



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ N.º de publicación: **ES 2 078 159**

⑫ Número de solicitud: 9302164

⑬ Int. Cl.⁶: C07K 14/40

G01N 33/68

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **14.10.93**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.95**

Fecha de concesión: **01.08.96**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
26.07.96

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **16.09.96**

⑱ Fecha de publicación del folleto de patente:
16.09.96

⑲ Titular/es: **Universidad del País Vasco/
Euskal Herriko Unibertsitatea
Campus de Leioa
48940 Leioa, Vizcaya, ES
Universita Degli Studi di Parma**

⑳ Inventor/es: **Pontón San Emeterio, José;
Hernando, Fernando Luis;
Polonelli, Luciano y
Conti, Stefania**

㉑ Agente: **Carpintero López, Francisco**

㉒ Título: **Antígenos manoproteicos de choque térmico de Candida albicans y su empleo en el diagnóstico de la candidiasis.**

㉓ Resumen:

Antígenos manoproteicos de choque térmico de Candida albicans y su empleo en el diagnóstico de la candidiasis.

Se han identificado y caracterizado antígenos manoproteicos que se expresan en la pared celular de las fases levaduriforme y micelial de Candida albicans durante la infección por Candida albicans o durante su cultivo in vitro a 37 °C, pero no durante su cultivo in vitro a 25 °C. Estos antígenos son manoproteínas de pesos moleculares de 180-200 kDa, 130-150 kDa, 90-110 kDa y 60-70 kDa, pueden reaccionar con la sIgA presente en las secreciones orales y vaginales de pacientes con candidiasis oral y vaginal, respectivamente, y reaccionan con la IgA presente en el suero de pacientes con diversos tipos de candidiasis. Estos antígenos pueden ser utilizados para el diagnóstico de las candidiasis.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 078 159 B1

DESCRIPCION

Antígenos manoproteicos de choque térmico de *Candida albicans* y su empleo en el diagnóstico de la candidiasis

Campo de la invención

Esta invención se refiere a la identificación y caracterización de antígenos de naturaleza manoproteica expresados por las fases levaduriforme y micelial de *Candida albicans* sometida a diversos estímulos ambientales que pueden aplicarse al diagnóstico de las candidiasis y a la protección frente a las infecciones producidas por este hongo.

Antecedentes de la invención

En los últimos años se viene observando un incremento en la incidencia y mortalidad provocadas por las infecciones producidas por los miembros del género *Candida*. Estas infecciones son fundamentalmente de dos tipos: superficiales, que afectan a la piel y las mucosas, y profundas, en las que pueden verse afectados una gran cantidad de tejidos y órganos. Las candidiasis afectan fundamentalmente a pacientes que presentan un compromiso en los mecanismos defensivos inmunológicos, como los que presentan enfermedades hematológicas malignas, los que han sido sometidos a cirugía abdominal, tratamientos con fármacos citostáticos inmunosupresores o corticoides y aquellos que tienen el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) [MEUNIER, REW. INFECT. DIS. 2 (1987) págs. 408-416].

Los miembros del género *Candida* asociados a infecciones graves en el ser humano son: *Candida albicans* serotipo A, *Candida albicans* serotipo B, *Candida albicans* variedad *stellatoidea*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida kefyr* (*Candida pseudotropicalis*) y *Candida* (*Torulopsis*) *glabrata*. De todos ellos, el más importante es *Candida albicans*, que se considera un patógeno oportunista ya que puede encontrarse en el tracto digestivo del 10-50% de las personas sanas. Si se produce un descenso en los mecanismos defensivos inmunológicos, estos microorganismos pueden proliferar de forma importante, invadir los tejidos y pasar al torrente circulatorio, diseminándose por todo el cuerpo humano. En estos casos, un diagnóstico precoz y un tratamiento antifúngico apropiado son de vital importancia.

Las candidiasis superficiales más importantes son las que afectan a las cavidades oral y vaginal. En esas localizaciones *Candida albicans* puede encontrarse como comensal formando parte de la denominada flora normal del cuerpo humano y por tanto el crecimiento del hongo se encuentra controlado por los mecanismos defensivos del huésped. Entre los diferentes mecanismos de control que existen en las mucosas oral y vaginal destaca, por su importancia, la inmunoglobulina A secretora (slgA) que juega un papel importante inhibiendo la adhesión del hongo a la superficie de las células epiteliales de estas cavidades. Sin embargo, cuando existen algunas condiciones que alteran el equilibrio entre el hongo y los mecanismos defensivos puede producirse un sobrecrecimiento del hongo que da lugar a manifestaciones clínicas y hace necesario la instauración de un tratamiento antifúngico apropiado. En este sen-

tido, se ha puesto de manifiesto que los paciente con SIDA presenta un déficit de slgA en la saliva, lo que se ha relacionado con la mayor frecuencia de infecciones orales que presentan estos pacientes [MULLER et al., CLIN. EXP. IMMUNOL., 83 (1991) págs. 203-209].

El diagnóstico de la candidiasis se basa fundamentalmente en la observación clínica del paciente, el cultivo del microorganismo a partir de la sangre o los tejidos (biopsias) y su demostración en los tejidos invadidos. Sin embargo, el éxito de este diagnóstico depende del tipo de candidiasis. Mientras que en las candidiasis superficiales no suelen presentarse problemas en la mayoría de los casos, el diagnóstico precoz de las infecciones profundas, que permitiría realizar un tratamiento eficaz, es extremadamente difícil en muchos enfermos. ya que el cultivo de este hongo a partir de muestras sanguíneas es negativo en más del 60% de los pacientes y sólo suele ser posible la confirmación diagnóstica post-mortem, mediante necropsia [HOPWOOD Y WARNOCK, EUR. J. CLIN. MICROBIOL., 5 (1986) págs. 379-388].

Estos problemas han potenciado la búsqueda de marcadores tempranos de la infección por *Candida albicans*. Entre ellos se encuentran la capacidad para producir largos filamentos denominados micelios, la producción de ciertas enzimas o la capacidad para producir cambios fenotípicos que pueden permitir al hongo invadir diversos tejidos, expresar nuevos antígenos o hacerse resistente a los fármacos antifúngicos. Recientemente, se ha demostrado que *Candida albicans* se encuentra recubierta de slgA en las mucosas de los pacientes con infección oral o vaginal mientras que cuando el microorganismo se encuentra en estas localizaciones como comensal no está recubierto por la slgA. Estos datos indican que cuando *Candida albicans* pasa de comensal a patógeno, es decir se ha roto el equilibrio entre los mecanismos defensivos del ser humano y la multiplicación excesiva del hongo, se produce una expresión de nuevos antígenos, o un aumento en su expresión, que son reconocidos por la slgA [POLONELLI et al MYCOPATHOLOGIA., 116 (1991) págs. 105-112].

El diagnóstico serológico de las infecciones producidas por *Candida* se basa en el estudio de una muestra sérica del paciente con el objeto de detectar la presencia de componentes del microorganismo (denominados antígenos) o de la respuesta humoral del paciente que se produce frente a esos antígenos (denominados anticuerpos). Sin embargo, a pesar de que se han utilizado prácticamente todas las técnicas desarrolladas, tanto para la detección de antígenos como de los anticuerpos que se producen contra ellos durante la infección candidiásica, no existe una técnica serológica de utilización general en la mayoría de los laboratorios [JONES, CLIN. MICROBIO. REV. 3(1990) págs. 32-45].

Existen varios antígenos de *Candida* potencialmente útiles en el diagnóstico serológico. Sin embargo, básicamente son tres los antígenos que se pueden detectar mediante técnicas comerciales: (i) el manano, (ii) un antígeno citoplásmico de 48.000 daltons y (iii) un antígeno de naturaleza desconocida.

En cuanto a la detección de anticuerpos,

cuando se han realizado estudios con diferentes antígenos del hongo, incluyendo tanto pacientes hospitalizados con y sin candidiasis como controles sanos, la mayoría de las técnicas han mostrado una especificidad variable y ha sido prácticamente imposible determinar un título de anticuerpos que sea indicativo de la infección invasiva por *Candida albicans*.

Varios estudios han mostrado que la administración intraperitoneal o intravenosa de *Candida albicans* vivas o muertas producía cierto grado de protección en animales de laboratorio frente a la inoculación intravenosa posterior con células vivas. Efectos similares se han logrado vacunando a los animales con ribosomas y extractos de la pared celular del hongo. Sin embargo, algunos estudios no han observado tales efectos [ODDS, "Candida and Candidosis" 1988, Bailliere Tindall, págs. 274-275]. En el ser humano se ha utilizado una vacunación intravaginal con una mezcla de antígenos secretados por *Candida albicans* durante su crecimiento, demostrándose la producción de una respuesta IgA contra los antígenos utilizados [WALDMAN et al J. IMMUNOL., 109 (1972) págs. 662-664].

Los trabajos realizados en el campo de la candidiasis han demostrado claramente la necesidad de identificar nuevas moléculas de *Candida albicans* que permitan entender las sutiles modificaciones que ocurren en el equilibrio entre los mecanismos defensivos del ser humano y la multiplicación del hongo y que conducen al desarrollo de la enfermedad, así como el desarrollo de pruebas que permitan el diagnóstico precoz de estas infecciones y su utilización como vacunas que logren la protección frente a la candidiasis.

Descripción detallada de la invención

La presente invención tiene por objeto la identificación y caracterización de antígenos de *Candida albicans* de naturaleza manoproteica que reaccionan con la sIgA.

De acuerdo con la invención, los antígenos identificados se caracterizan por ser manoproteínas que se expresan durante la infección por *Candida albicans* o durante el cultivo *in vitro* del hongo a 37°C pero no durante el cultivo *in vitro* a 25 °C.

De acuerdo con la invención, los antígenos identificados se caracterizan por presentar pesos moleculares de 180-200 kDa, 130-150 kDa, 90-110 kDa y 60-70 kDa.

De acuerdo con la invención, los antígenos identificados se caracterizan por reaccionar con la sIgA presente en las secreciones orales y vaginales de pacientes con candidiasis superficial y con la IgA presente en el suero de pacientes con candidiasis superficial.

De acuerdo con la invención los antígenos identificados no están relacionados con las proteínas de choque térmico convencionales. En general, las proteínas de choque térmico son aquellas proteínas que se expresan a temperatura elevada, por ejemplo a 37°C, pero no a baja temperatura, por ejemplo a 25°C. En este sentido, los antígenos proporcionados por esta invención, presentan una comportamiento similar pues se expresan a 37°C pero no se expresan a 25°C. Sin embargo, a diferencia de las proteínas convenciona-

les de *Candida albicans*, que bioquímicamente son proteínas, los antígenos de esta invención son manoproteínas, es decir, son proteínas unidas a restos de manosa y, por tanto, son diferentes de las proteínas convencionales. El hecho de ser manoproteínas es lo que, precisamente, distingue a los antígenos de esta invención de otros antígenos y proteínas conocidos de *Candida albicans*. CRAIG et al, en MICROBIOLOGICAL REVIEWS, 57, (1993), págs. 402-414. incluyen una relación de tales proteínas convencionales de choque térmico.

El método descrito se comprenderá mejor con la ayuda de los siguientes ejemplos. Se entiende que los ejemplos se presentan únicamente a título de ilustración de la invención descrita y no constituyen una limitación de ésta.

Ejemplos

Ejemplo 1.

Obtención de los antígenos.

Candida albicans en fase levaduriforme se obtuvo por cultivo del microorganismo en placas de agar glucosado de Sabouraud incubadas a 25°C durante 24-48 h. A continuación, los microorganismos en fase levaduriforme fueron recogidos de la placa de cultivo lavando su superficie con solución salina tamponada (PBS) y posteriormente se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min., siendo lavados tres veces de la misma forma. Las levaduras lavadas fueron inoculadas a la concentración de 2×10^7 levaduras/ml en medio de líquido de LEE [SABOURAUDIA, 13 (1975) págs. 148-153] e incubadas a 25 ó 37°C durante 30 min.

Los microorganismos así obtenidos se utilizaron para la preparación de portaobjetos de inmunofluorescencia o para la extracción de los antígenos.

a) Preparación de portaobjetos para inmunofluorescencia

Las levaduras cultivadas en el medio de LEE (citado anteriormente) fueron lavadas con PBS frío como se ha descrito anteriormente y suspendidas en PBS a la concentración de 1×10^6 levaduras/ml. Diez microlitros de esta suspensión se colocaron en cada uno de los pocillos de portaobjetos para inmunofluorescencia, permitiendo que se secasen a temperatura ambiente para lograr su fijación.

b) Marcaje de los antígenos con metionina ^{35}S

Las células de *Candida albicans* en fase levaduriforme fueron cultivadas a 25 ó 37°C en un medio de LEE sin metionina al que se le había añadido metionina marcada con ^{35}S (300.000 cpm), según la técnica descrita por MARMIROLI y LODI [CUR. GEN, 8(1984) págs. 429-437].

c) Extracción de los antígenos

Las levaduras cultivadas en el medio de LEE (citado anteriormente) fueron lavadas con PBS frío como se ha descrito anteriormente y a continuación fueron extraídas según la técnica descrita por YAFFE y SCHATZ [PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 81(1984) págs. 429-437].

Un volumen que contenía 4×10^6 células se incubó con 0,5 ml de NaOH 1,85 M que contenía 2 β -mercaptoetanol al 5%. La solución fue agitada y se mantuvo 15 minutos en baño de hielo. A continuación, se añadió un volumen idéntico de ácido tricloroacético 0,5 M y se incubó en las mismas condiciones durante otros 15 minutos. La suspensión fue centrifugada y el sedimento se lavó tres veces con tampón TRIS 1 M pH 11 y se resuspendió en 0,1 ml de tampón de tratamiento para electroforesis en gel de poliacrilamida, hirviéndose durante 5 minutos. Tras una nueva centrifugación a 10.000 rpm, el sobrenadante se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida.

Ejemplo 2.

Expresión de los antígenos en células de *Candida albicans* cultivadas *in vitro*.

La expresión de los antígenos de naturaleza manoproteica en células de *Candida albicans* cultivadas *in vitro* se estudió mediante una prueba de inmunofluorescencia indirecta utilizando portaobjetos preparados según el ejemplo anterior incubados con diferentes muestras clínicas de pacientes con IgA anti-*Candida albicans*. Para ello, 20 μ l de los lavados vaginales, saliva o suero de pacientes con vulvovaginitis candidiástica fueron depositados en los pocillos de los portaobjetos y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Tras la incubación, se lavaron con PBS y, a continuación, se volvieron a incubar con 20 μ l de anti-inmunoglobulina A humana marcada con biotina diluida 1:100 en PBS durante 1 hora a 37°C. A continuación, los portaobjetos se lavaron como se ha descrito anteriormente y se incubaron con estreptavidina marcada con isotiocianato de fluoresceína durante 15 minutos a 37°C. Tras ser lavados de nuevo, los portaobjetos fueron preparados para ser observados mediante microscopía de fluorescencia.

Una reacción positiva, es decir, que las IgA presentes en las distintas muestras clínicas estudiadas reaccionaban con los antígenos de la superficie de la pared celular de *Candida albicans*, se relacionó en todos los casos con el crecimiento del hongo a 37°C (Figura 1a, 1c, 1d y 1e). Las células cultivadas a 25°C fueron siempre negativas (Figuras 1b y 1f). El cambio de temperatura de cultivo influía en la reactividad de las levaduras con la IgA, ya que si las levaduras cultivadas a 37°C, y por tanto reactivas con la IgA, eran cultivadas a 25°C, desaparecía la reactividad con la IgA, para volver a aparecer de nuevo si las levaduras eran vueltas a incubar a 37°C.

En algunos experimentos, se incubaron células de *Candida albicans* con células HeLa 229 (Laboratorios Flow, U.K.). Para ello, las células HeLa fueron tratadas con tripsina y suspendidas en medio mínimo esencial (Flow) que contenía 10% de suero bovino fetal (Flow). Las células se contaron al microscopio y se ajustó su concentración a 1×10^5 células/ml. Tres ml de la suspensión celular se depositaron en pocillos de 35 mm de diámetro de placas de microtitulación en los cuales se habían depositado previamente cubreobjetos de 22 mm de diámetro. Tras 24 horas de incubación a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ se produjo una monocapa semiconfluente de células que se lavó tres veces con PBS. Las monocapas

fueron inoculadas con 3 ml de una suspensión de levaduras de *Candida albicans* a la concentración de 1×10^7 células/ml de PBS, levaduras que habían sido obtenidas cultivando el hongo en placas de agar glucosado de Sabouraud a 25 ó 37°C durante 24 horas. Tras la inoculación, las monocapas fueron incubadas durante 30 minutos a 37 ó 25°C y a continuación, los pocillos fueron lavados con PBS y fijados con metanol durante 10 minutos. Los cubreobjetos fueron incubados con saliva que contenía IgA tal como se indicó en la técnica de la inmunofluorescencia indirecta.

La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos al incubar células de *Candida albicans* y células HeLa a diferentes temperaturas. De nuevo, las manoproteínas que reaccionan con la IgA sólo se expresaron cuando las células de *Candida albicans* se habían cultivado a 37°C en medio de Sabouraud, en presencia de las células HeLa o en ambos casos.

Tabla 1
Reactividad con la *slgA* de células *Candida albicans* y células HeLa a diferentes temperaturas

Cultivo de <i>Candida albicans</i> en	Reactividad en IFI
AS a 37°C + HeLa 37°C	+
AS a 37°C + HeLa 25°C	+
AS a 25°C + HeLa 37°C	+
AS a 25°C + HeLa 25°C	-
IFI: Inmunofluorescencia indirecta.	
AS: Agar glucosado de Sabouraud.	
HeLa: Células HeLa.	

Ejemplo 3.

Caracterización de los antígenos.

a) Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

La electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se realizó según la técnica descrita por LAEMMLI [NATURE (London) 256(1970) págs. 495-497] en un aparato de electroforesis vertical Bio-Rad. Los extractos antigénicos se separaron en un gel homogéneo de poliacrilamida al 12,5% durante 18 horas a 15 mV. Después de la electroforesis, los geles fueron fijados con metanol, ácido acético, y formaldehído al 37% y agua (50/12/0,05/38%) durante 1 hora y teñidos con una tinción de plata o sometidos a autorradiografía con una exposición de 3 días a -70°C.

La Figura 2 muestra la electroforesis en geles de SDS-PAGE de extractos de *Candida albicans* cultivada a 25 y 37°C. Aunque la mayoría de las bandas se observaban a las

dos temperaturas, las bandas de 200, 130, 90 y 70 kilodaltons (kDa) se encontraban más expresadas a 37°C (calle B) que a 25°C (calle A).

b) *Cálculo de los pesos moleculares*

Los pesos moleculares de las bandas observadas en los geles se calcularon siguiendo el método de LAEMMLI (citado anteriormente) comparando la movilidad electroforética de cada banda con la de los marcadores de peso molecular conocido. La movilidad relativa de las bandas se calculó dividiendo la distancia de emigración de la banda estudiada entre la distancia de emigración del frente del gel. A continuación, se calculó matemáticamente la ecuación de la recta resultante de representar el logaritmo del peso molecular de los marcadores utilizados y su movilidad relativa. El peso molecular de las bandas se calculó introduciendo en la ecuación anterior la movilidad relativa de cada banda.

c) *Identificación de los antígenos reconocidos por la sIgA*

Los componentes del extracto antigénico separados en geles de SDS-PAGE fueron transferidos a láminas de nitrocelulosa básicamente según la técnica de TOBWIN [PROC.NATL.ACAD.SCI.USA,76(1979) págs. 4350-4354] durante 18 horas a 20 V y 4°C. La nitrocelulosa fue bloqueada con tampón Tris 20 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,4 que contenía 5% de leche descremada, lavada con PBS y cortada verticalmente en tiras. Cada una de las tiras fue incubada durante 18 horas a 4°C con las diferentes muestras biológicas que contenían anticuerpos (lavados orales, vaginales o una dilución 1: 100 del suelo de pacientes con vulvovaginitis candidiásica). Tras la incubación, las tiras fueron lavadas e incubadas con anti-IgA humana marcada con biotina o con antisuero de ratón anti-componente secretorio humano. Los anticuerpos marcados con biotina se revelaron con estreptavidina marcada con peroxidasa y posteriormente con 4-cloro-1-naftol o estreptavidina marcada con ¹²⁵I, para realizarse posteriormente una autorradiografía. El anticomponente secretorio humano se reveló con un antisuero anti-ratón marcado con biotina y posteriormente con estreptavidina marcada con peroxidasa.

La Figura 3 muestra los antígenos reconocidos por la IgA presente en un lavado oral. Los antígenos reconocidos eran componentes de naturaleza polidispersa de pesos moleculares 180-200, 130- 150, 90- 110 y 60-70 kDa que se encontraban más expresados en los extractos de células cultivadas a 37°C (calle B) que a 25°C (calle A). Resultados similares se obtuvieron con los anticuerpos presentes en lavados vaginales o en el suero de pacientes con vulvovaginitis candidiásica, así como al reve-

lar la reacción antígeno-anticuerpo con anticomponente secretor humano.

d) *Demostración de la naturaleza polisacárida de los antígenos reconocidos por la IgA*

En algunas experiencias, las tiras de nitrocelulosa obtenidas según el apartado anterior, se incubaron con Concanavalina A marcada con peroxidasa (suspendida a la concentración de 1 mg/ml y diluida 1: 1000 en tampón Tris) y la reacción se reveló como en el caso de la detección de la IgA. En otros casos, las tiras de nitrocelulosa con los antígenos transferidos fueron tratadas con metaperiodato sódico 10 mM en tampón acetato 100 mM, pH 5,5 durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras ser lavadas con PBS, se procedió a la incubación con las muestras clínicas que contenían IgA como se ha descrito anteriormente.

La Figura 3 muestra también la reactividad de los extractos de *Candida albicans* cultivada a 25 y 37°C con la Concanavalina A, observándose que los componentes de naturaleza polidispersa de pesos moleculares 180-200, 130-150, 90- 110 y 60-70 kDa presentan manosa y por tanto, reaccionan con la Concanavalina A. La reactividad era mayor en el extracto de las células cultivadas a 37°C (calle F) que a 25°C (calle E) y los componentes que reaccionaban con la Concanavalina A eran sensibles a la oxidación con periodato sódico, ya que tras el tratamiento no se producía una reacción con la IgA (Figura 3. calles C y D).

Una prueba complementaria de la naturaleza polisacárida de los antígenos reconocidos por la IgA se obtuvo al calentar a 100°C durante 5 minutos células de *Candida albicans* cultivada a 37°C. Tras el tratamiento, las células fueron lavadas con PBS y fijadas en portaobjetos para inmunofluorescencia según lo indicado en el Ejemplo 1. Este tratamiento, que elimina la reactividad de los antígenos proteicos presentes en la pared celular, no afectó a la reactividad de la IgA. Ejemplo 4.

Expresión de los antígenos en células de Candida albicans procedentes de pacientes con candidiasis.

Para el estudio de la expresión de los antígenos manoproteicos en células de *Candida albicans* procedentes de pacientes con candidiasis se utilizó una prueba de inmunofluorescencia directa o la prueba de inmuno-fluorescencia indirecta expuesta en el Ejemplo 2. Para la prueba de la inmunofluorescencia directa se fijaron a portas de inmunofluorescencia células de *Candida albicans* procedentes de muestras clínicas, fundamentalmente muestras vaginales y orales. Posteriormente, se añadieron a cada pocillo 20 µl de anti-IgA humana marcada con biotina diluida 1:100 en PBS y se incubó a 37°C durante 45 minutos en una cámara húmeda. Tras la incubación, los portaobjetos se lavaron con PBS y se incubaron con estreptavidina marcada con isotiocianato de fluoresceína durante 15 minutos a 37°C. Tras ser lavados de nuevo, los portaobjetos fueron preparados para ser observados mediante microscopía de fluorescencia.

Las células de *Candida* procedentes de la mayoría de los pacientes con, infección se encontraban recubiertas por anticuerpos de la clase IgA, lo que indicaba que habían expresado las manoproteínas que eran reconocidas por la IgA. Si la muestra clínica de donde se obtuvieron las células de *Candida albicans* para realizar la inmunofluorescencia directa se cultivaba en medio de Sabouraud a 25°C, las células de *Candida albicans* obtenidas ya no expresaban las manoproteínas que reaccionan con la IgA.

Las mismas manoproteínas se pudieron observar en célula, de *Candida albicans* procedentes de un hemocultivo de un paciente con infección por *Candida albicans*. Sin embargo, la expresión de estos antígenos era en este caso mayor, ya que el subcultivo repetido de las células de *Candida albicans* en medio de Sabouraud a 25°C no conducía a la desaparición de las manoproteínas que reaccionan con la IgA, siendo capaces las células de *Candida albicans* del séptimo subcultivo de reaccionar por inmunofluorescencia indirecta con la IgA.

Ejemplo 5.

Expresión de los antígenos en células de Candida albicans procedentes de animales con candidiasis.

Para el estudio de la expresión de los antígenos manoproteicos en células de *Candida albicans* procedentes de animales con candidiasis se utilizó una prueba de inmunofluorescencia directa similar a la expuesta en el Ejemplo 4.

En estos experimentos se inocularon intravenosamente 6 ratones con 1×10^5 levaduras de una cepa de *Candida albicans* que, por haber sido subcultivada múltiples veces en medio de Sabouraud a 25°C, no expresaba las manoproteínas que reaccionan con la IgA. Cuando los animales mostraron signos de infección aguda fueron sacrificados y los riñones disgregados para liberar las células de *Candida albicans* presentes en el tejido renal. Diez microlitros de la suspensión celular así obtenida se fijaron a un portaobjetos y se realizó una prueba de inmunofluorescencia indirecta de forma

similar a lo expuesto en el Ejemplo 1.

La infección experimental en el ratón produjo la expresión de las manoproteínas que reaccionaban con la IgA, ya que las levaduras de *Candida albicans* aisladas del riñón de los animales infectados reaccionaban con la IgA presente en lavados vaginales u orales de pacientes con candidiasis superficial.

Ejemplo 6.

Diferenciación de los antígenos de naturaleza manoproteica de las proteínas de choque térmico convencionales.

La posible relación entre las manoproteínas que reaccionan con la IgA y las proteínas de choque térmico convencionales fue estudiada incubando las tiras de nitrocelulosa obtenidas según el Ejemplo 2 con un anticuerpo monoclonal de rata anti-familia génica HSP-70 (suministrado por Alma Research). El anticuerpo monoclonal anti-HSP 70 es un anticuerpo específico de proteínas de choque térmico, [Heat Shock Proteins o HSP], que se expresan a 37°C pero no a 25°C, de 70 kDa de peso.

En la Figura 4 se presentan los resultados de la incubación de los extractos de células de *Candida albicans* con el anticuerpo monoclonal anti-HSP-70. El antígeno reconocido era un componente de peso molecular de 70 kDa que se encontraba más expresado en los extractos de las células cultivadas a 37°C (calle B) que a 25°C (calle A) y cuya reactividad no desaparecía tras la oxidación con periodato sódico (calles C y D).

El método descrito en la presente invención proporciona una descripción y una caracterización de las manoproteínas de *Candida albicans* que reaccionan con la slgA. Debe entenderse que si bien esta invención ha sido descrita respecto a la modalidad referida, serán evidentes diversas modificaciones de la misma para los expertos en esta materia, a partir de la lectura de esta descripción, quedando tales modificaciones cubiertas por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Antígenos manoproteicos de choque térmico de *Candida albicans* **caracterizados** porque se expresan durante la infección por *Candida albicans* o durante el cultivo *in vitro* a 37°C, pero no durante el cultivo *in vitro* a 25°C, y porque reaccionan con la inmunoglobulina A secretora (sIgA) presente en secreciones de pacientes con candidiasis.

2. Antígenos manoproteicos de choque térmico de *Candida albicans* según la reivindicación 1, **caracterizados** porque son manoproteínas de pesos moleculares de 180-200 kDa, 130-150 kDa, 90-110 kDa y 60-70 kDa.

3. Antígenos manoproteicos de choque térmico de *Candida albicans* según la reivindicación

1, **caracterizados** porque reaccionan con la sIgA presente en las secreciones orales de pacientes con candidiasis oral.

4. Antígenos manoproteicos de choque térmico de *Candida albicans* según la reivindicación 1, **caracterizados** porque reaccionan con la sIgA presente en las secreciones vaginales de pacientes con candidiasis vaginal.

5. Antígenos manoproteicos de choque térmico de *Candida albicans* según la reivindicación 1, **caracterizados** porque reaccionan con la IgA presente en el suero de pacientes con candidiasis vaginal y otros tipos de candidiasis.

6. Empleo de los antígenos manoproteicos de choque térmico de *Candida albicans* según las reivindicaciones 1 a 5, para el diagnóstico de las candidiasis.

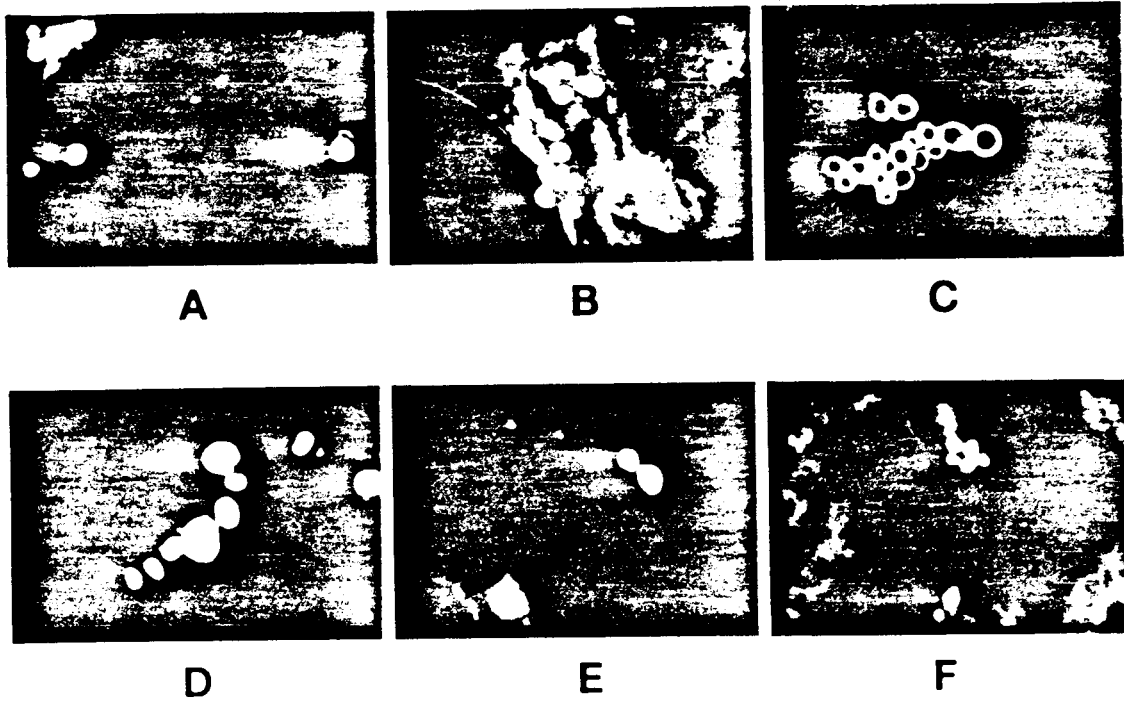


FIGURA 1

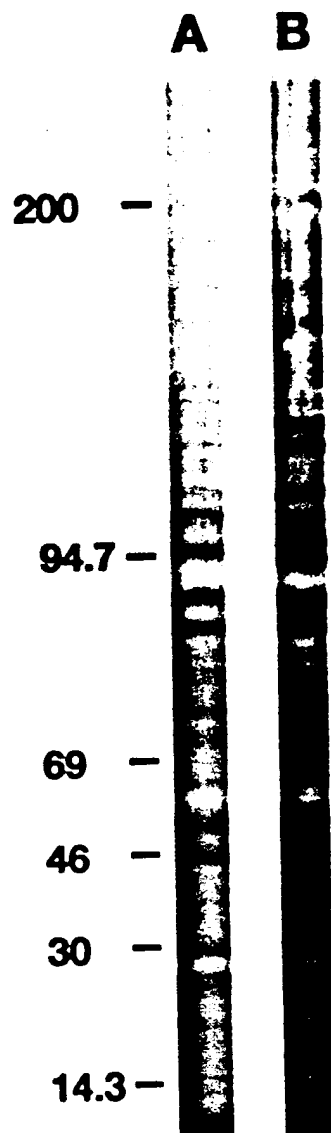


FIGURA 2

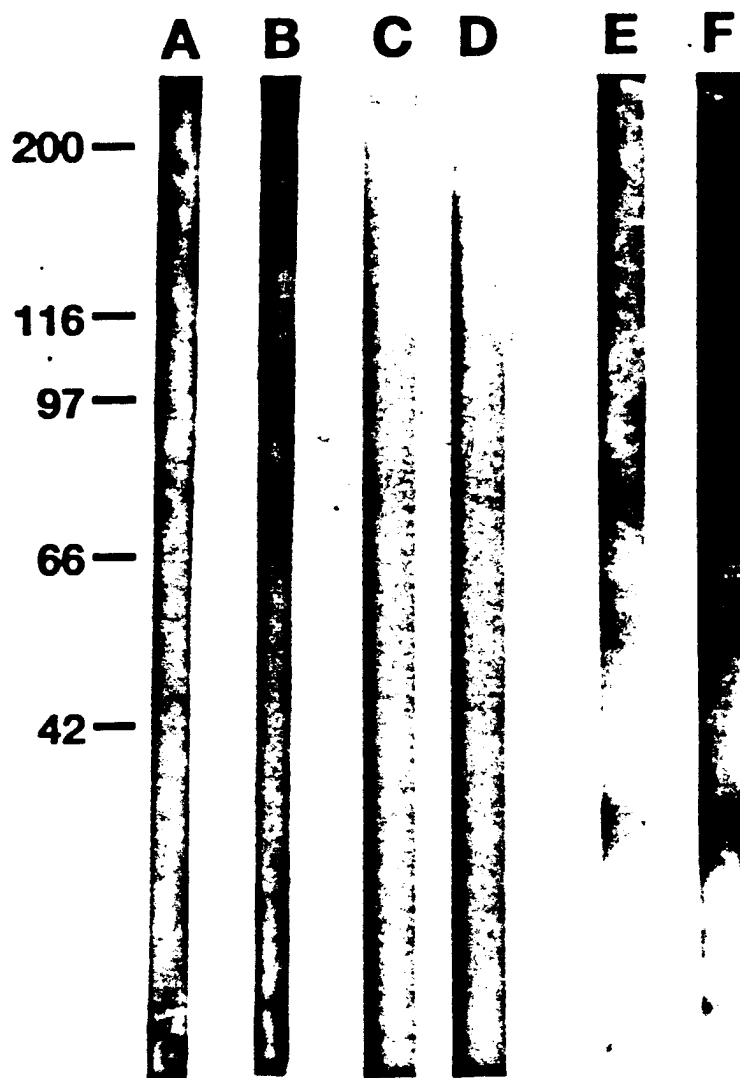


FIGURA 3

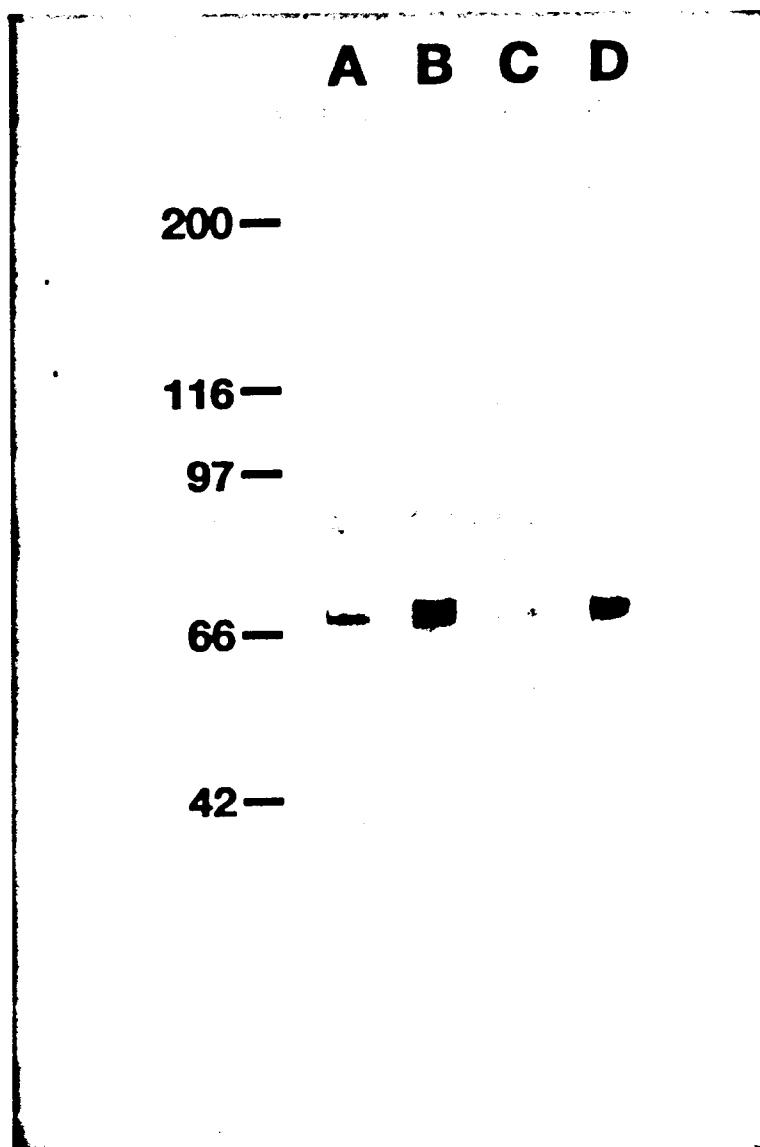


FIGURA 4



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 078 159
⑫ N.º solicitud: 9302164
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 14.10.93
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: C07K 14/40, G01N 33/68

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, 1991, Vol. 137, pág. 1053-1061. M.L. GIL et al. "Antigenic cell wall mannoproteins in Candida albicans isolates and in other Candida species".	1-2
Y	* Todo el documento *	1-6
X	INFECTION AND IMMUNITY, 1992, Vol. 60, n.º 4, pág. 1499-1508. K.C. HAZEN et al. "Hydrophobic Surface Protein Masking by the Opportunistic Fungal Pathogen Candida albicans".	1-2
Y	* Todo el documento *	1-6
Y	EP-406029-A (J.P. BURNIE et al.) 02.01.91 * Todo el documento *	1-6
Y	EP-145333-A (TEMPLE UNIVERSITY OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION) 19.06.85 * Todo el documento *	1-6

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 n.º:

Fecha de realización del informe
28.09.95

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/1