis diseminada o sistémica. Tal como se utiliza en el presente documento, los términos “candidiasis diseminada” y “candidiasis sistémica” se consideran sinónimos.

El alcance de la invención se extiende también al procedimiento mediante el cual se ha obtenido dicha cepa mutante de *C. albicans*, así como al plásmido utilizado en dicho procedimiento como intermedio para obtener el mutante.

Tal como se ha comentado, el mutante de *C. albicans* de la presente invención no contiene copias funcionales del gen *CaPIR1*. Tal como se utiliza en la presente invención, se entiende por copia funcional de un gen aquella que es capaz de dar lugar a un producto funcional, bien sea, inicialmente, un ARN mensajero que puede ser traducido, o una proteína funcional que surge de la traducción de dicho ARN mensajero. Dicha proteína será funcional si ejerce la función que es conocida para la misma. Una proteína puede no ser funcional por distintas razones, generalmente porque presenta mutaciones respecto a la proteína de tipo silvestre que dan lugar a cambios en la misma que lo impiden. Dichos cambios pueden ser, por ejemplo, mutaciones, puntuales o de mayor longitud, que dan cambios en la conformación de la proteína de manera que a misma presenta una estructura diferente, no funcional; cambios de aminoácidos en el lugar o

sitio activo, particularmente en el caso de enzimas, o en lugar de unión de un ligando, especialmente en el caso de receptores, que impide la acción del ligando natural de dicha proteína y la actividad sobre el mismo que le sean propias, tales como la catálisis de una reacción en el caso de enzimas o un cambio conformacional de receptor que da lugar a distintas reacciones en la célula. Las mutaciones que dan lugar a esos cambios en la proteína pueden ser puntuales (la simple sustitución de un aminoácido por otro, la desaparición del mismo) o pueden ser el resultado de truncamientos de mayor tamaño con respecto a la secuencia de la proteína de tipo silvestre, que dan lugar a la aparición de partes de dominios o a dominios completos, incluidos el fragmento terminal de dicha proteína. Puede suceder también que, a partir de un determinado punto, la secuencia de aminoácidos cambie completamente con respecto a la de la proteína de tipo silvestre, dando lugar igualmente a una proteína inactiva o, en ocasiones, de menor actividad, que puede perder haber perdido los fragmentos de la misma a los que se unían ligando relacionados con mecanismos de control celular de su actividad, de manera que nunca resulte activada o, contrariamente, pierde la capacidad de inactivación y presente una actividad descontrolada.

Las modificaciones antes citadas que hacen que una proteína o polipéptido no sea funcional resultan a su vez de mutaciones en la secuencia de nucleótidos del gen a partir del cual se expresa. La desaparición del fragmento terminal de una proteína, por ejemplo, puede estar causado simplemente por una mutación en un nucleótido, que dé lugar a un codón de parada, parándose ahí la traducción del correspondiente polipéptido, o puede ser el resultado de la delección del fragmento de la secuencia codificante del gen que debería codificar ese fragmento de la correspondiente proteína. Un caso concreto de este tipo de delecciones son aquellos en los que se deleciona por completo el gen del genoma de una célula, o al menos la secuencia codificante de dicho gen, de manera que el gen no puede transcribirse en un ARN mensajero, que pueda ser traducido para dar lugar a una proteína. En seres eucarióticos como las levaduras, las mutaciones puntuales pueden ser también causa de variaciones en las localizaciones en las que se produce el *splicing* de la molécula de pre-ARN a partir de la cual, por mecanismos de corte y empalme, se genera el mensajero final; esas modificaciones de los sitios habituales de *splicing* pueden dar lugar a la pérdida de uno o más exones en el ARN mensajero, con la correspondiente desaparición de fragmentos completos de la proteína de tipo silvestre. También pueden ser causa de un cambio de la fase de lectura de los tripletes del ARN mensajero durante la traducción, que daría lugar a que, a partir de un determinado momento, la secuencia de aminoácidos del polipéptido sintetizado variara sensiblemente

(habitualmente por completo) con respecto a la de la proteína de tipo silvestre. Los cambios de lectura pueden resultar también de inserciones o deleciones puntuales de un único nucleótido. Cualquiera de estas mutaciones en un gen que den como resultado bien la síntesis de un polipéptido (proteína) no funcional, bien porque la modificación en su estructura impide que ejerza su actividad, bien porque la proteína como tal simplemente no se expresa, sería una mutación que daría lugar a un gen no funcional, según los propósitos de la presente invención. Cualquier procedimiento que dé lugar a un mutante carente de copias funcionales del gen *CaPIR1* será considerado, sean cuales sean las mutaciones concretas llevadas a cabo sobre la cepa parental de *C. albicans* de la que se parta, será considerado un procedimiento de la presente invención, pues permitirá llegar a un mutante de *C. albicans* de la presente invención.

Se prefieren los mutantes de disrupción, aquellos en los que la pérdida de funcionalidad de las copias del gen *CaPIR1* presentes en la cepa de *C. albicans* parental resulta de la interrupción de la secuencia del gen de tipo silvestre o de la zona del genoma en la que se encuentra, bien por inserción un nucleótido o un fragmento de ADN de mayor longitud en algún punto concreto del gen, o bien por delección de un fragmento de dicho gen. En una realización preferida de la invención, el mutante será un mutante de delección, en el que se habrá deleccionado al menos parte del gen y, más preferiblemente, al menos la secuencia codificante del mismo o un fragmento mayor que la comprenda. En dicha realización, todas las copias del gen *CaPIR1* presentes en la cepa parental habrán sido objeto de delección, de manera que no darán lugar a la expresión de una proteína funcional a partir de los mismos.

Para obtener dichos mutantes, los presentes inventores han desarrollado una técnica basada en el uso de un gen de selección, tal como un gen de resistencia a antibióticos (concretamente, del tipo estreptotricina en los ensayos de la presente solicitud) como gen marcador que puede ser utilizado en la cepa parental a partir de la cual se genera el mutante atenuado. En esta técnica se emplea un casete que contiene la secuencia codificante del gen marcador de selección (concretamente, por ejemplo, *CaSAT1*: eStreptotricina Acetil Transferasa, que confiere resistencia a antibióticos del grupo de la estreptotricina) que está operativamente unido al promotor de un gen constitutivo (p. ej., del gen *ACT1*, el promotor del gen que codifica para la proteína Actina), junto con un gen que codifica una recombinasa, como el gen *CaFLP* (gen que codifica para la proteína Flipasa) operativamente unido a un promotor inducible, es decir, un promotor que da lugar a que se produzca expresión del gen unido a él en determinadas condiciones

fácilmente controlables, como puede ser por adición al medio de cultivo de un determinado compuesto (por ejemplo, el promotor MAL2 de *Candida albicans*, inducible en presencia de maltosa: (Backen AC., Broadbent ID, Fetherston RW, Rosamond JDC, Schnell NF, Stark MJR: "Evaluation of the CaMAL2 promoter for regulated expression of genes in *Candida albicans*", *Yeast* 2000, 16(12), 1121-1129). En los extremos del casete se sitúan sendas secuencias de reconocimiento para la recombinasa (en el caso de la flipasa, secuencias FRT: *flippase recognition target*), para posibilitar la eliminación de todo lo comprendido entre ambos extremos en presencia de la correspondiente recombinasa (Senecoff J F, Rossmeissl PJ., Cox MM: "DNA recognition by the FLP recombinase of the yeast 2 μ plasmid: A mutational analysis of the FLP binding site", *Journal of Molecular Biology* 1988, 201(2): 405–421; Schlake T, Bode J: "Use of mutated FLP recognition target (FRT) sites for the exchange of expression cassettes at defined chromosomal loci", *Biochemistry* 1994, 33(43): 12746–12751). Para realizar la interrupción del gen *CaPIR1* (secuencia C2_08870C en la Base de datos de *Candida* (<http://www.candidagenome.org>)) se flanquea este casete por dos secuencias homólogas al gen a disrupcionar, *CaPIR1*, de alrededor de 300-550 pb: una secuencia en la zona 5' del casete homóloga a la zona de inicio del gen denominada F1 y otra secuencia en la zona 3' del casete homóloga a la zona 3' del gen denominada F2. De esta forma, tras transformar las células de la cepa parental como un vector integrativo que incorpore dicho casete, se permite la integración por recombinación homóloga del casete que contiene el gen de selección (habitualmente, de resistencia a un antibiótico) en el locus correspondiente del gen *CaPIR1*, quedando este delecionado. La incubación de las levaduras con condiciones adecuadas permitirá seleccionar las células que haya incorporado el gen de selección, pues serán las únicas capaces de crecer en dichas condiciones gracias a la expresión de dicho gen (p.ej., las células que crezcan en presencia del antibiótico, cuando el gen de selección sea un gen de resistencia a un antibiótico). Si dichas células se incuban en condiciones que den lugar a la inducción de la recombinasa (p. ej., en medio YPM, *yeast peptone maltose*, que incorpora maltosa), se producirá la delección de los componentes del casete antes descrita, quedando en el genoma las zonas F1 y F2 que lo flanqueaban. Cuando la cepa parenteral sea diploide, como es habitual en el caso de *C. albicans*, en un segundo paso de transformación se puede obtener la disrupción del segundo alelo, tal y como se muestra en la Fig. 2. Se prefiere que, tras cada etapa, se realice un análisis Southern así como PCR, que indican que las integraciones han tenido lugar en el sitio correcto y que confirma si es necesario repetir las etapas de transformación, selección de recombinantes y disrupción del gen

para obtener el mutante deseado.

Respecto al gen de selección, como se ha mencionado, se prefieren los genes de resistencia a antibióticos o antifúngicos. El mismo se elegirá en función de la cepa parental de la que se parta, que no debe ser de por sí resistente a dicho antibiótico. Esto
 5 permite la selección positiva de las células de levadura que han incorporado en su genoma el casete de disrupción por el criterio de sensibilidad/resistencia al antibiótico, pues dichas células de levadura serán las que podrán sobrevivir y dar colonias de tamaño fácilmente apreciable a la vista, en un período normal de incubación de placas (24-48 h), al hacerlas crecer en un medio de cultivo que contenga dicho antibiótico. Además del gen
 10 marcador que confiere resistencia a antibióticos del grupo de la estreptotricina (p.ej., la nurseotricina, utilizada en los ensayos reflejados de la presente memoria), pueden usarse con el mismo propósito otros bien conocidos tales como el gen *neo* de la neomicina fosfotransferasa (Beck E, Ludwig G, Auerswald EA, Reiss B, Schaller H; Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from
 15 transposon Tn5; Gene 1982 19(3):327-336), de resistencia a neomicina, o el gen de la higromicina fosfotransferasa (Gritz L, Davies J Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Sachharomyces cervisiae*; Gene 1983, 25:179-188), de resistencia a higromicina. La utilización de genes de resistencia a antibióticos facilita también la
 20 selección de las levaduras en las que se haya producido la delección del gen *PIR1* o del fragmento deseado del mismo, pues puede hacerse cultivando las levaduras en un medio que contenga el antibiótico a una concentración inferior a la concentración que puede considerarse letal (o muy limitante respecto a la velocidad habitual de crecimiento) para las levaduras y seleccionando las colonias que crecen muy lentamente en presencia del
 25 antibiótico. La delección del fragmento puede comprobarse de nuevo por análisis Southern y/o PCR.

En cuanto al promotor constitutivo al que está operativamente unido el gen de selección y que, por tanto, controla su expresión, además del promotor del gen de la actina antes
 citado, pueden utilizarse otros de uso habitual, conocidos por los expertos en la técnica,
 30 tales como promotores de genes de la vía glicolítica, como por ejemplo el de *GAP* (gliceroaldehído-3-fosfato deshidrogenasa: Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, Lair SV, Cregg JM: Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. Gene. 1997, 186: 37-44), o el de *PGK1* (3-fosfogliceratoquinasa: Tuite M, Dobson MJ, Roberts NA, King RM, Burke DC, Kingsman

SM, Kingsman AJ: Regulated high efficiency expression of human interferon-alpha in *Saccharomyces cerevisiae*: EMBO J. 1982, 1 (5): 603-608).

En cuanto al promotor inducible bajo cuyo control se coloca el gen de la recombinasa, hay también un amplio abanico de genes utilizables que posibilitan la expresión en levaduras. Se prefieren por ejemplo, los promotores inducibles por compuestos que las levaduras puedan utilizar en condiciones normales para la obtención de energía, como es el caso de la maltosa y los promotores inducibles por la misma, tales como el promotor MAL2 de *Candida albicans* (Backen AC., Broadbent ID, Fetherston RW, Rosamond JDC, Schnell NF, Stark MJR: "Evaluation of the CaMAL2 promoter for regulated expression of genes in *Candida albicans*", Yeast 2000, 16(12), 1121-1129), fácilmente compatibles con medios de cultivo de uso habitual o, incluso, que puedan estar contenidos en dichos medios de cultivo.

Existen distintas referencias y revisiones donde puede encontrarse tanto promotores constitutivos como promotores inducibles, como puede ser la revisión de Weindhandl *et al.* (Weinhandl K, Winkler M, Glieder A, Camattari A; Carbon source dependent promoters in yeasts; Microbial Cell Factories 2014, 13:5, DOI: 10.1186/1475-2859-13-5), donde se citan y discute la utilidad de distintos promotores, en su mayoría promotores de genes relacionados con el uso de distintas fuentes de carbono, como es el caso de promotores inducibles por maltosa de varias especies de levaduras, o también promotores de genes inducibles por otros compuestos como galactosa, sacarosa o etanol.

La elección de la recombinasa determinará las secuencias de reconocimiento que deban aparecer en los extremos del casete, en una posición del mismo más interna que los elementos F1 y F2. Así, si en lugar de la flipasa se utiliza la recombinasa Cre, por ejemplo, deberán utilizarse elementos loxP para que el proceso se lleve a cabo como se desea.

Las secuencias flanqueantes F1 y F2, homólogas a fragmentos del gen a delecionar, *CaPIR1*, se elegirán en función de la región de dicho gen *CaPIR1* que se quiera delecionar, pues el fragmento de dicho gen eliminado del genoma tras la recombinación homóloga será el que esté comprendido entre las secuencias homólogas a F1 y F2 en cada una de las copias de la cepa parenteral. Tal como se utiliza en la presente invención, una secuencia se considerará homóloga a otra si presentan una identidad de al menos el 85% de los nucleótidos de la secuencia más corta. Como se ha mencionado más arriba, se prefiere que el fragmento delecionado del gen incluya la secuencia

codificante del gen *CaPIR1* en su totalidad o esencialmente completa (es decir, de manera que permanezcan en el genoma, en cada extremo del gen, los nucleótidos correspondientes a no más de 10-15 aminoácidos), por lo que las secuencias F1 y F2 preferiblemente se elegirán a partir de las secuencias flanqueantes de la secuencia
5 codificante del gen *CaPIR1*, opcionalmente incorporando algún nucleótido de la misma. Para asegurar la recombinación homóloga, se prefiere que dichos fragmentos F1 y F2 tengan una longitud de al menos 20-25 nucleótidos, preferiblemente al menos 50 nucleótidos y, más preferiblemente, dichas secuencias tendrán un tamaño de al menos 300-550 nucleótidos. Ese es el caso de los fragmentos F1 y F2 utilizados en los ejemplos
10 de la presente solicitud, que corresponden a los fragmentos del gen comprendidos entre las posiciones -291 y +225, en el caso de F1, y +770 y +1159, en el caso de F2.

Para la construcción del plásmido con el cual se lleva a cabo el proceso de interrupción, particularmente cuando el mismo consista en la delección de un fragmento del gen que comprenda la parte codificante del mismo, puede partirse de un plásmido que comprenda
15 ya un casete como los elementos deseados (fragmento de reconocimiento por recombinasa – promotor inducible-secuencia codificante de la recombinasa – promotor constitutivo-gen marcador de selección – fragmento de reconocimiento por recombinasa), como es el caso del plásmido pSFS2A e insertar sucesivamente en el mismo, flanqueando el casete de interrupción, los elementos F1 y F2, una vez construidos. El
20 método de preparación del plásmido puede incorporar un paso previo en el que se construya el casete de interrupción, lo que facilita la utilización de otros promotores distintos y genes de selección diferentes, insertando dicho casete de interrupción en un plásmido base, o partiendo de un plásmido base en el cual esté incorporado alguno de los elementos del casete de interrupción e insertando paso a paso en el mismo los demás
25 de manera que los elementos FRT queden flanqueando a la sucesión de elementos promotor inducible-secuencia codificante de la recombinasa – promotor constitutivo-gen marcador de selección. Como ya se comentó antes, la secuencia codificante de la recombinasa y la del marcador de selección pueden estar colocadas de manera que se expresen en el mismo sentido, es decir, que su transcripción se produzca a partir de la
30 misma cadena del plásmido, de forma que uno de los promotores, al que podemos llamar el primer promotor (bien el inducible, correspondiente a la recombinasa, o el constitutivo, correspondiente al marcador de selección) estará muy próximo a uno de los elementos de reconocimiento por la recombinasa, mientras el otro promotor, al que podemos llamar el segundo promotor estará contiguo a la secuencia codificante que está bajo el control
35 del primer promotor. La recombinasa y el gen marcador de selección del casete disruptivo

pueden también expresarse en sentidos opuestos, de manera que serán los promotores los que se coloquen contiguos en la zona del casete de disrupción más alejada de los elementos de reconocimiento por la recombinasa, mientras que los extremos de las correspondientes secuencias codificantes quedarán más próximos a los elementos de reconocimiento por la recombinasa.

Respecto al plásmido base, a partir del cual se construye el plásmido con el que se ejecuta el proceso de disrupción en *C. albicans*, deberá contener un origen de replicación adecuado en una bacteria de interés, tal como *Escherichia coli*, para facilitar su multiplicación y la de los plásmidos generados a partir del mismo. Además, preferiblemente contendrá a su vez un gen marcador de selección que facilite el proceso de selección de las bacterias que lo contengan durante su amplificación y, especialmente, la del plásmido con el que se lleve a cabo la disrupción y de los plásmidos intermedios que sean necesarios hasta llegar al mismo. Dicho gen marcador de selección en bacterias puede ser un gen de resistencia a antibióticos de los habituales y conocidos por los expertos en la materia, tal como un gen de resistencia a un antibiótico que puede ser el gen de la cloranfenicol acetiltransferasa, que confiere resistencia al cloranfenicol y se abrevia a menudo como CloR, o el de resistencia a ampicilina, abreviado comúnmente AmpR, que codifica una beta-lactamasa, u otro cualquiera de los que se utiliza habitualmente. Preferiblemente, este segundo gen de selección será diferente del contenido en el casete de disrupción. También es preferible, además, que dicho plásmido no contenga un origen de replicación autónomo funcional en *Candida albicans*, para garantizar el proceso de selección de las levaduras que hayan integrado el casete de selección cuando dicha selección se haga por el criterio de sensibilidad/supervivencia en presencia del factor de selección. Así, por ejemplo, cuando el factor de selección sea un antibiótico, no habrá posibilidades de supervivencia para aquellas levaduras en las que no se haya integrado el casete de selección con el gen de resistencia a dicho antibiótico, La base de datos de Addgene (<http://www.addgene.org>) y su correspondiente repositorio de plásmidos pueden utilizarse tanto para la elección del plásmido base de partida como para obtener el mismo. Distintas compañías comerciales tienen también un amplio repertorio de plásmidos compatibles con la presente invención, como pueden ser los plásmidos de la serie pGEM®-T y pGEM®-T Easy suministrados por Promega (<https://www.promega.es/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol/>).

Para que se produzca la disrupción del gen *CaPIR1*, el plásmido que contiene el casete

de interrupción completa, incluidas las secuencias flanqueantes F1 y F2 homólogas a fragmentos del gen, debe introducirse en la cepa de *C. albicans* de partida, a la que puede denominarse cepa parental. La introducción del plásmido puede favorecerse por cualquiera de los métodos conocidos por los expertos en la materia, tales como la electroporación, u otros métodos de transformación serían el empleo de esferoplastos del hongo y la transformación mediante el empleo de cationes (Shigeyuki Kawai, Wataru Hashimoto & Kousaku Murata (2010): Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi, *Bioengineered Bugs*, 1:6, 395-403, DOI: 10.4161/bbug.1.6.13257). Se prefiere la electroporación, como en los ejemplos de la presente memoria, por ser más eficiente y sencilla de ejecutar.

Tal como se utiliza en el presente documento, se denomina cepa parental a la cepa de partida en la cual se lleva a cabo la inactivación de todas las copias activas del gen *CaPIR1* presentes en la misma. En principio, el procedimiento de la presente invención es compatible con la elección de cualquier cepa parental. Sin embargo, como ya se ha comentado, ensayos previos del grupo de los presentes inventores (Martínez *et al.*, 2004, referencia antes citada) con la cepa CAI4, mostraron que la generación de mutantes dobles de delección del gen *CaPIR1* en dicha cepa no permitieron obtener mutantes viables, por lo que se prefiere poner la condición de no utilizar dicha cepa, aunque otros medios de inactivación distintos por los utilizados por Martínez *et al.* 2004 podrían dar lugar a resultados diferentes. Sin querer adscribirse a ninguna teoría, se cree ahora que los resultados previos obtenidos con la cepa CAI4 podrían haberse debido a que las mutaciones ya presentes en la misma hacían indispensable la actividad del gen *CaPIR1* para la viabilidad de la misma. Así, se prefiere que la cepa parental sea una cepa silvestre, más preferiblemente obtenida de un aislado clínico, como es el caso de la cepa SC5314 utilizada en los ensayos divulgados en el presente documento.

Para su administración al mamífero en el cual se quiere desencadenar una respuesta inmune protectora, el mutante de la presente invención se administrará en forma de una composición adecuada que lo contenga. Las composiciones que comprendan un mutante de la invención son también un objeto comprendido dentro del alcance de la presente invención, especialmente las que comprendan el mutante y al menos un excipiente farmacéuticamente adecuado.

Según indican los ensayos divulgados en el presente documento, los mutantes de *C. albicans* pueden administrarse en un vehículo acuoso, que puede ser agua o, preferiblemente, una solución tampón tal como el PBS (*Phosphate Buffer Solution*:

solución de tampón fosfato), que tiene varias formulaciones, en las que normalmente están presentes cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio, en la que el pH se mantiene estable (con pequeñas oscilaciones respecto al valor de 7,4) gracias a los grupos fosfato y la osmolaridad coincide con la del cuerpo humano, siendo así isotónica. La misma puede prepararse por disolución de las sales antes mencionadas en agua, preferiblemente destilada o, aún mejor, desionizada, (véase, por ejemplo, la publicación original de Dulbecco, R.; et al. "Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses", 1954. J. Exp. Med. 99 (2): 167–182. doi:10.1084/jem.99.2.167), o puede adquirirse ya preparada a diversos proveedores, como Sigma-Aldrich (http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p3619?lang=es®ion=ES&cm_sp=Insite-_-prodRecCold_xviews-_-prodRecCold10-1). Otras soluciones salinas, preferiblemente isotónicas y tamponadas de manera que su pH sea cercano a 7 (comprendidas en el intervalo de 6,5 – 8), incluida la solución salina tradicional. La invención es también compatible con otras formas de preparación.

Respecto a la forma de administración, puede utilizarse la vía sistémica, análoga a la utilizada en los modelos murinos con los que se han realizado los ensayos divulgados en el presente documento. En ese caso, la formulación en un vehículo acuoso puede ser una opción adecuada. Pueden utilizarse también otras vías de administración, como la vía oral o intragástrica.

En una posible realización de la invención, el mutante vivo atenuado de *C. albicans* que se administra es el mutante que se denomina más adelante CaPRI1, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número CECT 13120. Dicho mutante se obtiene por aplicación del procedimiento de la invención sobre la cepa silvestre SC5314 y, como se muestra en el Ejemplo 2 del presente documento, no sólo da lugar a la generación de una respuesta protectora por su administración a los ratones (modelo murino) por vía sistémica, que no hace imprescindible la administración de una segunda dosis de refuerzo, sino que parece ser inocuo para los animales tras ser inyectado a diferentes concentraciones, siendo así incluso a las concentraciones más altas.

La invención se describe ahora con mayor detalle mediante los Ejemplos y Figuras que aparecen a continuación.

Ejemplos

Ejemplo 1. Obtención del mutante de *Candida albicans* para el gen *CaPIR1*

1.1. Obtención de DNA genómico de *Candida albicans* SC5314

La cepa de *C. albicans* SC5314 / ATCC MYA-2876 (Gillum A.M., Tsay E.Y., Kirsch D.R., Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations, 1984, Mol Gen Genet 5 198:179-182) se cultivó en medio YPD (g/L de cultivo: peptona, 20; glucosa, 20; extracto de levadura 10) durante toda la noche a 28°C. Se recogieron las células por centrifugación, se lavaron con agua, y se resuspendieron en 200 µL de tampón de lisis (EDTA 20 mM, Tris-HCl 50mM, SDS 1%, Tritón X-100 1%, NaCl 10mM). Se añadieron 0,3 g de perlas de vidrio (Sigma) y se procedió a realizar 4 ciclos de 50 segundos en 10 vórtex a máxima velocidad alternado con 1 min en hielo. Una vez obtenidas las células rotas se incubaron a 70°C durante 10 min. Después se añadieron 200 µL de AcK 4 M y 150 µL de NaCl 5 M y se incubó la mezcla en hielo durante 20 min. Tras una centrifugación a máxima velocidad durante 20 min, se recogió el sobrenadante con cuidado y se añadieron 0,33 volúmenes de PEG-6000 al 30% en tampón TE. Se mezcló y 15 se incubó en hielo durante 10 min. Se recogió el ADN precipitado después de centrifugar la preparación a 12.000 rpm 10 min y se resuspendió en 300 µL de TE.

1.2. Disrupción del gen *CaPIR1* y obtención del mutante

Tal como se ha comentado anteriormente, se ha desarrollado una técnica basada en el uso de un gen de resistencia a antibióticos del tipo estreptotricina como gen marcador en 20 la cual puede ser usada la cepa SC5314. Para general el mutante atenuado de los ensayos que se muestran a continuación, se empleó un casete que contiene el gen marcador *CaSAT1* (eStreptotricina Acetil Transferasa) bajo el promotor constitutivo del gen *ACT1* (promotor del gen que codifica para la proteína Actina), el gen *CaFLP* (gen que codifica para la proteína Flipasa) bajo el promotor inducible MAL2 de *C. albicans*. Para 25 realizar la interrupción del gen *CaPIR1* (secuencia C2_08870C en la Base de datos de *Candida* (<http://www.candidagenome.org>)) se ha flanqueado este casete por dos secuencias homólogas al gen a disrupcionar de alrededor de 300-500pb: una secuencia en la zona 5' del casete homóloga a la zona de inicio del gen denominada F1 y otra secuencia en la zona 3' del casete homóloga a la zona 3' del gen denominada F2. De 30 esta forma se permite la integración por recombinación homóloga del casete que contiene el gen *SAT1* en el locus correspondiente del gen *PIR1*. En un segundo paso de transformación se puede obtener la disrupción del segundo alelo, tal y como se muestra en la Fig. 2. A continuación se describen los pasos efectuados con mayor detalle.

1.2.a) Construcción del casete de interrupción

La construcción del casete de interrupción se efectúa sobre el plásmido pSFS2A (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/50059745>) (Reuss,O., Vik,A., Kolter,R. and Morschhaeuser,J, The *SAT1* flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*, 2004, Gene 341, 119-127), que contiene el casete con el marcador CaSAT1. El plásmido de interrupción se construye en varias etapas según se muestra en la Fig. 3:

Etapa 1. Amplificación por PCR de un fragmento F1 de 515 pb usando el genoma de la cepa SC5314 como DNA molde y utilizando los oligonucleótidos PRI1-KpnI (SEQ ID NO:1) y PRI1-XhoI (SEQ ID. NO: 2)

10 PRI1-KpnI:

5'-CACAGGTACCTTAGTATTGTTACTTTGTTAG-3'

PRI1-XhoI:

5'-CACACTCGAGTTTGTTATCATTCTAGTCAATG-3'

Ambos oligonucleótidos adicionan una diana única a la construcción para el corte con enzimas de restricción (*KpnI* en PRI1-KpnI) y (*XhoI* en PRI1-XhoI) que facilitan la clonación dirigida del fragmento obtenido F1 (SEQ. ID. NO:3).

La amplificación por PCR se realiza en un volumen de 50 µL que contiene 0,25 unidades de la ADN polimerasa EcoTaq Plus (Ecogen) con el tampón suministrado por el fabricante, 0,25 mM de la mezcla de dNTPs, 0,4 µM de cada oligonucleótido cebador y 100 ng del ADN molde. El programa usado en el termociclador consiste en un primer paso de desnaturalización del ADN a 94°C durante 5 min. Seguidamente se pasa a una repetición de 30 ciclos en los que se desnaturalizó a 94°C durante 30 s seguido de un paso de hibridación de 30 s a la temperatura seleccionada para este fin y un último paso de elongación a 72°C durante un tiempo de 1 min por cada Kb. Se selecciona la temperatura de fusión indicada por el fabricante como temperatura de hibridación del oligonucleótido cebador. Estas condiciones se utilizan en todas las amplificaciones descritas en esta solicitud.

Etapa 2. Amplificación por PCR de un fragmento F2 de 413 pb mediante el empleo de el mismo DNA molde y los oligonucleótidos PRI1-NotI (SEQ. ID. NO:4) y PRI1-SacI (SEQ ID NO:5)

PRI1-NotI

5'-CACAGCGGCCGCTACTGCTGAAAATGTTGCTAAAGC-3'

PRI-SacI

5'-CACAGGAGCTCTTTAACAGTTGACAAATTCAATG-3'

5 Ambos oligonucleótidos adicionan una diana única a la construcción para el corte con enzimas de restricción (NotI en PRI1-NotI) y (SacI en PRI1-SacI) que facilitan la clonación dirigida del fragmento obtenido F2 (SEQ. ID. NO:6).

Etapa 3. Clonación de los amplicones F1 (SEQ ID NO:3) y F2 (SEQ ID NO:6) en el plásmido comercial pGEM-T Easy (Promega), originando directamente los plásmidos pGEM-F1 (SEQ ID NO:7) y pGEM-F2 (SEQ ID NO:8), respectivamente.

10 Etapa 4. Digestión del plásmido pGEM-F1 (SEQ ID NO:7) y del plásmido pSFS2A con las enzimas de restricción *KpnI* y *XhoI* (ambas adquiridas a Promega) según las instrucciones del fabricante, y posterior purificación del fragmento F1 y del fragmento pSFS2A abierto, utilizando un kit comercial de elución de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa (Gel Extraction Kit, Roche). Ligación de ambos fragmentos y
15 transformación en una alícuota de *E. coli* DH5 α quimiocompetentes (Hanahan, 1985). El plásmido originado (pSFS2A-F1) (SEQ ID NO:9) se muestra en la Fig. 3.

Etapa 5. Digestión del plásmido pGEM-F2 (SEQ ID NO:8) con las enzimas *NotI* y *SacI* (ambas adquiridas a Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante, elución del fragmento obtenido utilizando, como en la Etapa 4, un kit comercial (Gel Extraction Kit,
20 Roche) y ligación con el fragmento correspondiente al plásmido pSFS2A-F1 (SEQ ID NO:9) digerido con las mismas enzimas y originando el plásmido pPDC (SEQ ID NO:10) mostrado en la Fig. 3.

Etapa 6. Digestión con las enzimas *KpnI* y *SacI*, del plásmido pPDC obtenéndose el fragmento F3 (SEQ ID NO:11) que posteriormente se usa para la transformación como
25 casete de disrupción.

1.2.b) Obtención del mutante de *Candida albicans* para el gen *CaPIR1*

La transformación integrativa en *C. albicans* se realizó siguiendo el método de Reuss *et al.* (2004). Básicamente el método consistió en electroporar 40 μ L de una suspensión de células de *C. albicans* en presencia de 3 μ g (2 μ L) del fragmento a integrar F3 (SEQ ID
30 NO:11) purificado por electroforesis y eluido en columna (Gel Extraction Kit, Roche). El proceso de electroporación se realizó en una cubeta de 0,2 cm (BioRad) a 1,8 kV en un

electroporador modelo GenePulser de la misma marca comercial. Tras la electroporación las células se lavaron con 1 mL de sorbitol 1 M, se resuspendieron en 1 mL de YPD y se incubaron durante 4 h a 28 °C. Posteriormente se sembraron en placas de YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa) conteniendo 200 µg/mL de nurseotricina (Jena Bioscience, Jena, Alemania) y se incubaron a 28 °C durante 24 h. Con esa concentración del antibiótico, sólo las células en cuyo genoma se haya incorporado el casete de disrupción, con el gen de resistencia al antibiótico, pudieron sobrevivir y dar lugar a colonias de tamaño fácilmente apreciable a la vista; incubaciones más prolongadas (superiores a 48 h y, especialmente, de 5, 6 ó 7 días), dieron lugar a la aparición de colonias mucho más pequeñas, difícilmente apreciables a simple vista, correspondientes a células sensibles al antibiótico, en las que se no se había integrado el gen de resistencia al mismo, y que crecían muy lentamente en presencia del mismo. Como ya se comentó, dado que ni el casete de disrupción ni el plásmido completo tienen un origen de replicación autónomo funcional en *C. albicans*, si no ha habido integración en el genoma, no hay posibilidad de que confiera resistencia a las células.

Varias de las colonias que crecieron con un tamaño claramente apreciable a simple vista tras 24 h de cultivo con 200 µg/mL del antibiótico, se crecieron de nuevo en medio YPD 4 h a 28°C. A continuación, se tomaron alícuotas de los cultivos obtenidos y se comprobó la integración del casete de disrupción en la ubicación adecuada mediante Southern y PCR, comprobando que en todos los casos se había producido la integración del casete de disrupción en sustitución de un único alelo.

Concretamente, la detección de secuencias específicas de ADN se llevó a cabo utilizando la técnica descrita por Southern (1975) y modificada por Sambrook *et al.* (1989). El marcaje de las sondas de ADN se realizó utilizando el DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche®) que incorpora digoxigenina-11-dUTP en una reacción catalizada por la subunidad Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli*, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Por cada mezcla de reacción se desnaturalizaron aproximadamente 500 ng de ADN durante 10 min a 95 °C, enfriándolas después en hielo. A continuación se adicionó al ADN desnaturalizado: 2 µl de la mezcla de hexanucleótidos, 2 µl de mezcla de dNTPs de marcaje y 1 µl del enzima Klenow hasta un volumen total de 20 µl. La incubación a 37°C durante 20 horas permitió un buen marcaje. Para detener la reacción transcurrido el tiempo requerido, se añadió 2 µl de EDTA 0,5 M. Después al ADN marcado se le añadió LiCl en proporción 1/4 del volumen final de la mezcla, junto con 2,5 volúmenes de EtOH absoluto y se precipitó durante al menos 30 min a -70 °C o también

durante toda la noche a -20°C . Posteriormente el ADN se secó al aire y se redisolvió en 20 μl de tampón TE (10 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0). La concentración de la sonda, (es decir, la calidad de marcaje) se estimó previamente a la hibridación, mediante la comparación de una serie de diluciones de la sonda creada con otra serie de diluciones de un ADN marcado control. El ADN de la levadura en concentración adecuada (entre 12 μg y 20 μg para una buena detección) fue digerido por enzimas de restricción adecuadas, en este caso por *HindIII*, durante 30-48h; posteriormente el ADN fue precipitado y tras resuspenderlo en 20 μl de TE buffer, se separaron los fragmentos resultantes de acuerdo a su tamaño en un gel de agarosa al 2% en TAE. Una vez teñido el gel con Br-Et y visto que las digestiones y la separación se habían realizado con éxito, el gel se lavó dos veces durante 15 min con HCl 0,25 M para realizar una despurinación parcial y así facilitar su transferencia a la membrana. Después se desnaturizó con NaOH 0,5 M/NaCl 1,5 M durante 30 min y se incubó en tampón neutralizante (NaAc 3 M, NaCl 1,5M, Tris-HCl 0,5 M, pH 5,5) durante 30 min. Por último se realizó un lavado en el tampón 5xSSC (NaCl 1 M, Citrato sódico 0,1 M, pH 7,0). La transferencia del ADN a una membrana de nylon Hybond-N (Amersham®) se realizó por capilaridad durante al menos 12h en 20x SSC (3 M NaCl, citrato sódico 0,3 M / pH 7,0) a T ambiente. Transcurrido este tiempo la membrana fue lavada 10 min en 5xSSC para eliminar posibles restos de agarosa. Por último, para fijar el ADN a la membrana, tras dejarla secar durante 3 min, se le irradió con luz UV durante 3 min (312 nm). La hibridación de las membranas se realizó mediante el empleo de sondas marcadas no radiactivamente como se ha descrito anteriormente. Para saturar los sitios de unión no específicos de la membrana de nylon Hybond-N (Amersham®) esta fue incubada primero durante 1-3 h en 45 ml de solución de prehibridación (5x SSC, 50% formamida desionizada, 0,02% SDS, 1% reactivo de bloqueo (Roche®), 0,1% N-laurilsarcosina, pH 7,0) a 68°C . Mientras tanto, se desnaturizó la sonda de ADN marcada con DIG durante 10 min a 95°C , posteriormente fue enfriada brevemente en hielo y añadida a 5 ml de solución de prehibridación. Pasado este tiempo se retiró la solución de prehibridación y se llevó a cabo la hibridación de la membrana añadiendo al tubo la sonda marcada desnaturizada, durante 16 h en un baño de agua a 68°C . A continuación la membrana fue lavada dos veces durante 5 min con el tampón NRW1 (2x SSC 0,1% SDS) a T ambiente, seguido de dos lavados de 15 min con tampón NRW2 (0,1xSSC, 0,1% SDS) a 68°C , para eliminar el exceso de sonda así como la sonda unida de forma no específica. Con la intención de bloquear los sitios de unión inespecíficos, la membrana fue lavada brevemente con tampón NRB1 (100 mM de ácido maleico, 150 mM NaCl, pH 7,6) e incubada durante 60 min en tampón NRB2

(1% (w/v) de reactivo de bloqueo (Roche®) en tampón NRB1, pH 9,5) a T ambiente. Este paso fue seguido de una incubación con 4 µl del anticuerpo anti-DIG conjugado con fosfatasa alcalina (Roche®) en 20 ml de la solución NRB2 durante 45 min a T ambiente. Tras dos etapas de lavado con tampón NRB1 de 15 min, se procedió a la equilibración de la membrana en NRB3 (10 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) durante 1 ó 2 minutos para la posterior detección.

Tanto la prehibridación como la hibridación se realizaron en tubos de vidrio siliconizados en un horno de hibridación Hybridizer HB-1D (Techne®). La detección de la sonda unida al ADN se realizó mediante NBT (Roche®), un método defosforilante y oxidante para dar un color azul oscuro (añil) en la misma membrana, como un producto de oxidación. Se emplearon 10 ml del tampón NRB3 junto con 200 µl del kit NBT/BCIP (Roche®). La membrana fue puesta en oscuridad hasta la aparición de señales, en un tiempo máximo de 4h. Para parar la reacción simplemente se lavó la membrana con agua.

La sonda marcada fue la correspondiente al fragmento F1.

En cuanto a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se llevó a cabo en un termociclador Minicycler® (MJ Research). El contenido de cada tubo de reacción fue el siguiente: se usó entre 0,25 y 2 unidades de la ADN polimerasa EcoTaq® Plus (Ecogen) con el tampón suministrado en el kit, 0,25 mM de la mezcla de dNTPs, 0,4 µM de cada oligonucleótido cebador y se usó entre 10 y 100 ng del ADN molde. Como cebadores se emplearon PRI-Kpn (SEQ ID NO:1) y PRI1-Sac (SEQ ID NO:5), que pueden diferenciar dos bandas de 1400 pb y 1300 pb, cada una de las cuales corresponde a uno de los alelos del gen *CaPIR1* presentes en las células de partida (Martínez *et al.*, 2004, referencia citada anteriormente). El programa usado en el termociclador consiste en un primer paso de desnaturalización del ADN a 94°C durante 2-5min. Seguidamente se pasa a una repetición de 30 ciclos en los que tiene lugar un paso de desnaturalización a 94°C durante 30 s seguido de un paso de hibridación de 30 s a la temperatura seleccionada para este fin y un último paso de elongación a 72°C durante un tiempo de 1 min por cada 1 kb. Se seleccionó la temperatura de fusión (T_m) indicada por el fabricante como temperatura de hibridación del oligonucleótido cebador. La amplificación de las dos bandas antes citadas, 1400 pb y 1300 pb, indicó que los dos alelos estaban intactos, no habiéndose producido la integración del casete de disrupción; la amplificación de una sola de las bandas indicó la inserción del casete de disrupción en sustitución del alelo no amplificado; la no aparición de ninguna de las dos bandas indicaría la sustitución de los alelos, no siendo necesaria en ese caso la repetición del proceso de transformación.

A todos los mutantes obtenidos, en los que se había producido la inserción del casete de
 disrupción en sustitución de un único alelo, se les dio la denominación general de *pri1-
 2::SAT1*. Tras la comprobación, se tomaron alícuotas adicionales de los cultivos de *pri1-
 2::SAT1* obtenidos y se cultivaron en medio que contenía maltosa, concretamente YPM
 5 (*yeast peptone maltose*: 1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% maltosa), durante toda
 la noche (o/n) a 28°C. Posteriormente, se sembraron en placas de YPD conteniendo en
 este caso 25 µg/mL de nurseotricina y se incubaron durante 48 h a 28°C. Tras ese tiempo
 de cultivo a esa baja concentración de antibiótico, y de forma análoga a lo descrito por
 Reuss *et al.* en 2004 en la referencia citada anteriormente, se observaron en la placa de
 10 cultivo colonias de dos tamaños distintos: colonias de gran tamaño, similar al de una
 lenteja, correspondientes a las células que conservaban el gen de resistencia al
 antibiótico, y otras de pequeño tamaño, similar al de la cabeza de un alfiler,
 correspondientes a células que crecían muy lentamente en presencia del antibiótico. Este
 crecimiento lento de algunas células indicó que la flipasa había actuado, dando lugar a la
 15 delección de la porción del casete de disrupción comprendida entre las dos secuencias
 FRT, con la pérdida del gen *SAT1* de resistencia a la nurseotricina. Por ello, se
 seleccionaron colonias de pequeño tamaño para continuar el proceso. Los mutantes
 obtenidos se denominaron, genéricamente, *pri1-2Δ*.

Las colonias seleccionadas se sometieron de nuevo al proceso descrito en esta sección
 20 1.2.b), para la disrupción del segundo alelo del gen *CaPIR1* aún presente.

Una de las colonias obtenidas al final del proceso se le dio la denominación "PRI1-UV" y
 se depositó en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número CECT
 13120. Al igual que la cepa de *Candida albicans* de partida, dicha cepa mutante atenuada
 puede cultivarse en medio YPD a 28°C; en caso de cultivarse en placas Petri, se
 25 recomiendan 24-48 h de cultivo sin agitación.

Ejemplo 2.- Inmunización de ratones

Los ensayos de inmunización con la cepa de *C. albicans* avirulenta (PRI1-UV) se
 realizaron en un modelo murino: ratones Swiss CD-1, proporcionados por el Centro
 Registrado para Cría, Suministro y Experimentación Animal de la Universidad de Murcia
 30 (número de registro de explotaciones ganaderas: REGA ES300305440012). Los grupos
 experimentales consistieron en 10 hembras, de entre 6 y 7 semanas, con un peso medio
 de 24 g. Las cepas de *C. albicans*, tanto el aislado clínico con fenotipo salvaje SC5314
 como la cepa PRI1-UV, se cultivaron en YPD. Al alcanzar la fase de crecimiento

exponencial ($OD_{600}=0,8$), se lavaron con PBS que tiene la siguiente composición en g/L (NaCl, 8; KCl, 0,2; Na_2HPO_4 , 1,44; KH_2PO_4 , 0,24; pH=7,4) y se calculó su concentración. Posteriormente, se inyectaron diferentes dosis las levaduras en la vena caudal. A los controles se les inyecta PBS en volúmenes equivalentes.

5 2.1. Inmunización con dosis 1X e infección

Se inyectaron $1,5 \times 10^6$ levaduras por ratón (dosis 1X) en 150 μ L de PBS. Tras 13 días de observación, todos los animales infectados con la cepa salvaje SC5314 habían muerto, mientras que la supervivencia de los animales inyectados con PBS o la cepa PRI1-UV es del 100% según se muestra en la Fig. 4.

10 Posteriormente a la infección primaria con la cepa PRI1-UV (inmunización), se inyectó a los ratones la cepa salvaje SC5314 (virulenta). Se realizó el mismo procedimiento en los controles inyectados con PBS. La dosis se calculó para cada animal en función de su peso, para mantener un ratio de número de levaduras/peso del animal equivalente ($6,25 \times 10^4$ levaduras/g de peso del ratón). Los ratones previamente inmunizados con la cepa
 15 avirulenta PRI1-UV presentaron una tasa de supervivencia del 22,2% tras 16 días de infección, mientras que todos los ratones usados como control (sin inmunización previa) murieron, según se muestra en la Fig. 5.

2.2. Inmunización con dosis 5X e infección

Se realizó el mismo tipo de experimento descrito en el apartado 2.2, pero utilizando dosis
 20 cinco veces superiores de la cepa mutante PRI1-UV ($7,55 \times 10^6$ levaduras por ratón), demostrándose que siguen siendo inocuas para los animales 12 días después de la inoculación. El lote se dividió en dos. Al primer lote (PRI1-UV-5X) se le deja crecer seis días más. Al segundo lote (PRI1-UV-5X+1X) se le inyectó una segunda dosis de recuerdo con la dosis 1X ($1,5 \times 10^6$ levaduras por ratón) y se le dejó crecer también seis
 25 días, según se muestra en la Fig. 6. Tras 18 días de la infección primaria (inmunización), se les inyectó a los ratones supervivientes (controles, infectados con la cepa PRI1-UV-5X e infectados con la cepa PRI1-UV-5X+1X) las levaduras de la cepa salvaje SC5314. Las tasas de supervivencia son del 90-100% tras 9 días de infección en los lotes con ratones inmunizados, mientras que todos los ratones usados como control (inyectados con PBS,
 30 sin inmunización previa) murieron, según se muestra en la Fig. 7

Depósito de materia biológica

La cepa mutante de *Candida albicans* "PRI1-UV" cuya generación se divulga en la presente solicitud se depositó en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de València, Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna, Valencia, España, bajo las condiciones del Tratado de Budapest. La fecha de depósito y el número asignado son los siguientes:

Cepa mutante	Nombre Abreviado	Número de Depósito	Fecha de depósito
Cepa mutante de <i>Candida albicans</i> SC5314 en el gen PRI1	PRI1-UV	CECT 13120	8 de enero de 2015

REIVINDICACIONES

1. Una cepa mutante de *C. albicans* que carece de copias funcionales del gen *PIR1* de dicha cepa (gen *CaPIR1*).

5 2. Cepa mutante según la reivindicación 1, obtenida a partir de una cepa de *C. albicans* distinta de la cepa CA14.

3. Cepa mutante según la reivindicación 1 ó 2, en la que las copias funcionales del gen *PIR1* se han inactivado por disrupción.

10 4. Cepa mutante según la reivindicación 3, en la que todas las copias del gen *CaPIR1* presentan una delección parcial o total del gen.

5. Cepa mutante según la reivindicación 4, en la que todas las copias del gen *CaPIR1* presentan una delección parcial o total de la secuencia codificante del gen *CaPIR1*.

15 6. Cepa mutante según la reivindicación 5, en la que todas las copias del gen *CaPIR1* presentan una delección total de la secuencia codificante del gen *CaPIR1*.

7. Cepa mutante según la reivindicación 6, que es la cepa obtenida a partir de la cepa salvaje SC5314 (ATCC MY-2876) depositada en la Colección Española de cultivos Tipo con el número CECT 13120.

20 8. Una composición que comprende una cepa mutante de *C. albicans* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. Composición según la reivindicación 8, en la que la cepa mutante de *C. albicans* está en suspensión en una solución acuosa o agua.

25 10. Composición según la reivindicación 9, en la que la cepa mutante de *C. albicans* está en suspensión en una solución salina acuosa isotónica cuyo pH pertenece al intervalo de 6,5 – 8.

11. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que adicionalmente comprende excipientes farmacéuticamente aceptables.

30 12. Un procedimiento para obtener una cepa mutante de *C. albicans* que carece de copias funcionales del gen *PIR1* de dicha especie (*CaPIR1*), que comprende las etapas de:

a) transformar la cepa parental de *C. albicans* de partida con un vector integrativo que presenta un casete de disrupción que comprende los siguientes elementos:

5 i) fragmentos flanqueantes F1 y F2 situados cada uno de ellos en un extremo del casete, en donde los fragmentos F1 y F2 son homólogos a fragmentos del gen *CaPIR1* situados, respectivamente, aguas arriba y aguas abajo con respecto a la región del gen *CaPIR1* que se desea delecionar,

10 ii) fragmentos que comprenden que comprenden la secuencia de reconocimiento de una recombinasa contiguos a los fragmentos flanqueantes F1 y F2,

iii) la secuencia codificante de una recombinasa operativamente unida a un promotor de expresión inducible en *C. albicans*,

15 iv) la secuencia codificante de un gen marcador de selección operativamente unido a un promotor de expresión constitutiva en *C. albicans*;

b) seleccionar las células de levadura en las que se ha incorporado en el genoma el casete de disrupción cultivándolas en condiciones en las que sólo sobreviven aquellas que han incorporado en el genoma el casete de disrupción,

20 c) cultivar las levaduras de *C. albicans* transformadas con el vector integrativo en condiciones en las que se induce la expresión de la recombinasa,

d) seleccionar las levaduras en las que se ha producido la delección del fragmento del gen *CaPIR1* deseado,

25 e) repetir las etapas b) a d) hasta que se haya delecionado el fragmento deseado del gen *CaPIR1* en todas las copias del mismo inicialmente presentes en la cepa parental de partida.

13. El método según la reivindicación 12, donde los fragmentos F1 y F2 tienen cada uno de ellos una longitud de al menos 20-25 pares de bases.

14. El método según la reivindicación 13, donde los fragmentos F1 y F2 tienen cada uno de ellos una longitud de 300 – 550 pares de bases.

30 15. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que los

fragmentos F1 y F2 son homólogos a sendos fragmentos del gen *CaPIR1* situados, respectivamente, en 5' y 3' respecto a los extremos de la secuencia codificante del gen *CaPIR1*.

16. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que los fragmentos F1 y F2 son los representados, respectivamente, por SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:6.

17. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, en el que la recombinasa es la flipasa y los elementos de reconocimiento por recombinasa son elementos FRT.

18. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, en el que la secuencia codificante de la flipasa está operativamente unida a un promotor inducible por maltosa que es el promotor MAL2 de *C. albicans* y en el que la etapa c) de inducción de la expresión de la recombinasa se produce añadiendo maltosa al medio de cultivo.

19. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18, en el que la secuencia codificante del gen marcador de selección codifica un gen que confiere resistencia a un antibiótico y en el que la etapa b) de selección de levaduras transformadas con el vector integrativo se lleva a cabo añadiendo dicho antibiótico al medio de cultivo.

20. El método según la reivindicación 19, en el que la secuencia codificante del gen marcador de selección codifica la enzima estreptotricina acetil transferasa (*SAT1*) y la etapa b) de selección de levaduras transformadas con el vector integrativo se lleva a cabo añadiendo al medio de cultivo un antibiótico del grupo de las estreptotricinas.

21. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 20, en el que el promotor constitutivo al que está operativamente unida la secuencia codificante del gen marcador de selección es el de la actina.

22. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 21, en el que el vector integrativo es un plásmido.

23. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 22, que comprende una etapa previa de construcción del vector integrativo.

24. El método según la reivindicación 23, en el que los fragmentos F1 y F2 se amplifican por PCR a partir de ADN genómico de *C. albicans* mediante los pares de

oligonucleótidos de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 para F1 y SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5 para F2.

25. El método según las reivindicaciones 22 y 23, en el que se parte de un plásmido que posee todos los elementos del casete de disrupción salvo los fragmentos F1 y F2 y se realiza la inserción de los mismos en los extremos de dicho casete.

26. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 25, en el que la cepa parental de partida es una cepa silvestre.

27. El método según la reivindicación 26, en el que la cepa parental es SC5314.

28. Un plásmido que comprende un casete que comprende los siguientes elementos:

- 10 i) fragmentos flanqueantes F1 y F2 situados cada uno de ellos en un extremo del casete, en donde los fragmentos F1 y F2 son homólogos a fragmentos del gen *CaPIR1* situados, respectivamente, aguas arriba y aguas abajo con respecto a la región del gen *CaPIR1* que se desea delecionar,
- 15 ii) fragmentos que comprenden que comprenden la secuencia de reconocimiento de una recombinasa contiguos a los fragmentos flanqueantes F1 y F2,
- iii) la secuencia codificante de una recombinasa operativamente unida a un promotor de expresión inducible en *C. albicans*,
- 20 iv) la secuencia codificante de un gen marcador de selección operativamente unido a un promotor de expresión constitutiva en *C. albicans*.

29. Plásmido según la reivindicación 28, que posee un origen de replicación en *E. coli*.

30. Plásmido según la reivindicación 28 ó 29, que posee un gen de resistencia a un antibiótico distinto del gen marcador de selección presente en el casete.

25 31. Plásmido según una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30, en el que: los fragmentos F1 y F2 son los representados por SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:6; los fragmentos de reconocimiento de una recombinasa son fragmentos FRT y la secuencia codificante de una recombinasa codifica la recombinasa flipasa; el promotor de expresión inducible es el promotor MAL2 de *C. albicans*; la secuencia codificante de un gen
30 marcador de selección codifica la estreptotricina acetil transferasa de *C. albicans* (*CaSAT1*) y el promotor de expresión constitutiva en *C. albicans* es el promotor de la actina *ACT1*.

32. Uso de una cepa mutante viva de *C. albicans* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o de una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, para provocar una respuesta inmune protectora contra la candidiasis en un mamífero.

5 33. Uso según la reivindicación 32, en el que se sólo se administra una dosis, previa al desarrollo de candidiasis.

34. Uso según la reivindicación 33, en el que se administra una dosis de refuerzo tras la primera dosis.

10 35. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 34, en el que la cepa mutante o la composición que comprende se administra por vía sistémica.

36. Uso de una cepa mutante viva de *C. albicans* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o de una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, para preparar un medicamento.

15 37. Uso según la reivindicación 36, para preparar una vacuna para la prevención y/o el tratamiento de la candidiasis en un mamífero.

38. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 32 ó 37, en el que la candidiasis es candidiasis diseminada.

39. Uso según la reivindicación 37 ó 38, en el que el mamífero es un ser humano.

40. Uso según la reivindicación 37 ó 38, en el que el mamífero es un ratón.

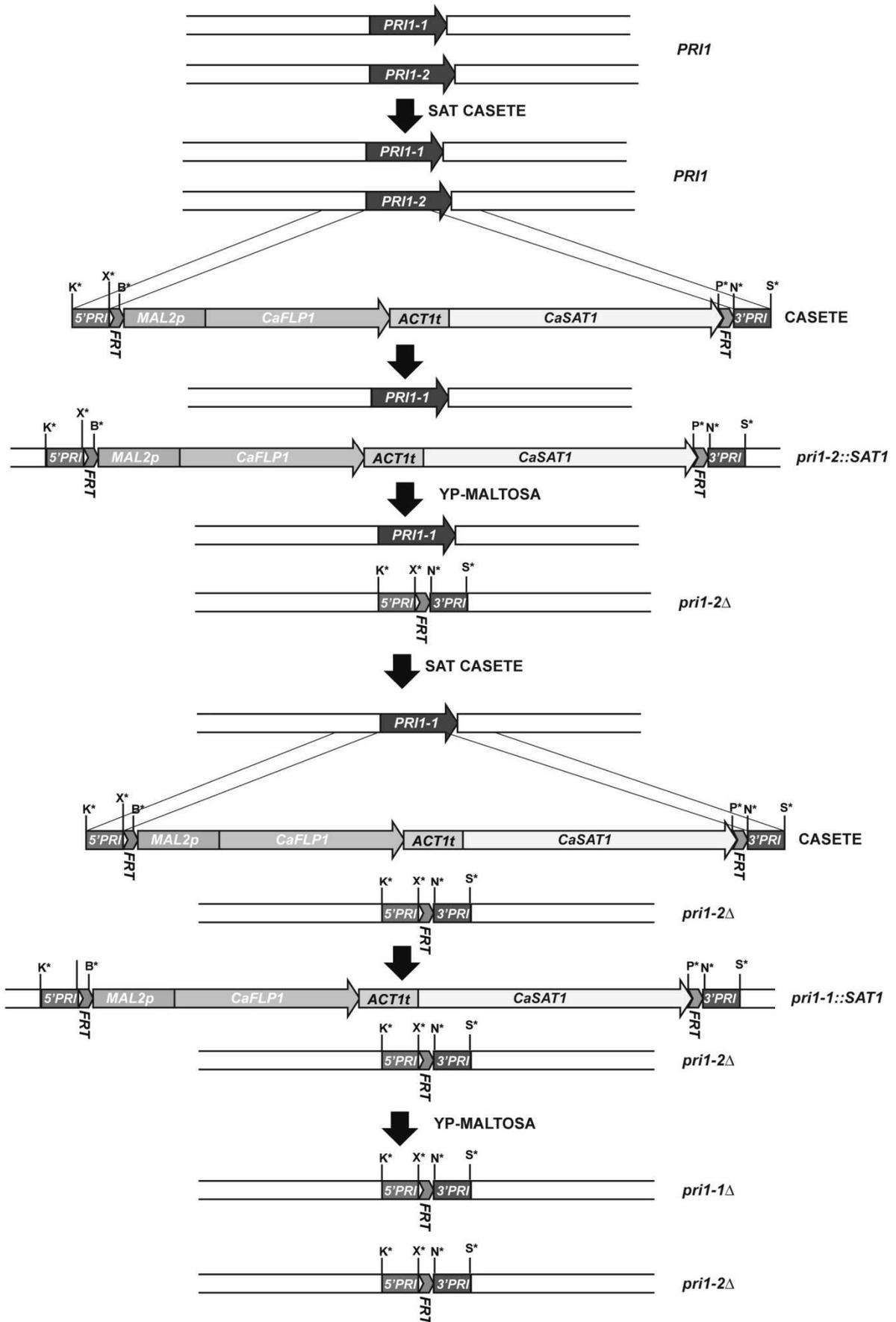


Fig. 2

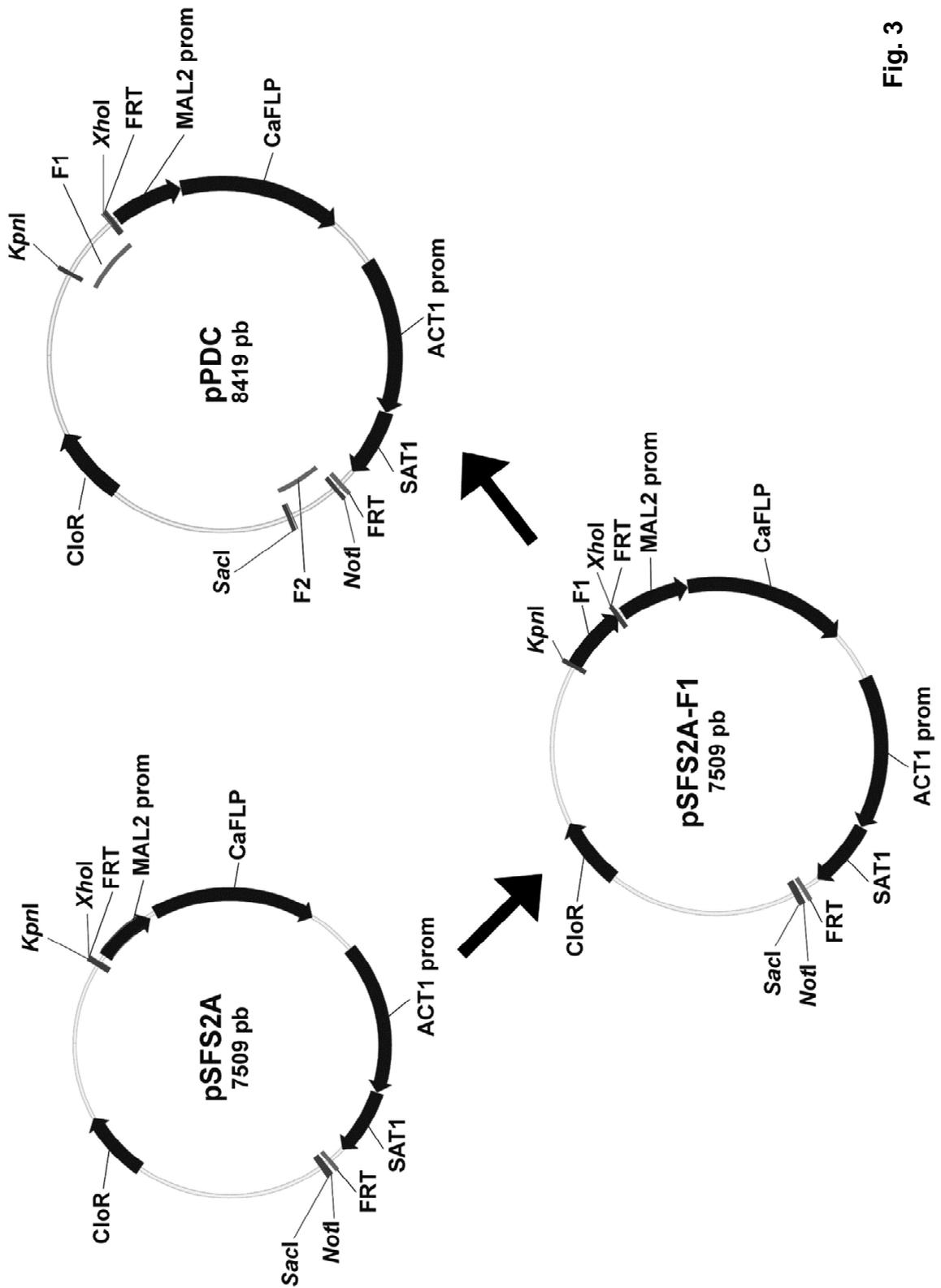


Fig. 3

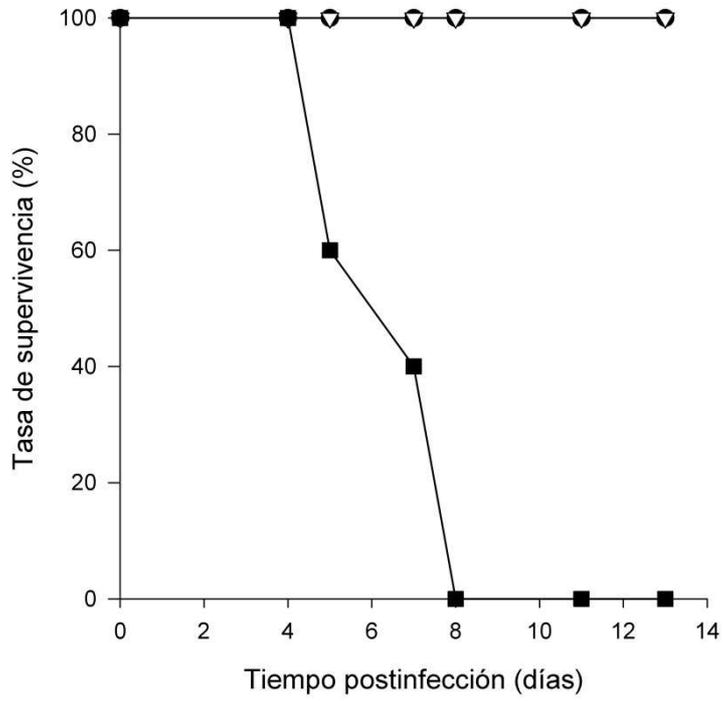


Fig. 4

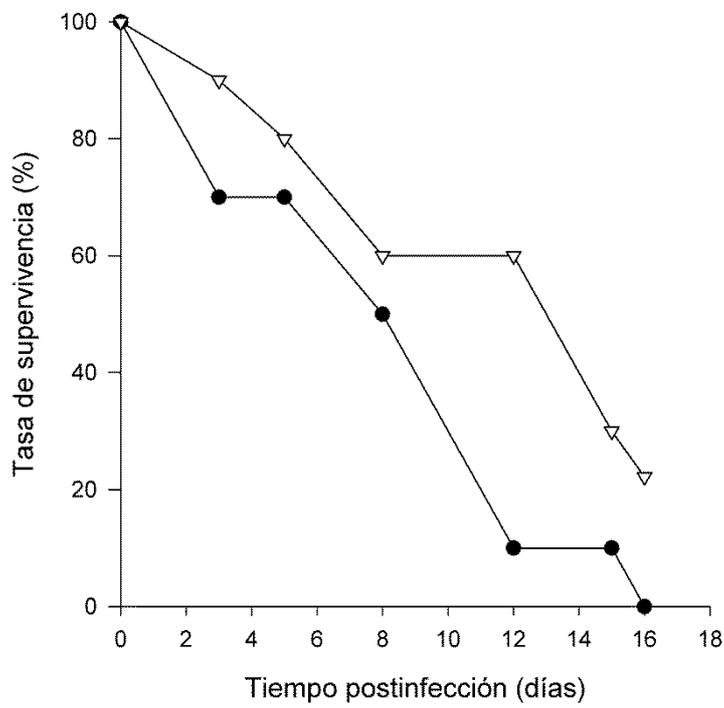


Fig. 5

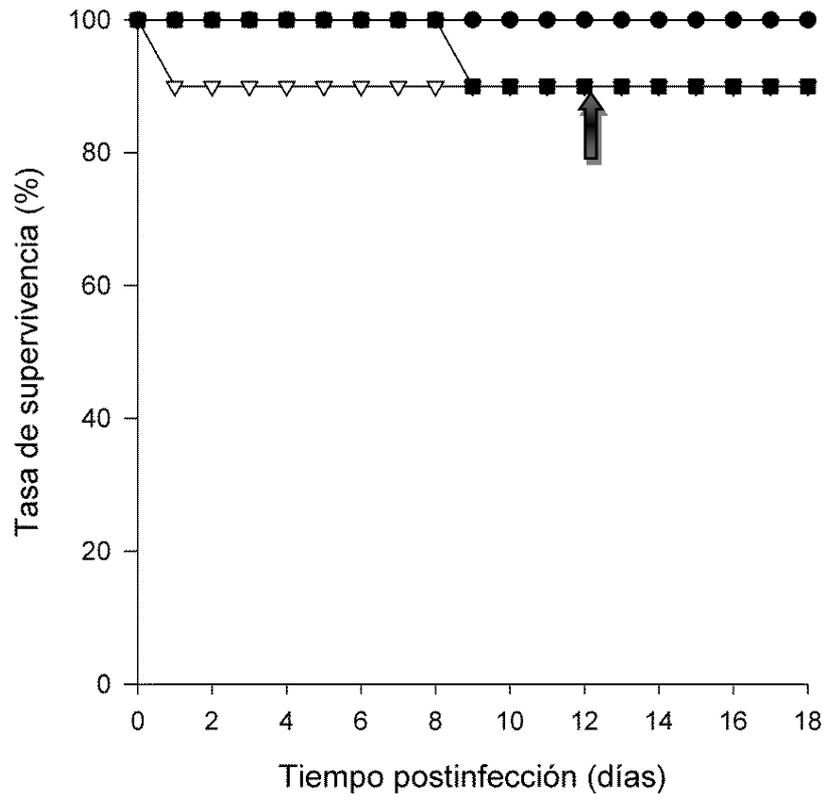


Fig. 6

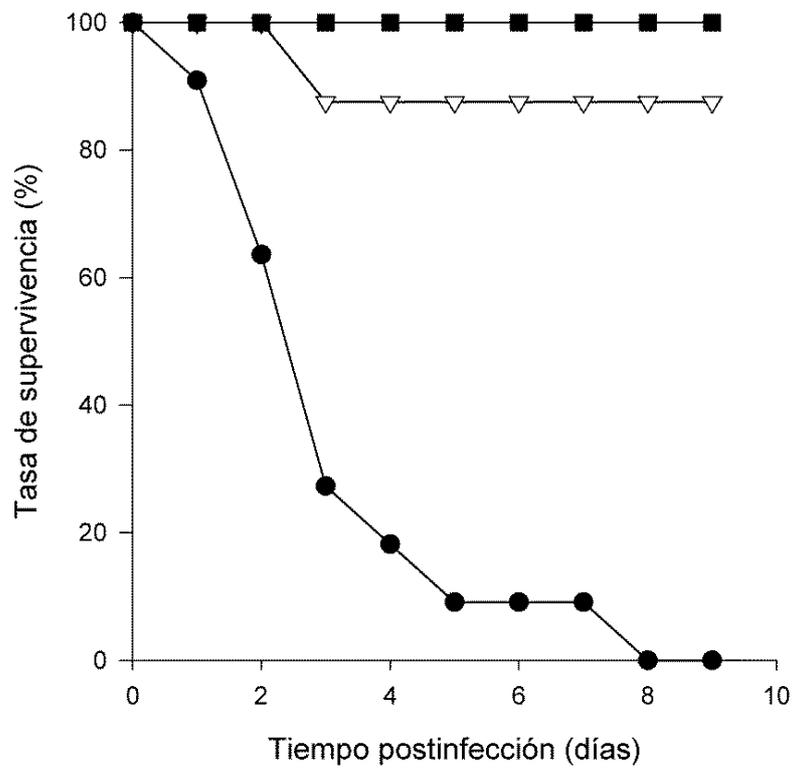


Fig. 7

ES 2 631 877 A1

1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universitat de València
Universidad de Castilla-La Mancha
Universidad de Murcia
Fundación para la Investigación del Hospital Universitario
y Politécnico La Fe

<120> Mutante de Candida albicans y uso en terapia contra candidiasis

<130> P-101426

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 31
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Primer PR11-KpnI

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(10)
<223> Diana KpnI

<220>
<221> source
<222> (11)..(31)
<223> Candida albicans

<400> 1
cacaggtacc ttagtattgt tacttttgta g 31

<210> 2
<211> 33
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Primer PR11-XhoI

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(10)
<223> Diana XhoI

<220>
<221> source
<222> (11)..(33)
<223> Candida albicans

<400> 2
cacactcgag tttggtatca tttctagtca atg 33

ES 2 631 877 A1

2

<210> 3
 <211> 515
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Fragmento F1

<220>
 <221> source
 <222> (1)..(515)
 <223> Candida albicans, fragmento del gen PIR1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (291)..(293)
 <223> ATG iniciador

<400> 3
 ttagtattgt tactttgtta gatttttagca attaaaattt caataacaat actttattta 60
 gaaacaagga ccacaaaatc aggattgaag aattaaagaa aaaaaaaact atttaaatag 120
 aagtaattaa ccttctataa aataattcta ttttttttat tttttatatt ttttttgttt 180
 ttaaaatcaa taatcttttc ttttctttct attatcatta gttccaata cagatctaaa 240
 acaactataa taacatcaac taaaacaacc ataacaataa caattaaatc atgaagtatt 300
 ctacacttgt tagtattgct gcttttatta gcacttcttt agctgctact gttcctgatg 360
 aacattattc aacattatca ccttcagcta aaattccatc tgggtgctagt acagatttca 420
 gtgggtacttt tgggtattcaa gttgttactg ttgaatcagc ttctgctctt tcaactgata 480
 ctgctacttc tacattgact agaaatgata acaaa 515

<210> 4
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Primer PRI-NotI

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(12)
 <223> Diana NotI

<220>
 <221> source
 <222> (13)..(36)
 <223> Candida albicans

<400> 4
 cacagcggcc gctactgctg aaaatggtgc taaagc 36

ES 2 631 877 A1

3

<210> 5
<211> 33
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Primer PRI-SacI

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(10)
<223> Diana SacI

<220>
<221> source
<222> (11)..(33)
<223> Candida albicans

<400> 5
cacagagctc tttaacagtt gacaaattca atg 33

<210> 6
<211> 413
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fragmento F2

<220>
<221> source
<222> (1)..(413)
<223> Candida albicans, fragmento del gen PIR1

<400> 6
tactgctgaa aatggtgcta aagctcaatc tgacgggtcaa gcaattgcaa ctggttctcc 60
atcatccaac tcaactttat ctgatgacga tgacttatct tcaacaattc ctaaagcttg 120
ttcatctgca aacaatttag aatgacatt acatgattct gttttaaag atactcatga 180
acggtggggg gctattgtag ctaatcatca atttcaattc gatggaccaa ttcctcaagc 240
aggaacaatt tatagtgctg gttgggtcaat taaagatgga tatttatatt tgggtgattc 300
taatatcttt tatcaatggt tatcaggaga tttttataat ttatatgatg aaaatggtgc 360
taaacaatgt tcagctgtta aattaagtgt cattgaattt gtcaactggt aaa 413

<210> 7
<211> 3517
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Plásmido pGEM-F1

<220>

ES 2 631 877 A1

4

<221> source
 <222> (53)..(567)
 <223> Candida albicans: fragmento F1

<400> 7

gggcgaattg ggccccgacgt cgcattgctcc cggccgccat ggccgcggga ttttagtatt	60
gttactttgt tagatttttag caattaaaat ttcaataaca atactttatt tagaaacaag	120
gaccacaaaa tcaggattga agaattaaag aaaaaaaaaa ctatttaaag agaagtaatt	180
aaccttctat aaaataattc tatttttttt attttttata tttttttgt ttttaaatc	240
aataatcttt tcttttcttt ctattatcat tagtttccaa tacagatcta aaacaactat	300
aataacatca actaaaacaa ccataacaat aacaattaa tcatgaagta ttctacactt	360
gtagtattg ctgcttttat tagcacttct ttagctgcta ctgttctga tgaacattat	420
tcaacattat caccttcagc taaaattcca tctggtgcta gtacagattt cagtggact	480
tttggattc aagttgttac tgttgaatca gcttctgctc tttcaactga tactgctact	540
tctacattga ctagaaatga taacaaatat cactagtgcg gccgcctgca ggtcgacct	600
atgggagagc tccaacgcg ttggatgcat agcttgagta ttctatagtg tcacctaaat	660
agcttggcgt aatcatggc atagctgtt cctgtgtgaa attgttatcc gtcacaatt	720
ccacacaaca tacgagccg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgagc	780
taactacat taattgcgtt gcgctcactg cccgcttcc agtcgggaaa cctgtcgtgc	840
cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggc gtttgcgtat tgggcgctct	900
tccgcttct cgctcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca	960
gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac	1020
atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt	1080
ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg	1140
cgaaaccgca caggactata aagataccag gcgtttccc ctggaagctc cctcgtgcgc	1200
tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg ctttctccc ttcgggaagc	1260
gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc	1320
aagctgggct gtgtgcacga acccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac	1380
tatcgtcttg agtccaacc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt	1440
aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtgggtggcct	1500
aactacggct aactagaag aacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc	1560
ttcgaaaaaa gagttgtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcggtggt	1620
ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg	1680

ES 2 631 877 A1

5

atcttttcta	cggggtctga	cgctcagtgg	aacgaaaact	cacgttaagg	gattttggtc	1740
atgagattat	caaaaaggat	cttcacctag	atccttttaa	attaataatg	aagttttaaa	1800
tcaatctaaa	gtatatatga	gtaaacttgg	tctgacagtt	accaatgctt	aatcagtgag	1860
gcacctatct	cagcgatctg	tctatttcgt	tcatccatag	ttgcctgact	ccccgtcgtg	1920
tagataacta	cgatacggga	gggcttacca	tctggcccca	gtgctgcaat	gataccgcga	1980
gacccacgct	caccggctcc	agatttatca	gcaataaacc	agccagccgg	aagggccgag	2040
cgcagaagtg	gtcctgcaac	tttatccgcc	tccatccagt	ctattaattg	ttgccgggaa	2100
gctagagtaa	gtagttcgcc	agttaatagt	ttgcgcaacg	ttgttgccat	tgctacaggc	2160
atcgtgggtg	cacgctcgtc	gtttggtatg	gcttcattca	gctccggttc	ccaacgatca	2220
aggcgagtta	catgatcccc	catgttggtc	aaaaaagcgg	ttagctcctt	cggctctccg	2280
atcgttggtc	gaagtaagtt	ggccgcagtg	ttatcactca	tggttatggc	agcactgcat	2340
aattctctta	ctgtcatgcc	atccgtaaga	tgcttttctg	tgactgggtg	gtactcaacc	2400
aagtcaattct	gagaatagtg	tatgcggcga	ccgagttgct	cttgcccggc	gtcaatacgg	2460
gataataaccg	cgccacatag	cagaacttta	aaagtgtctc	tcattggaaa	acgttcttcg	2520
gggcgaaaaac	tctcaaggat	cttaccgctg	ttgagatcca	gttcgatgta	accactcgt	2580
gcacccaact	gatcttcagc	atcttttact	ttcaccagcg	tttctgggtg	agcaaaaaaca	2640
ggaaggcaaaa	atgccgcaaaa	aaaggggaata	agggcgacac	ggaaatgttg	aatactcata	2700
ctcttccttt	ttcaatatta	ttgaagcatt	tatcaggggt	attgtctcat	gagcggatac	2760
atatttgaat	gtatttagaa	aaataaacia	ataggggttc	cgcgcacatt	tccccgaaaa	2820
gtgccacctg	atgcgggtg	aaataaccgca	cagatgcgta	aggagaaaat	accgcatcag	2880
gaaattgtaa	gcgttaatat	tttggttaaaa	ttcgcgttaa	atttttgtta	aatcagctca	2940
ttttttaacc	aataggccga	aatcggcaaaa	atcccctata	aatcaaaaaga	atagaccgag	3000
ataggggtga	gtgttggtcc	agtttggaac	aagagtccac	tattaaagaa	cgtggactcc	3060
aacgtcaaag	ggcgaaaaaac	cgtctatcag	ggcgatggcc	cactacgtga	accatcacc	3120
taatcaagtt	ttttggggtc	gaggtgccgt	aaagcactaa	atcgggaacc	taaagggagc	3180
ccccgattta	gagcttgacg	gggaaagccg	gcgaacgtgg	cgagaaagga	agggaaagaaa	3240
gcgaaaggag	cgggcgctag	ggcgctggca	agtgtagcgg	tcacgctgcy	cgtaaccacc	3300
acacccgccc	cgcttaaatgc	gccgctacag	ggcgcgctcca	ttcgccattc	aggctgcgca	3360
actgttggga	agggcgatcg	gtgcgggcct	cttcgctatt	acgccagctg	gcgaaagggg	3420
gatgtgctgc	aaggcgatta	agttgggtaa	cgccaggggt	ttcccagtc	cgacgttgta	3480

ES 2 631 877 A1

6

aaacgacggc cagtgaattg taatacgact cactata 3517

<210> 8
 <211> 3415
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Plásmido pGEM-F2

<220>
 <221> source
 <222> (53)..(434)
 <223> Candida albicans: fragmento F2

<400> 8

gggcgaattg ggccccgacgt cgcattgctcc cggccgccat ggccgcggga tttactgctg	60
aaaatggttc taaagctcaa tctgacggtc aagcaattgc aactggttct ccatcatcca	120
actcaacttt atctgatgac gatgacttat cttcaacaat tcttaaagct tgttcatctg	180
caaacaattt agaaatgaca ttacatgatt ctgttttaaa agatactcat gaacgttggg	240
gtgctattgt agctaatcat caatttcaat tcgatggacc aattcctcaa gcaggaacaa	300
tttatagtgc tggttggtca attaaagatg gatatttata tttgggtgat tctaatactt	360
tttatcaatg tttatcagga gatttttata atttatatga tgaaaatggt gctaaacaat	420
gttcagctgt taaattaagt gtcattgaat ttgtcaactg ttaaataatca ctagtgcggc	480
cgctgcagg tcgaccatat gggagagctc ccaacgcgct ggatgcatag cttgagtatt	540
ctatagtgtc acctaaatag cttggcgtaa tcatggatcat agctgtttcc tgtgtgaaat	600
tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagt taaagcctgg	660
ggtgcctaag gagtgagcta actcacatta attgctgttc gctcactgcc cgctttccag	720
tcgggaaacc tgctcgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcgg	780
ttgctgattg ggcgctcttc cgcttctctg ctactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg	840
ctgcggcgag cggtatcagc tcaactcaaag gcggtaatac ggttatccac agaatcaggg	900
gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag	960
gccgcggttc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga	1020
cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct	1080
ggaagctccc tcgtgcgctc tctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc	1140
tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg	1200
gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccgttca gcccgaccgc	1260

ES 2 631 877 A1

7

tgcgccttat	ccggtacta	tcgtcttgag	tccaaccg	taagacacga	cttatcgcca	1320
ctggcagcag	ccactggtaa	caggattagc	agagcgaggt	atgtaggcgg	tgctacagag	1380
ttcttgaagt	ggtggcctaa	ctacggctac	actagaagaa	cagtatttgg	tatctgcgct	1440
ctgctgaagc	cagttacctt	cggaaaaaga	gttggtagct	cttgatccgg	caaacaaacc	1500
accgctggta	gcggtggttt	ttttgtttgc	aagcagcaga	ttacgcgcag	aaaaaaagga	1560
tctcaagaag	atcctttgat	cttttctacg	gggtctgacg	ctcagtggaa	cgaaaactca	1620
cgtaagggga	ttttggtcat	gagattatca	aaaaggatct	tcacctagat	ccttttaa	1680
taaaaatgaa	gttttaa	aatctaaagt	atatatgagt	aaacttggtc	tgacagttac	1740
caatgcttaa	tcagtgaggc	acctatctca	gcgatctgtc	tatttcgttc	atccatagtt	1800
gcctgactcc	ccgtcgtgta	gataactacg	atacgggagg	gcttaccatc	tggccccagt	1860
gctgcaatga	taccgcgaga	cccacgctca	ccggctccag	atttatcagc	aataaaccag	1920
ccagccggaa	gggccgagcg	cagaagtgg	cctgcaactt	tatccgctc	catccagtct	1980
attaattggt	gccgggaagc	tagagtaagt	agttcgccag	ttaatagttt	gcgcaacg	2040
gttgccattg	ctacagggcat	cgtggtgtca	cgctcgtcgt	ttggtatggc	ttcattcagc	2100
tccggttccc	aacgatcaag	gcgagttaca	tgatcccca	tgttgtgcaa	aaaagcgg	2160
agtccttcg	gtcctccgat	cgttgtcaga	agtaagttgg	ccgcagtgtt	atcactcatg	2220
gttatggcag	cactgcataa	ttctcttact	gtcatgccat	ccgtaagatg	cttttctgtg	2280
actggtgagt	actcaaccaa	gtcattctga	gaatagtgt	tgccggcacc	gagttgctct	2340
tgccccggcgt	caatacggga	taataccg	ccacatagca	gaactttaa	agtgctcatc	2400
attggaaaac	gttcttcggg	gcgaaaactc	tcaaggatct	taccgctgtt	gagatccagt	2460
tcgatgtaac	ccactcgtgc	acccaactga	tcttcagcat	cttttacttt	caccagcgtt	2520
tctgggtgag	caaaaacag	aaggcaaaat	gccgcaaaa	aggaataag	ggcgacacgg	2580
aaatggtgaa	tactcact	cttcctttt	caatattatt	gaagcattta	tcagggttat	2640
tgtctcatga	gcggatacat	atgtgaatgt	attagaaaa	ataaacaat	aggggttccg	2700
cgcacatttc	cccgaaaagt	gccacctgat	gcggtgtgaa	ataccgcaca	gatgcgtaag	2760
gagaaaatac	cgcatcagga	aattgtaagc	gttaatattt	tgtaaaatt	cgcgtaaat	2820
ttttgttaa	tcagctcatt	ttttaaccaa	taggccgaaa	tcggcaaaat	cccttataaa	2880
tcaaaagaat	agaccgagat	agggttgagt	gttgttccag	tttgaacaa	gagtcacta	2940
ttaaagaacg	tggactccaa	cgtaaaagg	cgaaaaccg	tctatcagg	cgatggcca	3000
ctacgtgaac	catcacccta	atcaagtttt	ttggggtcga	ggtgccgtaa	agcactaa	3060

ES 2 631 877 A1

8

```

cggaaacccta aagggagccc ccgatttaga gcttgacggg gaaagccggc gaacgtggcg      3120
agaaaggaag ggaagaaagc gaaaggagcg ggcgctaggg cgctggcaag tgtagcggtc      3180
acgctgcgcg taaccaccac acccgccgcg cttaatgcgc cgctacaggg cgcgtccatt      3240
cgccattcag gctgcgcaac tgttggggaag ggcgatcggg gcgggcctct tcgctattac      3300
gccagctggc gaaaggggga tgtgctgcaa ggcgattaag ttgggtaacg ccagggtttt      3360
cccagtcacg acgttgtaaa acgacggcca gtgaattgta atacgactca ctata          3415
  
```

```

<210> 9
<211> 8015
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
  
```

```

<220>
<223> Plásmido pSFS2A-F1
  
```

```

<220>
<221> source
<222> (1)..(658)
<223> Plásmido pSFS2A
  
```

```

<220>
<221> source
<222> (659)..(1173)
<223> Candida albicans: fragmento F1
  
```

```

<220>
<221> source
<222> (1174)..(8015)
<223> Plásmido pSFS2A
  
```

```

<400> 9
ctaaattgta agcgttaata ttttgtaaa attcgcgta aatttttggt aaatcagctc      60
attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aatcaaaaag aatagaccga      120
gataggggtg agtgttgttc cagtttgaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc      180
caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca ggcgatggc cactacgtg aaccatcacc      240
ctaatcaagt tttttggggt cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag      300
ccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaaagaa      360
agcgaagga gcggcgctc gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac      420
cacaccgcc gcgcttaatg cgccgctaca ggcgcgtcc cattcgccat tcaggctgcg      480
caactgttgga gaagggcgat cggtgccggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg      540
gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg      600
taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaat tgggtacctt      660
agtattgtta ctttgtaga ttttagcaat taaaatttca ataacaatac tttatttaga      720
  
```

ES 2 631 877 A1

9

aacaaggacc	acaaaatcag	gattgaagaa	ttaaagaaaa	aaaaaactat	ttaaatagaa	780
gtaattaacc	ttctataaaa	taattctatt	ttttttat	tttatat	ttttg	840
aaaatcaata	atcttttctt	ttctttctat	tatcattagt	ttccaataca	gatctaaaac	900
aactataata	acatcaacta	aaacaacat	aacaataaca	attaaatcat	gaagtattct	960
acacttg	gtattgctgc	ttttattagc	acttctttag	ctgctactgt	tcctgatgaa	1020
cattattcaa	cattatcacc	ttcagctaaa	attccatctg	gtgctagtag	agatttcagt	1080
ggactttt	gtattcaagt	tggtactg	gaatcagctt	ctgctctttc	aactgatact	1140
gctacttcta	cattgactag	aaatgataac	aaactcgagg	aagttcctat	actttctaga	1200
gaataggaac	ttcggatcca	ataatgattg	gtttgatatt	tttgtctagt	accatctgta	1260
ccattacact	taaattatct	ttatatctgt	ctaactcgac	tgtctggatt	tcattgatgt	1320
agtcgatgc	atcgtagt	ccaaaaaata	ttgtcatcaa	tttgatattg	gtttccgact	1380
ctaaaat	tggagaatt	tgtctagcgt	gctctgagtt	gtagccactg	aaaccacggt	1440
taataacatc	caattttcg	atatacacat	tctgtaatgc	tggatgaaag	ccatactggg	1500
tacaactaaa	ctgggtgatg	gagtcaccga	acaacacaaa	tttaccgtat	tccatgattg	1560
ctatggttga	gaat	tttttcttgt	cccacgccat	ttttcaaatt	atgcagttga	1620
gaatgtagt	ttttgtgtac	accccgttcg	ctgaatattt	cggaataatt	caaagattgg	1680
ggagtggggg	aggcgataga	cgaagacacg	gtataaaaat	gggcaaaatt	ttccccact	1740
ttttgcagtg	gtttaactaa	taatcgtcga	catgccacaa	tttgatata	tatgtaaaac	1800
accacctaag	gtgcttg	gtcagtttgt	ggaaaggtt	gaaagacctt	caggtgagaa	1860
aatagcatta	tgtgctgctg	aactaaccta	tttatgttgg	atgattacac	ataacggaac	1920
agcaatcaag	agagccacat	tcatgagcta	taatactatc	ataagcaatt	cgttgagttt	1980
cgatattg	aataaatcac	tccagtttaa	atacaagacg	caaaaagcaa	caat	2040
agcctcatta	aagaaattga	ttcctgcttg	ggaatttaca	attattcctt	actatggaca	2100
aaaacatcaa	tctgatatca	ctgatattgt	aagtagttt	caattacagt	tcgaatcatc	2160
ggaagaagca	gataagggaa	atagccacag	taaaaaatg	cttaaagcac	ttctaagtga	2220
gggtgaaagc	atctgggaga	tactgagaa	aatactaaat	tcgtttgagt	atacttcgag	2280
atttaca	acaaaaactt	tataccaatt	cctcttcta	gctactttca	tcaattgtgg	2340
aagattcagc	gatattaaga	acgttgatcc	gaaatcattt	aaattag	aaaataagta	2400
tttgggagta	ataatccagt	gtttagtgac	agagacaaag	acaagcg	gtaggcacat	2460
atacttctt	agcgcaaggg	gtaggatcga	tccacttgta	tatttgatg	aat	2520

ES 2 631 877 A1

10

gaattctgaa	ccagtcctaa	aacgagtaaa	taggaccggc	aattcttcaa	gcaataaaca	2580
ggaataccaa	ttattaaaag	ataacttagt	cagatcgtac	aataaagctt	tgaagaaaaa	2640
tgcgccttat	tcaatctttg	ctataaaaaa	tggcccaaaa	tctcacattg	gaagacattt	2700
gatgacctca	tttctttcaa	tgaagggcct	aacggagttg	actaatgttg	tgggaaattg	2760
gagcgataag	cgtgcttctg	ccgtggccag	gacaacgtat	actcatcaga	taacagcaat	2820
acctgatcac	tacttcgcac	tagtttctcg	gtactatgca	tatgatccaa	tatcaaagga	2880
aatgatagca	ttgaaggatg	agactaatcc	aattgaggag	tggcagcata	tagaacagct	2940
aaagggtagt	gctgaaggaa	gcatacgata	ccccgcatgg	aatgggataa	tatcacagga	3000
ggtactagac	tacctttcat	cctacataaa	tagacgcata	taagagtgaa	attctggaaa	3060
tctggaaatc	tggttttgta	ttcttgttat	tcttcttttt	gttattacat	atataacttg	3120
ttactttttt	aaaaaaaaatct	ttgtatattt	tataaatata	taaaactaaa	tttaagaaaa	3180
agagaaaaat	gttttatttg	agagattgaa	attttacttg	aatttagctt	agcttttata	3240
aagtattatt	atgtaaaaaa	acaaaacaaa	tatacattaa	aaagttaaga	ctataaaata	3300
gccaccaag	gcatttctat	atcttgttgt	tgttgttttc	atcttctgta	tcagaggaac	3360
ttattttatt	attttcgtca	cgggtatttt	ctcttgtttg	atgattcatc	ccattcattc	3420
catcataaaa	tgctcgagcgt	caaaactaga	gaataataaa	gaaaacgatc	ttttcaaaaa	3480
gaaaaaacct	tttagttttc	ctttgttggt	gttggtgggtg	tgtgctattt	atattatata	3540
gtttactcat	aataccataa	aatattcggg	ttgattaggt	tattttaata	agctaatttg	3600
tttctaactg	tgtaatttat	gctgtgtata	ttaagtagtg	tgtgcactgc	ccaaaaatgt	3660
ttgttgttta	tagtcggtta	aagagaaaaa	agaaaaaaag	atccatacac	acacgttaat	3720
tagttgttca	acgtaataca	ctcatatttt	gttcttattt	gctttcggtc	gctgttctca	3780
ccaagattta	ttgccaacga	aacaattttt	ttttatatat	tttcagattt	ttcttttttt	3840
cctttccttt	ccttttctaa	ttttcactcc	tggttttctt	tctttcttag	aaacattatc	3900
tcgatattaa	tattaaaaaa	atataatcat	tcaaaatgga	cggtggtatg	ttttagttta	3960
gcttcaattc	taattgattg	attaatcagt	tgattggttt	caatatgaca	aatgggtagg	4020
gtgggaaaaac	ttcattttca	attcagatca	aacttttttg	ttgtcgacat	aatattttctc	4080
gtttgggatg	ttactgtcac	attaataata	cacacacatc	agcttataat	tttgaaagta	4140
atztatcaga	tatgttggtga	cgatcaatgg	aaatggctaa	cttcaatgta	tctgttcttc	4200
ccctttttca	aagttcacgt	tttttgattg	attgattgat	ctgtcggcag	tggtttcaaa	4260
accattcggg	gagtaatcct	atcaatcaat	gttacgacaa	aaggctcaat	attcaaaatt	4320

ES 2 631 877 A1

11

gcaatgtttt	atgttttcct	acgtgtactt	gtgcaaggca	attgattcaa	cattgctttt	4380
ggtgtttgac	gagtttctag	tttggacttg	tgttgttatc	tggtctatac	agatttcccg	4440
gctcactatg	aatTTTTTTTT	ttcgacgctc	agtgcacaca	actataaaca	acacaaacac	4500
aaacacagca	agaaaaaaaa	aaaacgaaca	ttgaattgaa	accaagccaa	ctgaaaaatt	4560
ccttatttaa	atgactgtca	tactaaccca	tttttataga	agaagttgct	gctttagtta	4620
tcgataacgg	ttctcatatg	aaaatttcgg	tgatccctga	gcaggtggcg	gaaacattgg	4680
atgctgagaa	ccatttcatt	gttcgtgaag	tgttcgatgt	gcacctatcc	gaccaaggct	4740
ttgaactatc	taccagaagt	gtgagcccct	accggaagga	ttacatctcg	gatgatgact	4800
ctgatgaaga	ctctgcttgc	tatggcgcat	tcatcgacca	agagcttgtc	gggaagattg	4860
aactcaactc	aacatggaac	gatctagcct	ctatcgaaca	cattgttgtg	tcgcacacgc	4920
accgaggcaa	aggagtcgcg	cacagtctca	tcgaatttgc	gaaaaagtgg	gcactaagca	4980
gacagctcct	tggtacacga	ttagagacac	aaacgaacaa	tgtacctgcc	tgcaatttgt	5040
acgcaaaatg	tggttttact	ctcggcggca	ttgacctctt	cacgtataaa	actagacctc	5100
aagtctcgaa	cgaaacagcg	atgtactggg	actggttctc	gggagcacag	gatgacgcct	5160
aacatatgtg	aagtgtgaag	ggggagattt	tcactttatt	agatttgtat	atatgtataa	5220
taaataaata	aataagttaa	ataaataatt	agataagggg	ggtaattatt	actatttaca	5280
atcaaagggtg	gtcctgcagg	aagttcctat	actttctaga	gaataggaac	ttcagatcca	5340
ctagttctag	agcggccgcc	accgcggtgg	agctccagct	tttgttccct	ttagtgaggg	5400
ttaattgctc	gcttggcgta	atcatggtca	tagctgtttc	ctgtgtgaaa	ttgttatccg	5460
ctcacaattc	cacacaacat	acgagccgga	agcataaagt	gtaaagcctg	gggtgcctaa	5520
tgagtgagct	aactcacatt	aattgcgttg	cgctcactgc	ccgctttcca	gtcgggaaac	5580
ctgtcgtgcc	agctgcatta	atgaatcggc	caacgcgcgg	ggagaggcgg	tttgcgtatt	5640
gggcgctctt	ccgcttcctc	gctcactgac	tcgctgcgct	cggtcgttcg	gctgcggcga	5700
gcggtatcag	ctcactcaaa	ggcggtaata	cggttatcca	cagaatcagg	ggataacgca	5760
ggaaagaaca	tgtgagcaaa	aggccagcaa	aaggccagga	accgtaaaaa	ggccgcgttg	5820
ctggcgTTTT	tccataggct	ccgccccctt	gacgagcatc	acaaaaatcg	acgctcaagt	5880
cagaggTggc	gaaacccgac	aggactataa	agataccagg	cgtttcccc	tggaagctcc	5940
ctcgtgcgct	ctcctgttcc	gaccctgccg	cttaccggat	acctgtccgc	ctttctccct	6000
tcgggaagcg	tggcgctttc	tcatagctca	cgctgtaggt	atctcagttc	ggtgtaggtc	6060
gttcgctcca	agctgggctg	tgtgcacgaa	cccccgttc	agccccaccg	ctgcgcctta	6120

ES 2 631 877 A1

12

tccggtaact	atcgtcttga	gtccaacccg	gtaagacacg	acttategcc	actggcagca	6180
gccactggta	acaggattag	cagagcgagg	tatgtaggcg	gtgctacaga	gttcttgaag	6240
tgggtggccta	actacggcta	cactagaagg	acagtatttg	gtatctgcgc	tctgctgaag	6300
ccagttacct	tcggaaaaag	agttggtagc	tcttgatccg	gcaaacaaac	caccgctggt	6360
agcggtggtt	tttttgtttg	caagcagcag	attacgcgca	gaaaaaaagg	atctcaagaa	6420
gatcctttga	tcttttctac	ggggtctgac	gctcagtgga	acgaaaactc	acgttaaggg	6480
attttggtca	tgagattatc	aaaaaggatc	ttcacctaga	tccttttcga	ccgaataaat	6540
acctgtgacg	gaagatcact	tcgcagaata	aataaatcct	gggtgccctg	ttgataccgg	6600
gaagccctgg	gccaaactttt	ggcgaaaaatg	agacgttgat	cggcacgtaa	gaggttccaa	6660
ctttcaccat	aatgaaataa	gatcactacc	gggcgtattt	tttgagttgt	cgagattttc	6720
aggagctaag	gaagctaaaa	tggagaaaaa	aatcactgga	tataccaccg	ttgatataatc	6780
ccaatggcat	cgtaaagaac	attttgaggc	atttcagtca	gttgctcaat	gtacctataa	6840
ccagaccggt	cagctggata	ttacggcctt	tttaaagacc	gtaaagaaaa	ataagcaciaa	6900
gttttatccg	gcctttattc	acattcttgc	ccgcctgatg	aatgctcatc	cggaattacg	6960
tatggcaatg	aaagacggtg	agctggtgat	atgggatagt	gttcaccctt	gttacaccgt	7020
tttccatgag	caaaactgaaa	cgttttcatc	gctctggagt	gaataccacg	acgattttccg	7080
gcagtttcta	cacatatatt	cgcaagatgt	ggcgtgttac	ggtgaaaacc	tggcctattt	7140
ccctaaaggg	tttattgaga	atatgttttt	cgtctcagcc	aatccctggg	tgagtttcac	7200
cagttttgat	ttaaactgtg	ccaatatgga	caacttcttc	gccccgttt	tcaccatggg	7260
caaatattat	acgcaaggcg	acaaggtgct	gatgccgctg	gcgattcagg	ttcatcatgc	7320
cgtttgatg	ggcttccatg	tcggcagaat	gcttaatgaa	ttacaacagt	actgcgatga	7380
gtggcagggc	ggggcgtaat	ttttttaagg	cagttattgg	tgcccttaa	cgctggttg	7440
ctacgcctga	ataagtgata	ataagcggat	gaatggcaga	aattcgaaag	caaattcgac	7500
ccggtcgtcg	gttcagggca	gggtcgttaa	atagccgctt	atgtctattg	ctggtttacc	7560
ggtttattga	ctaccggaag	cagtgtgacc	gtgtgcttct	caaatgcctg	aggccagttt	7620
gctcaggctc	tccccgtgga	ggtaataaatt	gacgatatga	tccttttttt	ctgatcaaaa	7680
gtgctcatca	ttggaaaacg	ttcttcgggg	cgaaaactct	caaggatcct	accgctggtg	7740
agatccagtt	cgatgtaacc	cactcgtgca	cccaactgat	cttcagcatc	ttttactttc	7800
accagcgttt	ctgggtgagc	aaaaacagga	aggcaaaatg	ccgcaaaaaa	gggaataagg	7860
gcgacacgga	aatgttgaat	actcatactc	ttcctttttc	aatattattg	aagcatttat	7920

ES 2 631 877 A1

13

```
caagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat      7980
aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccac                                     8015
```

```
<210> 10
<211> 8419
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
```

```
<220>
<223> Plásmido pPDC
```

```
<220>
<221> source
<222> (1)..(658)
<223> Plásmido PSFS2A
```

```
<220>
<221> source
<222> (659)..(1174)
<223> Candida albicans: fragmento F1
```

```
<220>
<221> source
<222> (1175)..(5365)
<223> Plásmido PSFS2A
```

```
<220>
<221> source
<222> (5366)..(7267)
<223> Candida albicans: fragmento F2
```

```
<220>
<221> source
<222> (7268)..(7509)
<223> Plásmido PSFS2A
```

```
<400> 10
ctaaattgta agcgttaata ttttgtaa attcgcgta aattttggtt aatcagctc      60
atTTTTtaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aatcaaaag aatagaccga      120
gatagggttg agtgttgttc cagtttgtaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc      180
caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc      240
ctaatcaagt tttttggggt cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag      300
cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaaactg gcgagaaagg aaggaagaa      360
agcgaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac      420
cacaccgcc gcgcttaatg cgccgtaca gggcgctcc cattcgccat tcaggctgcg      480
caactgttgg gaagggcgat cggttgcggg cctcttcgct attacccag ctggcgaaag      540
ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg taacgccagg gtttccag tcacgacgtt      600
```

ES 2 631 877 A1

14

gtaaaacgac	ggccagtgag	cgcgcgtaat	acgactcact	atagggcgaa	ttgggtacct	660
tagtattggt	actttgtag	attttagcaa	ttaaaatttc	aataacaata	ctttatttag	720
aaacaaggac	cacaaaatca	ggattgaaga	atkaaagaaa	aaaaaaacta	tttaaataga	780
agtaattaac	cttctataaa	ataattctat	tttttttatt	ttttatattt	tttttgtttt	840
taaaatcaat	aatcttttct	tttctttcta	ttatcattag	ttccaatac	agatctaaaa	900
caactataat	aacatcaact	aaaacaacca	taacaataac	aattaaatca	tgaagtattc	960
tacacttggt	agtattgctg	cttttattag	cacttcttta	gctgctactg	ttcctgatga	1020
acattattca	acattatcac	cttcagctaa	aattccatct	ggtgctagta	cagatttcag	1080
tggtactttt	ggtattcaag	ttgttactgt	tgaatcagct	tctgctcttt	caactgatac	1140
tgctacttct	acattgacta	gaaatgataa	caaactcgag	gaagttccta	tactttctag	1200
agaataggaa	cttcggatcc	aataatgatt	ggtttgatat	ttttgtctag	taccatctgt	1260
accattacac	ttaaattatc	tttatatctg	tctaaactcga	ctgtctggat	ttcattgatg	1320
tagtcgtatg	catcgtagt	tccaaaaaat	attgtcatca	atttgatatt	ggtttccgac	1380
tctaaaattt	ttggaagaat	ttgtctagcg	tgctctgagt	tgtagccact	gaaaccacgg	1440
ttaataacat	ccaattttcg	gatatacaca	ttctgtaatg	ctggatgaaa	gccatactgg	1500
gtacaactaa	actgggtgat	ggagtcaccg	aacaacacaa	atttaccgta	ttccatgatt	1560
gctatgggtg	agaatttttt	ttttttcttg	tcccacgcca	tttttcaaat	tatgcagttg	1620
agaatgtag	tttttgtag	caccccggtc	gctgaatatt	tcggaataat	tcaaagattg	1680
gggagtgggg	gaggcgatag	acgaagacac	ggtataaaaa	tgggcaaaat	tttccccaac	1740
tttttgtagt	ggtttaacta	ataatcgctg	acatgccaca	atttgatata	ttatgtaaaa	1800
caccacctaa	ggtgcttggt	cgtcagtttg	tggaaagggt	tgaagacct	tcaggtgaga	1860
aaatagcatt	atgtgctgct	gaactaacct	atttatgttg	gatgattaca	cataacggaa	1920
cagcaatcaa	gagagccaca	ttcatgagct	ataaactat	cataagcaat	tcgttgagtt	1980
tcgatattgt	caataaatca	ctccagttta	aatacaagac	gcaaaaagca	acaattttgg	2040
aagcctcatt	aaagaaattg	attcctgctt	gggaatttac	aattattcct	tactatggac	2100
aaaaacatca	atctgatatc	actgatattg	taagtagttt	gcaattacag	ttcgaatcat	2160
cggaagaagc	agataaggga	aatagccaca	gtaaaaaaat	gcttaaagca	cttctaagtg	2220
agggtgaaaag	catctgggag	atcactgaga	aaataactaaa	ttcgtttgag	tatacttcga	2280
gatttcaaaa	aacaaaaact	ttataccaat	tcctcttcct	agctactttc	atcaattgtg	2340
gaagattcag	cgatattaag	aacgttgatc	cgaaatcatt	taaattagtc	caaaataagt	2400

ES 2 631 877 A1

15

atttgggagt	aataatccag	tgttttagtga	cagagacaaa	gacaagcggt	agtaggcaca	2460
tatacttctt	tagcgcaagg	ggtaggatcg	atccacttgt	atatttggat	gaatttttga	2520
ggaattctga	accagtccta	aaacgagtaa	ataggaccgg	caattcttca	agcaataaac	2580
aggaatacca	attattaata	gataacttag	tcagatcgta	caataaagct	ttgaagaaaa	2640
atgcgcctta	ttcaatcttt	gctataaaaa	atggcccaaa	atctcacatt	ggaagacatt	2700
tgatgacctc	atttctttca	atgaagggcc	taacggagtt	gactaatggt	gtgggaaatt	2760
ggagcgataa	gcgtgcttct	gccgtggcca	ggacaacgta	tactcatcag	ataacagcaa	2820
tacctgatca	ctacttcgca	ctagtttctc	ggtactatgc	atatgatcca	atatcaaagg	2880
aatgatagc	attgaaggat	gagactaatc	caattgagga	gtggcagcat	atagaacagc	2940
taaagggtag	tgctgaagga	agcatacgat	accccgcatg	gaatgggata	atatcacagg	3000
aggtactaga	ctacctttca	tcctacataa	atagacgcat	ataagagtga	aattctggaa	3060
atctggaaat	ctggttttgt	attcttggtta	ttcttctttt	tgttattaca	tatataactt	3120
gttacttttt	taaaaaaatc	tttgtatatt	ttataaatat	ataaaaactaa	atttaagaaa	3180
aagagaaaaa	tgttttattt	gagagattga	aattttactt	gaatttagct	tagcttttat	3240
aaagtattat	tatgtaaaaa	aacaaaacaa	atatacatta	aaaagttaag	actataaaat	3300
agccacccaa	ggcattttcta	tatcttggtg	ttgttgtttt	catcttctgt	atcagaggaa	3360
cttattttat	tattttcgtc	acgggtattt	tctcttggtt	gatgattcat	cccattcatt	3420
ccatcataaa	atgtcgagcg	tcaaaaactag	agaataataa	agaaaacgat	cttttcaaaa	3480
agaaaaaacc	ttttagtttt	cctttggttg	tgttgtgggt	gtgtgctatt	tatattatat	3540
agtttactca	taataccata	aaatattcgg	tttgattagg	ttattttaat	aagctaattt	3600
gtttctaatac	gtgtaattta	tgctgtgtat	attaagtagt	gtgtgactg	cccaaaaatg	3660
tttgttggtt	atagtcggtt	aaagagaaaa	aagaaaaaaa	gatccataca	cacacgttaa	3720
ttagttgttc	aacgtaatac	actcatattt	tgttcttatt	tgctttcggg	cgctgttctc	3780
accaagatth	attgccaacg	aaacaatttt	tttttatata	ttttcagatt	tttctttttt	3840
tcctttcctt	tccttttcta	attttcactc	ctggttttct	ttctttctta	gaaacattat	3900
ctcgatatta	atattaataa	aatataatca	ttcaaaatgg	acggtggtat	gttttagttt	3960
agcttcaatt	ctaattgatt	gattaatcag	ttgattggtt	tcaatatgac	aatgggtag	4020
ggtagggaaaa	cttcattttc	aattcagatc	aaactttttt	gttgctgaca	taatatttct	4080
cgtttgggat	gttactgtca	cattaataat	acacacacat	cagcttataa	ttttgaaagt	4140
aatttatcag	atatgttggtg	acgatcaatg	gaaatggcta	acttcaatgt	atctgttctt	4200

ES 2 631 877 A1

16

ccccTTTTc	aaagttcacg	TTTTTTgatt	gattgattga	tctgtcggca	gtggTTTcaa	4260
aaccattcgg	tgagtaatcc	tatcaatcaa	tgttacgaca	aaaggctcaa	tattcaaaat	4320
tgcaatgTTT	tatgTTTTcc	tacgtgtact	tgtgcaaggc	aattgattca	acattgctTT	4380
tggtgTTTga	cgagTTTcta	gTTTggactt	gtgTTgttat	ctgggctata	cagatttccc	4440
ggctcactat	gaatTTTTTT	tttcgacgct	cagtgcacac	aactataaac	aacacaaaca	4500
caaacacagc	aagaaaaaaaa	aaaaacgaac	attgaattga	aaccaagcca	actgaaaaat	4560
tccttattta	aatgactgtc	atactaacc	atTTTTatag	aagaagttgc	tgctttagtt	4620
atcgataacg	gttctcatat	gaaaatttctg	gtgatccctg	agcagggtggc	ggaaacattg	4680
gatgctgaga	accatttcat	tgTtcgtgaa	gtgTtcgatg	tgcacctatc	cgaccaaggc	4740
tttgaactat	ctaccagaag	tgtgagcccc	taccggaagg	attacatctc	ggatgatgac	4800
tctgatgaag	actctgcttg	ctatggcgca	ttcatcgacc	aagagcttgt	cgggaagatt	4860
gaactcaact	caacatggaa	cgatctagcc	tctatcgaac	acattgTTgt	gtcgcacacg	4920
caccgaggca	aaggagtcgc	gcacagtctc	atcgaatttg	cgaaaaagtg	ggcactaagc	4980
agacagctcc	ttggcatacg	attagagaca	caaacgaaca	atgtacctgc	ctgcaatttg	5040
tacgcaaaat	gtggctttac	tctcggcggc	attgacctct	tcacgtataa	aactagacct	5100
caagtctcga	acgaaacagc	gatgtactgg	tactggTtct	cgggagcaca	ggatgacgcc	5160
taacatatgt	gaagtgtgaa	gggggagatt	ttcactttat	tagatttgta	tatatgtata	5220
ataaataaat	aaataagtta	aataaataat	tagataaggg	tggttaattat	tactatttac	5280
aatcaaaggt	ggtcctgcag	gaagttccta	tactttctag	agaataggaa	cttcagatcc	5340
actagtTcta	gagcggccgc	tactgctgaa	aatgTtgcta	aagctcaatc	tgacggTcaa	5400
gcaattgcaa	ctggTtctcc	atcatccaac	tcaactttat	ctgatgacga	tgacttatct	5460
tcaacaattc	ctaaagcttg	ttcatctgca	aacaatttag	aaatgacatt	acatgattct	5520
gTTTTaaaag	atactcatga	acgtTggggT	gctattgtag	ctaatcatca	atttcaattc	5580
gatggaccaa	ttcctcaagc	aggaacaatt	tatagtgctg	gttggTcaat	taaagatgga	5640
tatttatatt	tgggtgattc	taatattctt	tatcaatgTt	tatcaggaga	TTTTtataat	5700
ttatatgatg	aaaatgTtgc	taaacaatgt	tcagctgtta	aattaagtgt	cattgaattt	5760
gtcaactgTt	aaagagctcc	agctTTTTgt	ccctttagtg	agggttaatt	gcgcgcttgg	5820
cgtaatcatg	gtcatagctg	tttctgtgt	gaaattgtta	tccgctcaca	attccacaca	5880
acatacgagc	cggaagcata	aagtgtaaag	cctggggTgc	ctaatgagtg	agctaactca	5940
cattaattgc	gttgcgctca	ctgcccgtt	tccagtcggg	aaacctgtcg	tgccagctgc	6000

ES 2 631 877 A1

17

attaatgaat	cggccaacgc	gcggggagag	gcggtttgcg	tattggg'gcg	tcttccgctt	6060
cctcgctcac	tgactcgctg	cgctcggctg	ttcggctgcg	gcgagcggta	tcagctcact	6120
caaaggcggg	aatacggtta	tccacagaat	caggggataa	cgcaggaaag	aacatgtgag	6180
caaaaggcca	gcaaaaaggcc	aggaaccgta	aaaaggccgc	gttgctggcg	tttttcata	6240
ggctccgccc	ccctgacgag	catcacaaaa	atcgacgctc	aagtcaagg	tggcgaaacc	6300
cgacaggact	ataaagatac	caggcgtttc	cccctggaag	ctccctcgtg	cgctctcctg	6360
ttccgaccct	gccgcttacc	ggatacctgt	ccgcctttct	cccttcggga	agcgtggcgc	6420
tttctcatag	ctcacgctgt	aggtatctca	gttcgggtgta	ggtcgttcgc	tccaagctgg	6480
gctgtgtgca	cgaaccccc	gttcagcccg	accgctgcg	cttatccggg	aactatcgtc	6540
ttgagtccaa	cccggtaaga	cacgacttat	cgccactggc	agcagccact	ggtaacagga	6600
ttagcagagc	gaggtatgta	ggcggtgcta	cagagtctct	gaagtggg	cctaactacg	6660
gctacactag	aaggacagta	tttggtatct	gcgctctgct	gaagccagtt	accttcggaa	6720
aaagagttgg	tagctcttga	tccggcaaac	aaaccaccgc	tggtagcggg	ggttttttg	6780
tttgcaagca	gcagattacg	cgcagaaaaa	aaggatctca	agaagatcct	ttgatctttt	6840
ctacggggtc	tgacgctcag	tggaacgaaa	actcacgtta	agggattttg	gtcatgagat	6900
tatcaaaaag	gatcttcacc	tagatccttt	tcgaccgaat	aaatacctgt	gacggaagat	6960
cacttcgcag	aataaataaa	tcttgggtgc	cctgttgata	ccgggaagcc	ctgggccaac	7020
ttttggcgaa	aatgagacgt	tgatcggcac	gtaagagggt	ccaactttca	ccataatgaa	7080
ataagatcac	taccgggcgt	atTTTTTgag	ttgtcgagat	tttcaggagc	taaggaagct	7140
aaaatggaga	aaaaaatcac	tggatatacc	accgttgata	tatcccaatg	gcatcgtaaa	7200
gaacattttg	aggcatttca	gtcagttgct	caatgtacct	ataaccagac	cgttcagctg	7260
gatattacgg	cctttttaa	gaccgtaaag	aaaaataagc	acaagtttta	tccggccttt	7320
attcacattc	ttgcccgcct	gatgaatgct	catccggaat	tacgtatggc	aatgaaagac	7380
ggtgagctgg	tgatatggga	tagtgttcac	ccttgttaca	ccgttttcca	tgagcaaaact	7440
gaaacgtttt	catcgctctg	gagtgaatac	cacgacgatt	tccggcagtt	tctacacata	7500
tattcgcaag	atgtggcgtg	ttacggtgaa	aacctggcct	atttcctaa	agggtttatt	7560
gagaatatgt	ttttcgtctc	agccaatccc	tgggtgagtt	tcaccagttt	tgatttaaac	7620
gtggccaata	tggacaactt	cttcgcccc	gttttcacca	tgggcaaata	ttatacgcaa	7680
ggcgacaagg	tgctgatgcc	gctggcgatt	caggttcac	atgccgtttg	tgatggcttc	7740
catgtcggca	gaatgcttaa	tgaattacaa	cagtactgcg	atgagtggca	gggccccgcg	7800

ES 2 631 877 A1

18

```

taattttttt aaggcagtta ttggtgccct taaacgcctg gttgctacgc ctgaataagt      7860
gataataagc ggatgaatgg cagaaattcg aaagcaaatt cgacccggtc gtcggttcag      7920
ggcagggctc ttaaatagcc gcttatgtct attgctgggt taccggttta ttgactaccg      7980
gaagcagtgt gaccgtgtgc ttctcaaatg cctgaggcca gtttgctcag gctctccccg      8040
tggaggtaat aattgacgat atgatccttt ttttctgatc aaaagtgctc atcattggaa      8100
aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt      8160
aaccactcgc tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt      8220
gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaaggggat aagggcgaca cggaaatggt      8280
gaatactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcaaggg ttattgtctc      8340
atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac aataggggt tccgcgcaca      8400
tttccccgaa aagtgccac                                                    8419

```

```

<210> 11
<211> 5126
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> Fragmento F3: casete integrativo

```

```

<220>
<221> Misc_feature
<222> (1)..(6)
<223> Diana KpnI

```

```

<220>
<221> Misc_feature
<222> (1)..(5126)
<223> Fragmento F3: casete de disrupción flanqueado por las dianas KpnI
      y SacI

```

```

<220>
<221> Misc_feature
<222> (7)..(522)
<223> Fragmento F1 de Candida albicans

```

```

<220>
<221> Misc_feature
<222> (527)..(561)
<223> Secuencia FRT

```

```

<220>
<221> Promoter
<222> (566)..(1113)
<223> Promotor Mal2p del gen MAL2 de Candida albicans

```

```

<220>
<221> gene
<222> (1120)..(2391)

```

ES 2 631 877 A1

19

```

<223> Gen FLP de Candida albicans, CaFLP

<220>
<221> CDS
<222> (1120)..(2391)
<223> Gen FLP de Candida albicans, CaFLP

<220>
<221> promoter
<222> (2785)..(3283)
<223> Promotor del gen ACT1 de Candida albicans

<220>
<221> gene
<222> (3284)..(4507)
<223> Gen SAT1

<220>
<221> exon
<222> (3284)..(3293)
<223> CDS gen SAT1, partel

<220>
<221> exon
<222> (3948)..(4507)
<223> CDS gen SAT1, parte2

<220>
<221> Misc_feature
<222> (4648)..(4681)
<223> Secuencia FRT

<220>
<221> Misc_feature
<222> (4707)..(5120)
<223> Fragmento F2 de Candida albicans

<220>
<221> Misc_feature
<222> (5121)..(5126)
<223> Diana SacI

<400> 11
ggtaccttag tattgttact ttgttagatt ttagcaatta aaatttcaat aacaatactt      60
tatttagaaa caaggaccac aaaatcagga ttgaagaatt aaagaaaaaa aaaactatTT      120
aatagaagt aattaacctt ctataaaaata attctatTTT ttttattTTT tatattTTT      180
ttgtTTTtaa aatcaataat cttttctTTT ctttctatta tcattagTTT ccaatacaga      240
tctaaaacaa ctataataac atcaactaaa acaaccataa caataacaat taaatcatga      300
agtattctac acttgtagt attgctgctt ttattagcac ttcttagct gctactgTTC      360
ctgatgaaca ttattcaaca ttatcacctt cagctaaaat tccatctggt gctagtacag      420
atTtcagtgg tactTTTggt attcaagTtg ttactgTtga atcagcttct gctctTTTcaa      480
ctgatactgc tacttctaca ttgactagaa atgataacaa actcgaggaa gTtcctatac      540

```

ES 2 631 877 A1

20

tttctagaga ataggaactt cggatccaat aatgattggt ttgatatttt tgtctagtac	600
catctgtacc attacactta aattatcttt atatctgtct aactcgactg tctggatttc	660
attgatgtag tcgtagtcat cgtagttcc aaaaaatatt gtcatcaatt tgatattggt	720
ttccgactct aaaatTTTTg gaagaatttg tctagcgtgc tctgagttgt agccactgaa	780
accacgggta ataacatcca attttcggat atacacattc tgtaatgctg gatgaaagcc	840
atactgggta caactaaact gggatgatgga gtcaccgaac aacacaaatt taccgtattc	900
catgattgct atggttgaga atTTTTTTTT tttcttgtcc cacgccattt ttcaaattat	960
gcagttgaga atgtagttt ttgtgtacac cccgttcgct gaatatttcg gaataattca	1020
aagattgggg agtgggggag gcgatagacg aagacacggt ataaaaatgg gcaaaatTTT	1080
ccccaacttt ttgcagtggg ttaactaata atcgtcgcac atg cca caa ttt gat	1134
	Met Pro Gln Phe Asp
	1 5
ata tta tgt aaa aca cca cct aag gtg ctt gtt cgt cag ttt gtg gaa	1182
Ile Leu Cys Lys Thr Pro Pro Lys Val Leu Val Arg Gln Phe Val Glu	
	10 15 20
agg ttt gaa aga cct tca ggt gag aaa ata gca tta tgt gct gct gaa	1230
Arg Phe Glu Arg Pro Ser Gly Glu Lys Ile Ala Leu Cys Ala Ala Glu	
	25 30 35
cta acc tat tta tgt tgg atg att aca cat aac gga aca gca atc aag	1278
Leu Thr Tyr Leu Cys Trp Met Ile Thr His Asn Gly Thr Ala Ile Lys	
	40 45 50
aga gcc aca ttc atg agc tat aat act atc ata agc aat tcg ttg agt	1326
Arg Ala Thr Phe Met Ser Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Asn Ser Leu Ser	
	55 60 65
ttc gat att gtc aat aaa tca ctc cag ttt aaa tac aag acg caa aaa	1374
Phe Asp Ile Val Asn Lys Ser Leu Gln Phe Lys Tyr Lys Thr Gln Lys	
	70 75 80 85
gca aca att ttg gaa gcc tca tta aag aaa ttg att cct gct tgg gaa	1422
Ala Thr Ile Leu Glu Ala Ser Leu Lys Lys Leu Ile Pro Ala Trp Glu	
	90 95 100
ttt aca att att cct tac tat gga caa aaa cat caa tct gat atc act	1470
Phe Thr Ile Ile Pro Tyr Tyr Gly Gln Lys His Gln Ser Asp Ile Thr	
	105 110 115
gat att gta agt agt ttg caa tta cag ttc gaa tca tcg gaa gaa gca	1518
Asp Ile Val Ser Ser Leu Gln Leu Gln Phe Glu Ser Ser Glu Glu Ala	
	120 125 130
gat aag gga aat agc cac agt aaa aaa atg ctt aaa gca ctt cta agt	1566
Asp Lys Gly Asn Ser His Ser Lys Lys Met Leu Lys Ala Leu Leu Ser	
	135 140 145
gag ggt gaa agc atc tgg gag atc act gag aaa ata cta aat tcg ttt	1614

ES 2 631 877 A1

									21								
Glu	Gly	Glu	Ser	Ile	Trp	Glu	Ile	Thr	Glu	Lys	Ile	Leu	Asn	Ser	Phe		
150					155					160					165		
gag	tat	act	tcg	aga	ttt	aca	aaa	aca	aaa	act	tta	tac	caa	ttc	ctc		1662
Glu	Tyr	Thr	Ser	Arg	Phe	Thr	Lys	Thr	Lys	Thr	Leu	Tyr	Gln	Phe	Leu		
				170					175					180			
ttc	cta	gct	act	ttc	atc	aat	tgt	gga	aga	ttc	agc	gat	att	aag	aac		1710
Phe	Leu	Ala	Thr	Phe	Ile	Asn	Cys	Gly	Arg	Phe	Ser	Asp	Ile	Lys	Asn		
			185					190					195				
gtt	gat	ccg	aaa	tca	ttt	aaa	tta	gtc	caa	aat	aag	tat	ttg	gga	gta		1758
Val	Asp	Pro	Lys	Ser	Phe	Lys	Leu	Val	Gln	Asn	Lys	Tyr	Leu	Gly	Val		
		200					205					210					
ata	atc	cag	tgt	tta	gtg	aca	gag	aca	aag	aca	agc	gtt	agt	agg	cac		1806
Ile	Ile	Gln	Cys	Leu	Val	Thr	Glu	Thr	Lys	Thr	Ser	Val	Ser	Arg	His		
	215					220					225						
ata	tac	ttc	ttt	agc	gca	agg	ggt	agg	atc	gat	cca	ctt	gta	tat	ttg		1854
Ile	Tyr	Phe	Phe	Ser	Ala	Arg	Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Leu	Val	Tyr	Leu		
230					235					240					245		
gat	gaa	ttt	ttg	agg	aat	tct	gaa	cca	gtc	cta	aaa	cga	gta	aat	agg		1902
Asp	Glu	Phe	Leu	Arg	Asn	Ser	Glu	Pro	Val	Leu	Lys	Arg	Val	Asn	Arg		
				250					255					260			
acc	ggc	aat	tct	tca	agc	aat	aaa	cag	gaa	tac	caa	tta	tta	aaa	gat		1950
Thr	Gly	Asn	Ser	Ser	Ser	Asn	Lys	Gln	Glu	Tyr	Gln	Leu	Leu	Lys	Asp		
		265						270					275				
aac	tta	gtc	aga	tcg	tac	aat	aaa	gct	ttg	aag	aaa	aat	gcg	cct	tat		1998
Asn	Leu	Val	Arg	Ser	Tyr	Asn	Lys	Ala	Leu	Lys	Lys	Asn	Ala	Pro	Tyr		
	280						285					290					
tca	atc	ttt	gct	ata	aaa	aat	ggc	cca	aaa	tct	cac	att	gga	aga	cat		2046
Ser	Ile	Phe	Ala	Ile	Lys	Asn	Gly	Pro	Lys	Ser	His	Ile	Gly	Arg	His		
	295					300					305						
ttg	atg	acc	tca	ttt	ctt	tca	atg	aag	ggc	cta	acg	gag	ttg	act	aat		2094
Leu	Met	Thr	Ser	Phe	Leu	Ser	Met	Lys	Gly	Leu	Thr	Glu	Leu	Thr	Asn		
310					315					320					325		
gtt	gtg	gga	aat	tgg	agc	gat	aag	cgt	gct	tct	gcc	gtg	gcc	agg	aca		2142
Val	Val	Gly	Asn	Trp	Ser	Asp	Lys	Arg	Ala	Ser	Ala	Val	Ala	Arg	Thr		
				330					335					340			
acg	tat	act	cat	cag	ata	aca	gca	ata	cct	gat	cac	tac	ttc	gca	cta		2190
Thr	Tyr	Thr	His	Gln	Ile	Thr	Ala	Ile	Pro	Asp	His	Tyr	Phe	Ala	Leu		
			345					350					355				
gtt	tct	cgg	tac	tat	gca	tat	gat	cca	ata	tca	aag	gaa	atg	ata	gca		2238
Val	Ser	Arg	Tyr	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Pro	Ile	Ser	Lys	Glu	Met	Ile	Ala		
		360					365					370					
ttg	aag	gat	gag	act	aat	cca	att	gag	gag	tgg	cag	cat	ata	gaa	cag		2286
Leu	Lys	Asp	Glu	Thr	Asn	Pro	Ile	Glu	Glu	Trp	Gln	His	Ile	Glu	Gln		
	375					380					385						
cta	aag	ggt	agt	gct	gaa	gga	agc	ata	cga	tac	ccc	gca	tgg	aat	ggg		2334

ES 2 631 877 A1

22

Leu	Lys	Gly	Ser	Ala	Glu	Gly	Ser	Ile	Arg	Tyr	Pro	Ala	Trp	Asn	Gly	
390					395					400					405	

ata ata tca cag gag gta cta gac tac ctt tca tcc tac ata aat aga 2382
Ile Ile Ser Gln Glu Val Leu Asp Tyr Leu Ser Ser Tyr Ile Asn Arg
410 415 420

cgc ata taa gagtgaaatt ctggaaatct ggaaatctgg ttttgtattc 2431
Arg Ile

ttgttattct tctttttggtt attacatata taacttgta cttttttaa aaaatctttg 2491

tatattttat aaatatataa aactaaattt aagaaaaaga gaaaaatggtt ttatttgaga 2551

gattgaaatt ttacttgaat ttagcttagc ttttataaag tattattatg taaaaaaca 2611

aaacaaatat acattaaaaa gttaagacta taaaatagcc acccaaggca tttctatatac 2671

ttgttgttgt tgttttcatc ttctgtatca gaggaactta ttttattatt ttcgtcacgg 2731

gtattttctc ttgtttgatg attcatccca ttcattccat cataaaatgt cgagcgtcaa 2791

aactagagaa taataaagaa aacgatcttt tcaaaaagaa aaaacctttt agttttcctt 2851

tgttgttggt gtgggtgtgt gctatttata ttatatagtt tactcataat accataaaat 2911

attcggtttg attaggttat ttttaataagc taatttgttt ctaatcgtgt aatttatgct 2971

gtgtatatta agtagtgtgt gactgcccc aaaatgtttg ttgtttatag tcggttaaag 3031

agaaaaaga aaaaaagatc catacacaca cgtaattag ttgttcaacg taatacactc 3091

atattttggt cttatttgct ttcggtcgct gttctacca agatttattg ccaacgaaac 3151

aatttttttt tatataatttt cagatttttc tttttttcct ttcctttcct tttctaattt 3211

tcactcctgg ttttctttct ttcttagaaa cattatctcg atattaatat taaaaaata 3271

taatcattca aa atg gac ggt g gtatgtttta gtttagcttc aattctaatt 3323
Met Asp Gly
425

gattgattaa tcagttgatt ggtttcaata tgacaaatgg gtaggggtggg aaaacttcat 3383

tttcaattca gatcaaaactt ttttgttgtc gacataatat ttctcgtttg ggatgttact 3443

gtcacattaa taatacacac acatcagctt ataattttga aagtaattta tcagatatgt 3503

tgtgacgatac aatggaaatg gctaacttca atgtatctgt tcttcccctt tttcaaagtt 3563

cacgtttttt gattgattga ttgatctgtc ggcagtgggt tcaaaacat tcggtgagta 3623

atcctatcaa tcaatgttac gacaaaaggc tcaatattca aaattgcaat gttttatggt 3683

ttcctacgtg tacttggtgca aggcaattga ttcaacattg cttttggtgt ttgacgagtt 3743

tctagtttg acttggtgtt ttatctgggc tatacagatt tcccggctca ctatgaattt 3803

tttttttoga cgctcagtg acacaactat aaacaacaca aacacaaaca cagcaagaaa 3863

ES 2 631 877 A1

23

aaaaaaaaac gaacattgaa ttgaaaccaa gccaaactgaa aaattcctta tttaaattgac	3923
tgtcatacta acccattttt atag aa gaa gtt gct gct tta gtt atc gat Glu Glu Val Ala Ala Leu Val Ile Asp 430 435	3973
aac ggt tct cat atg aaa att tcg gtg atc cct gag cag gtg gcg gaa Asn Gly Ser His Met Lys Ile Ser Val Ile Pro Glu Gln Val Ala Glu 440 445 450	4021
aca ttg gat gct gag aac cat ttc att gtt cgt gaa gtg ttc gat gtg Thr Leu Asp Ala Glu Asn His Phe Ile Val Arg Glu Val Phe Asp Val 455 460 465	4069
cac cta tcc gac caa ggc ttt gaa cta tct acc aga agt gtg agc ccc His Leu Ser Asp Gln Gly Phe Glu Leu Ser Thr Arg Ser Val Ser Pro 470 475 480	4117
tac cgg aag gat tac atc tcg gat gat gac tct gat gaa gac tct gct Tyr Arg Lys Asp Tyr Ile Ser Asp Asp Asp Ser Asp Glu Asp Ser Ala 485 490 495	4165
tgc tat ggc gca ttc atc gac caa gag ctt gtc ggg aag att gaa ctc Cys Tyr Gly Ala Phe Ile Asp Gln Glu Leu Val Gly Lys Ile Glu Leu 500 505 510 515	4213
aac tca aca tgg aac gat cta gcc tct atc gaa cac att gtt gtg tcg Asn Ser Thr Trp Asn Asp Leu Ala Ser Ile Glu His Ile Val Val Ser 520 525 530	4261
cac acg cac cga ggc aaa gga gtc gcg cac agt ctc atc gaa ttt gcg His Thr His Arg Gly Lys Gly Val Ala His Ser Leu Ile Glu Phe Ala 535 540 545	4309
aaa aag tgg gca cta agc aga cag ctc ctt ggc ata cga tta gag aca Lys Lys Trp Ala Leu Ser Arg Gln Leu Leu Gly Ile Arg Leu Glu Thr 550 555 560	4357
caa acg aac aat gta cct gcc tgc aat ttg tac gca aaa tgt ggc ttt Gln Thr Asn Asn Val Pro Ala Cys Asn Leu Tyr Ala Lys Cys Gly Phe 565 570 575	4405
act ctc ggc ggc att gac ctc ttc acg tat aaa act aga cct caa gtc Thr Leu Gly Gly Ile Asp Leu Phe Thr Tyr Lys Thr Arg Pro Gln Val 580 585 590 595	4453
tcg aac gaa aca gcg atg tac tgg tac tgg ttc tcg gga gca cag gat Ser Asn Glu Thr Ala Met Tyr Trp Tyr Trp Phe Ser Gly Ala Gln Asp 600 605 610	4501
gac gcc taacatatgt gaagtgtgaa gggggagatt ttcactttat tagatttgta Asp Ala	4557
tatatgtata ataaataaat aaataagtta aataaataat tagataaggg tggttaattat	4617
tactattttac aatcaaagggt ggtcctgcag gaagttccta tacttttctag agaataggaa	4677
cttcagatcc actagttcta gagcggccgc tactgctgaa aatgttgcta aagctcaatc	4737

ES 2 631 877 A1

24

tgacgggtcaa gcaattgcaa ctggttctcc atcatccaac tcaactttat ctgatgacga 4797
 tgacttatct tcaacaattc ctaaagcttg ttcatctgca aacaatttag aatgacatt 4857
 acatgattct gttttaaaag atactcatga acgttggggg gctattgtag ctaatcatca 4917
 atttcaattc gatggaccaa ttcctcaagc aggaacaatt tatagtgctg gttgggtcaat 4977
 taaagatgga tattttatatt tgggtgattc taatatcttt tatcaatggt tatcaggaga 5037
 tttttataat ttatatgatg aaaatggtgc taaacaatgt tcagctgtta aattaagtgt 5097
 cattgaatth gtcaactggt aaagagctc 5126

<210> 12
 <211> 423
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 12

Met Pro Gln Phe Asp Ile Leu Cys Lys Thr Pro Pro Lys Val Leu Val
 1 5 10 15

Arg Gln Phe Val Glu Arg Phe Glu Arg Pro Ser Gly Glu Lys Ile Ala
 20 25 30

Leu Cys Ala Ala Glu Leu Thr Tyr Leu Cys Trp Met Ile Thr His Asn
 35 40 45

Gly Thr Ala Ile Lys Arg Ala Thr Phe Met Ser Tyr Asn Thr Ile Ile
 50 55 60

Ser Asn Ser Leu Ser Phe Asp Ile Val Asn Lys Ser Leu Gln Phe Lys
 65 70 75 80

Tyr Lys Thr Gln Lys Ala Thr Ile Leu Glu Ala Ser Leu Lys Lys Leu
 85 90 95

Ile Pro Ala Trp Glu Phe Thr Ile Ile Pro Tyr Tyr Gly Gln Lys His
 100 105 110

Gln Ser Asp Ile Thr Asp Ile Val Ser Ser Leu Gln Leu Gln Phe Glu
 115 120 125

Ser Ser Glu Glu Ala Asp Lys Gly Asn Ser His Ser Lys Lys Met Leu
 130 135 140

ES 2 631 877 A1

25

Lys Ala Leu Leu Ser Glu Gly Glu Ser Ile Trp Glu Ile Thr Glu Lys
145 150 155 160

Ile Leu Asn Ser Phe Glu Tyr Thr Ser Arg Phe Thr Lys Thr Lys Thr
165 170 175

Leu Tyr Gln Phe Leu Phe Leu Ala Thr Phe Ile Asn Cys Gly Arg Phe
180 185 190

Ser Asp Ile Lys Asn Val Asp Pro Lys Ser Phe Lys Leu Val Gln Asn
195 200 205

Lys Tyr Leu Gly Val Ile Ile Gln Cys Leu Val Thr Glu Thr Lys Thr
210 215 220

Ser Val Ser Arg His Ile Tyr Phe Phe Ser Ala Arg Gly Arg Ile Asp
225 230 235 240

Pro Leu Val Tyr Leu Asp Glu Phe Leu Arg Asn Ser Glu Pro Val Leu
245 250 255

Lys Arg Val Asn Arg Thr Gly Asn Ser Ser Ser Asn Lys Gln Glu Tyr
260 265 270

Gln Leu Leu Lys Asp Asn Leu Val Arg Ser Tyr Asn Lys Ala Leu Lys
275 280 285

Lys Asn Ala Pro Tyr Ser Ile Phe Ala Ile Lys Asn Gly Pro Lys Ser
290 295 300

His Ile Gly Arg His Leu Met Thr Ser Phe Leu Ser Met Lys Gly Leu
305 310 315 320

Thr Glu Leu Thr Asn Val Val Gly Asn Trp Ser Asp Lys Arg Ala Ser
325 330 335

Ala Val Ala Arg Thr Thr Tyr Thr His Gln Ile Thr Ala Ile Pro Asp
340 345 350

His Tyr Phe Ala Leu Val Ser Arg Tyr Tyr Ala Tyr Asp Pro Ile Ser
355 360 365

Lys Glu Met Ile Ala Leu Lys Asp Glu Thr Asn Pro Ile Glu Glu Trp
370 375 380

ES 2 631 877 A1

26

Gln His Ile Glu Gln Leu Lys Gly Ser Ala Glu Gly Ser Ile Arg Tyr
385 390 395 400

Pro Ala Trp Asn Gly Ile Ile Ser Gln Glu Val Leu Asp Tyr Leu Ser
405 410 415

Ser Tyr Ile Asn Arg Arg Ile
420



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201630250

②② Fecha de presentación de la solicitud: 03.03.2016

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N1/15** (2006.01)
A61K39/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MARTÍNEZ, A.I. et al., 'Role of Pir1 in the construction of the Candida albicans cell wall', MICROBIOLOGY, 2004, Vol. 150, No. Pt 10, Páginas 3151-3161, ISSN: 1350-0872, todo el documento.	1-40
A	BAHNAN, W. et al., 'Deletion of the Candida albicans PIR32 results in increased virulence, stress response, and upregulation of cell wall chitin deposition', MYCOPATHOLOGIA, 2012, Vol. 174, No. 2, Páginas 107-119, ISSN: 0301-486X(print), ISSN: 1573-0832(electronic), doi: 10.1007/s11046-012-9533-z, todo el documento.	1-40
A	KAPTEYN, J.C. et al., 'The cell wall architecture of Candida albicans wild-type cells and cell wall-defective mutants', MOLECULAR MICROBIOLOGY, 2000, Vol. 35, No. 3, Páginas 601-611, ISSN: 0950-382X, todo el documento.	1-40
A	US 7241613 B1 (OSCIENT PHARMACEUTICALS CORP.) 10-07-2007, Todo el documento.	1-40
A	FONZI, W.A. et al., 'Isogenic strain construction and gene mapping in Candida albicans', GENETICS, 1993, Vol. 134, No. 3, Páginas 717-728, ISSN: 0016-6731 (print), todo el documento.	1-40

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
28.09.2016

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EMBL-EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.09.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-40	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-40	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Martínez, A.I. et al., <i>Microbiology</i> , (2004), <u>150</u> (Pt 10): 3151-61.	2004
D02	Bahnan, W. et al., <i>Mycopathologia</i> , (2012), <u>174</u> (2):107-19.	2012
D03	Kapteyn, J.C. et al., <i>Mol. Microbiol.</i> , (2000), <u>35</u> (3): 601-11.	2000
D04	US 7241613 B1 (OSCIENT PHARMACEUTICALS CORP.)	10.07.2007
D05	Fonzi, W.A. et al., <i>Genetics</i> , (1993), <u>134</u> (3): 717-28.	1993

En D01 se describen mutantes *PIR1* de *Candida albicans* y un procedimiento de obtención de dichos mutantes.

En D02 se describen la obtención de una cepa mutante *PIR32* de *Candida albicans*.

En D03-D04 se divulgan mutantes de *Candida albicans* con la pared celular afectada.

En D05 se describe un procedimiento de obtención de mutantes en *Candida albicans*.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

1.1 Reivindicaciones independientes 1, 12 y 28.

1.1.1. El objeto de las reivindicaciones independientes 1 y 12 consiste respectivamente en una cepa mutante de *Candida albicans* que carece de copias funcionales del gen *PIR1* (*CaPIR1*) y en un procedimiento de obtención de dicha cepa mutante. En particular, la cepa mutante reivindicada se obtiene a partir de una cepa de *C. albicans* distinta de la cepa CAI4 (reivindicación 2). La reivindicación 28 trata de un plásmido que comprende un *cassete* de disrupción caracterizado por los siguientes elementos: 1) unos fragmentos F1 y F2, situado cada uno de ellos en un extremo del *cassete*, homólogos a las secuencias F1 y F2 de *CaPIR1* situadas aguas arriba y aguas debajo del fragmento del gen *CaPIR1* que se desea eliminar, 2) un fragmento que comprende secuencias de reconocimiento de una recombinasa, contiguo a F1 y F2, 3) una secuencia codificante de una recombinasa unida operativamente a un promotor inducible en *C. albicans*, y 4) una secuencia codificante de un gen marcador unida operativamente a un promotor de expresión constitutiva en *C. albicans*.

En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D01-D05, se han caracterizado diferentes mutantes de *C. albicans* con la estructura molecular de la pared celular afectada. En particular, se ha descrito la obtención de mutantes heterocigotos *pir1/PIR1* de la cepa CAI4 de *C. albicans* y los mutantes homocigotos del locus *PIR32*, perteneciente a la familia de proteínas PIR de la pared celular, en la estirpe RM1000 de *C. albicans*. Sin embargo, los correspondientes mutantes homocigotos *PIR1/PIR1* que carecerían de copias funcionales del gen, no han podido ser aislados ni caracterizados en las estirpes mencionadas de *C. albicans* (cf. D01: Métodos, Resultados. D02: Materiales y Métodos, Resultados). Por otro lado, en el estado de la técnica no se ha divulgado ni un procedimiento de obtención de cepas mutantes de *C. albicans* ni un plásmido con un *cassete* de disrupción que compartan las características técnicas del procedimiento y del plásmido reivindicados en la solicitud. Además, tanto la cepa mutante de *C. albicans* como el procedimiento de obtención de dicha cepa y el plásmido con el *cassete* de disrupción reivindicados no se deducen de una manera obvia combinando la información descrita previamente en este campo de la técnica.

Por consiguiente, el objeto de las reivindicaciones independientes 1, 12 y 28, y el de las dependientes 2-11, 13-27, 29-40 se considera nuevo e inventivo sobre la base de los documentos D01-D05.

1.2. La presente solicitud satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-40 es nuevo y tiene actividad inventiva de acuerdo con los Arts. 6.1. y 8.1. de la Ley de Patentes.