

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 936 811**

51 Int. Cl.:

A61K 47/64 (2007.01)

A61K 39/385 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.03.2014 PCT/US2014/021128**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14158963**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2014 E 14774732 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2022 EP 2968427**

54 Título: **Conjugado para inducir anticuerpos dirigidos a polisacáridos de la pared celular fúngica**

30 Prioridad:

12.03.2013 US 201361777631 P

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

22.03.2023

73 Titular/es:

**WELLSTAT VACCINES, LLC (100.0%)
14200 Shady Grove Road Suite 600
Rockville, MD 20850, US**

72 Inventor/es:

**MICHON, FRANCIS;
COMER, FRANK;
REN, KUISHU y
WOHLSTADTER, SAMUEL J.**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 936 811 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Conjugado para inducir anticuerpos dirigidos a polisacáridos de la pared celular fúngica

5 Antecedentes de la invención

Un aumento drástico en la incidencia de enfermedades fúngicas invasivas en los últimos años, así como la aparición de especies fúngicas resistentes a fármacos y anteriormente raras, ha puesto de relieve la necesidad de nuevas estrategias de tratamiento antifúngico terapéutico y profiláctico ampliamente eficaces (3-5). El aumento de la incidencia de infecciones fúngicas invasivas se atribuye en parte al aumento de la población de pacientes inmunocomprometidos, debido al creciente número de pacientes con inmunodeficiencias adquiridas asociadas a enfermedades, aquellos en unidades de cuidados intensivos, pacientes sometidos a cirugía o tratamiento inmunosupresor y aquellos que reciben terapia de trasplante de órganos o celular. Es importante destacar que los factores de riesgo que predisponen a los individuos a la enfermedad fúngica invasiva no excluyen la posibilidad de desarrollar una respuesta inmunitaria eficaz y responder favorablemente a la inmunoterapia (6, 7), lo que promete el desarrollo de vacunas eficaces o enfoques basados en inmunoterapia para satisfacer esta necesidad médica insatisfecha.

Los dos hongos patógenos más prevalentes que afectan a los seres humanos, *Aspergillus* y *Candida* spp., representan aproximadamente el 8-10 % de todas las infecciones adquiridas en la atención sanitaria, con una mortalidad atribuible del 30-40 % (5, 8). Las especies de *Candida* son la cuarta causa principal de casos de sepsis nosocomial en los EE. UU. y la creciente incidencia de enfermedades fúngicas invasivas de todos los hongos patógenos representa una carga importante para la atención sanitaria en todo el mundo. Los costes excesivos de la atención sanitaria debido a la mayor duración de la estancia y el tratamiento de las infecciones fúngicas adquiridas en el hospital están en el intervalo de mil millones de dólares anuales solo en los EE. UU. Además, las pruebas exhaustivas de susceptibilidad a los antimicóticos de los aislamientos clínicos han puesto de manifiesto que, a pesar de los avances en fármacos antimicóticos seguros y eficaces, todas las clases de agentes antimicóticos actualmente disponibles están sujetas a la aparición de cepas resistentes (5). La meningitis criptocócica, una infección por el hongo *Cryptococcus* también conocida como criptococosis, es una infección oportunista muy grave entre las personas con VIH/SIDA avanzado. La criptococosis no es contagiosa, lo que significa que no se puede propagar de persona a persona. La meningitis criptocócica se produce específicamente después de que *Cryptococcus* se ha propagado de los pulmones al cerebro. Un problema global, en todo el mundo, se producen aproximadamente 1 millón de casos nuevos de meningitis criptocócica cada año, dando como resultado 625.000 muertes. La mayoría de los casos son infecciones oportunistas que se producen entre personas con VIH/SIDA. Aunque la amplia disponibilidad de la terapia antirretrovírica (TAR) en los países desarrollados ha ayudado a reducir las infecciones criptocócicas en estas áreas, sigue siendo un problema importante en los países en desarrollo donde el acceso a la atención sanitaria es limitado. En gran parte del África subsahariana, por ejemplo, *Cryptococcus* es ahora la causa más común de meningitis en adultos. La meningitis criptocócica es una de las principales causas de muerte en pacientes con VIH/SIDA; en África subsahariana, puede matar a tantas personas cada año como la tuberculosis.(24).

Estos desafíos significativos del combate de las enfermedades fúngicas apuntan a la necesidad crítica de una vacuna panfúngica altamente eficaz como un componente valioso del arsenal antifúngico. Hasta la fecha, dos componentes de carbohidratos de la pared celular fúngica, β -manano y β -glucano, se han explorado como dianas para la vacunación antifúngica. Se ha demostrado que las vacunas conjugadas compuestas de β -(1 \rightarrow 3)-glucano o β -(1 \rightarrow 2)-manotriosa lineales confieren protección contra enfermedades fúngicas, con eficacia en la inmunización tanto activa como pasiva (9-11). En modelos animales de enfermedades fúngicas, la vacuna de β -glucano demostró ser eficaz contra *C. albicans*, *A. fumigatus* y *C. neoformans*, validando la posibilidad de una vacunación exitosa contra múltiples patógenos fúngicos dispares (9, 12). Sin embargo, la producción de respuestas de la vacuna eficaces requiere una cuidadosa consideración de la estructura fina de los antígenos diana, ya que existe una creciente evidencia de que un mecanismo de evasión inmunitaria empleado por patógenos fúngicos es la expresión de epítomos inmunodominantes que inducen respuestas de anticuerpos no protectores o inhibidores. Estos epítomos señuelo anulan la eficacia de las respuestas hacia los epítomos protectores. Por ejemplo, las vacunas compuestas por epítomos de β -(1 \rightarrow 3)-glucano lineal producen respuestas protectoras, mientras que las vacunas compuestas por β -(1 \rightarrow 3)-glucanos con ramificaciones de β -(1 \rightarrow 6)-glucano producen anticuerpos contra ambas estructuras, pero no confieren protección contra enfermedades fúngicas (13, 14).

Además, la utilidad fundamental de la vacuna depende de la universalidad de los antígenos diana. Por ejemplo, el epítomo de β -(1 \rightarrow 2)-manotriosa no aparece en todas las especies de *Candida* y el antígeno de la vacuna que emplea este epítomo se basa en epítomos peptídicos protectores para expandir su utilidad (10). Teniendo en cuenta la distribución limitada de algunos epítomos de carbohidratos de la pared celular y en vista de los mecanismos empleados por los patógenos fúngicos para evitar respuestas inmunitarias productivas a los componentes de la pared celular, existe la necesidad de una vacuna fúngica universalmente eficaz. La presente invención está diseñada para dirigirse a epítomos de carbohidratos de la pared celular fúngica altamente conservados para proporcionar una vacuna panfúngica.

La quitina no se ha examinado como diana de una vacuna antifúngica, en gran parte por razones relacionadas con su naturaleza altamente insoluble. Los métodos disponibles en la técnica para degradar la quitina en fragmentos solubles no están controlados estequiométricamente y, por lo tanto, es difícil modular el grado de despolimerización.

Sorlier y col. (2003), Journal of Biomedical Materials Research, 67, 3, 766-774 describe la preparación y el desarrollo de anticuerpos anti-quitosana. Bromuro y col. (2010), Vaccine, 28, 14, 2615-2623 describe conjugados de beta-glucano-CRM197 como vacunas antifúngicas candidatas. El documento WO 2006/096970 A1 describe vacunas sintéticas basadas en oligosacáridos anti-*Candida albicans*. Schubert y col. (2010), Journal of Microbiology and Biotechnology, 20, 8, 1179-1184 describe un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la quitosana *in vitro* e *in situ* en las paredes de las células fúngicas.

Resumen de la invención

La invención se define por las reivindicaciones.

La invención proporciona un compuesto formado por la conjugación de uno o más restos de polisacárido, cada uno representado independientemente por la fórmula $\beta(1\rightarrow4)\text{-[GlcNH-R]}_n\text{-2,5-anhidromanosa}$, en donde n es un número entero positivo de 3 a 50, R es H o un grupo acilo, y el uno o más restos de polisacárido son polímeros mixtos de quitina/quitosana, con una proteína portadora inmunogénica unida covalentemente al uno o más restos de polisacárido directamente en el grupo anhidromanosa de cada uno de los restos de polisacárido.

Un proceso para fabricar un compuesto representado por la fórmula $\beta(1\rightarrow4)\text{-[GlcNH-R]}_n\text{-2,5-anhidromanosa}$, en donde n es un número entero positivo de 3 a 50 y R es H o un grupo acilo, que comprende:

(a) hacer reaccionar quitosana con una cantidad de agente acilante suficiente para N-acilar parcialmente la quitosana, produciendo un polímero mixto de quitina modificada/quitosana;

(b) hacer reaccionar el polímero mixto de quitina modificada/quitosana con un agente de desaminación para escindir el polímero mixto en los restos de quitosana sin acilar, produciendo el compuesto de fórmula $\beta(1\rightarrow4)\text{-[GlcNH-R]}_n\text{-2,5-anhidromanosa}$ descrito en el presente documento.

La presente invención proporciona un compuesto o composición según se reivindica para su uso en un método para inmunizar a un sujeto mamífero contra un patógeno fúngico, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunogénica del compuesto o una composición que lo contiene.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Esquema de reacción para la preparación de los fragmentos de quitina modificada.

Esquema de reacción para la preparación en una sola etapa de los fragmentos de quitina modificada a partir de quitosana.

Figura 2: Análisis de la conjugación de quitina modificada con toxoide tetánico.

Gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie que muestra la conjugación de los fragmentos de quitina modificada con proteína del toxoide tetánico (TT).

Figura 3: Dosis y programa de inmunización con conjugado de quitina modificada-TT.

Gráfico que muestra la dosis y el programa de inmunización para la administración de la vacuna de conjugado de quitina modificada-TT a ratones Balb/C.

Figura 4: Inmunogenicidad de la vacuna de conjugado de quitina modificada-TT en ratones Balb/C. Gráfico lineal que muestra la inmunogenicidad del conjugado de vacuna de quitina modificada-TT en ratones Balb/C. El antígeno de cribado era quitina modificada entrecruzada con albúmina sérica humana (HSA, por sus siglas en inglés).

Figura 5A: Especificidad de la respuesta inmunitaria en ratones Balb/C inmunizados con conjugado de vacuna de quitina modificada-TT.

Gráfico lineal que compara la inhibición de la unión de suero vacunal con antígeno de cribado de quitina modificada-HSA.

Figura 5B: Especificidad de la respuesta inmunitaria en ratones Balb/C inmunizados con conjugado de vacuna de quitina modificada-TT.

Gráfico de barras que muestra la falta de reactividad cruzada de sueros vacunales hacia múltiples glucoconjugados que contienen GlcNAc.

Figura 5C: Especificidad de la respuesta inmunitaria en ratones Balb/C inmunizados con conjugado de vacuna de quitina modificada-TT.

Gráfico de barras que muestra la reactividad de sueros vacunales frente a los polisacáridos de quitina/quitosana. El gráfico de la izquierda muestra que los anticuerpos reactivos frente a la quitina modificada pueden agotarse mediante la adsorción en partículas de quitina o quitosana. Además, los extractos solubles de quitina o quitosana inhiben la unión de los sueros vacunales a la quitina modificada-HSA. El gráfico de la derecha muestra que la unión de un anticuerpo irrelevante (anti-HA) a su epítipo no se ve afectada por los mismos tratamientos.

Figura 6: Unión de los anticuerpos inducidos por la vacuna conjugada de quitina modificada-TT con hongos *Candida albicans* enteros.

Gráfico de barras que muestra que los anticuerpos séricos de ratones Balb/C inmunizados con quitina modificada-TT y simulada (PBS) se unen a *C. albicans* enteros. La reactividad se elimina específicamente compitiendo con fragmentos de quitina modificada.

Figura 6B: Unión de los anticuerpos inducidos por la vacuna conjugada de quitina modificada-TT con hongos *Candida albicans* enteros.

Gráfico de barras que muestra que los anticuerpos reactivos de quitina purificados por afinidad al antígeno se unen a *C. albicans* enteros.

Figura 7A: Morfología de células de levadura de *Candida albicans* cultivadas en diversas condiciones Células de levadura cultivadas a 30 °C en medio de YPD durante la noche.

Figura 7B: Morfología de células de levadura de *Candida albicans* cultivadas en diversas condiciones Células de filamentos intermedios cultivadas a 37 °C en medio de YPD y suero durante 150 min.

Figura 7C: Morfología de células de levadura de *Candida albicans* cultivadas en diversas condiciones Filamentos cultivados en micelio a 37 °C en medio de YPD y suero durante 300 min.

Figura 8A: Unión de anticuerpos inducidos por vacunas de quitina modificada y laminarina a *Candida albicans* enteros por citometría de flujo.

Controles de ensayos para determinar la unión de anticuerpos a células de levadura.

Figura 8B: Unión de anticuerpos inducidos por vacunas de quitina modificada y laminarina a *Candida albicans* enteros por citometría de flujo.

El anticuerpo de toxoide tetánico controla la unión a las células de levadura.

Figura 8C: Unión de anticuerpos inducidos por vacunas de quitina modificada y laminarina a *Candida albicans* enteros por citometría de flujo.

Unión de anticuerpos de laminarina (parte superior) y anticuerpo de quitina modificada (parte inferior) a células de levadura cultivadas a 30 °C en medio de YPD durante la noche.

Figura 8D: Unión de anticuerpos inducidos por vacunas de quitina modificada y laminarina a *Candida albicans* enteros por citometría de flujo.

Unión de anticuerpos de laminarina a células de levadura cultivadas a 37 °C en medio de YPD y suero durante 150 min.

Figura 8E: Unión de anticuerpos inducidos por vacunas de quitina modificada y laminarina a *Candida albicans* enteros por citometría de flujo.

Unión de anticuerpos de quitina modificada a células de levadura (micelios) cuando se cultivan a 37 °C en medio de YPD y suero durante 300 min.

Figura 9A: Protección mediada por la vacuna de quitina modificada-TT frente a una exposición letal de *C. albicans*

Se inmunizaron ratones (Balb/C) con una vacuna de quitina modificada-TT y, posteriormente, se expusieron a una dosis letal de *C. albicans* vivos. Se monitorizó la supervivencia durante 36 días después de la exposición al hongo.

Figura 9B: Protección mediada por la vacuna de quitina modificada-TT frente a una exposición letal de *C. albicans*

Se inmunizaron ratones (CD1) con vacunas conjugadas de quitina modificada-TT y laminarina-TT y, posteriormente, se expusieron a una dosis letal de *C. albicans* vivos. Se monitorizó la supervivencia durante 28 días después de la exposición al hongo.

Figura 10A: Inmunorreactividad por ELISA de sueros humanos normales con quitina; quitina modificada y laminarina

Reactividad de sueros humanos normales (IgG gamma) en una placa recubierta con quitina modificada-HSA. Todos los sueros reaccionan significativamente con la quitina modificada, lo que sugiere la presencia de anticuerpos específicos de quitina adquiridos de forma natural en seres humanos a través de la exposición a hongos u otros antígenos extraños que contienen quitina.

Figura 10B: Inmunorreactividad por ELISA de sueros humanos normales (NHS, por sus siglas en inglés) con quitina; quitina modificada y laminarina

Especificidad de anticuerpo de la unión de un NHS de alto título a una placa recubierta con quitina modificada-HSA por inhibición competitiva con diversos inhibidores. La especificidad del NHS hacia la quitina modificada es la más alta, seguida por los inhibidores pequeños de oligosacáridos de quitina (DP5 y DP3).

Figura 10C: Inmunorreactividad por ELISA de sueros humanos normales con quitina; quitina modificada y laminarina

Especificidad de anticuerpo de la unión de un NHS de alto título a una placa recubierta con Quitohehexaosa-HSA por inhibición competitiva con oligosacáridos de quitina de DP creciente. Existe un aumento de la inhibición con el tamaño creciente de los oligosacáridos de quitina de DP2 a DP6, lo que sugiere que estos anticuerpos humanos reconocen un epítipo conformacional de quitina con un tamaño mínimo de un hexasacárido.

Figura 10D: Inmunorreactividad por ELISA de sueros humanos normales con quitina; quitina modificada y laminarina

Reactividad de sueros humanos normales (IgG gamma) en una placa recubierta con laminarina-HSA. El NHS reconoce el antígeno de laminarina (beta glucano), aunque no en el mismo grado que la quitina modificada.

Figura 11: Unión de anticuerpos inducidos por vacunas de quitina modificada y laminarina a *Cryptococcus neoformans* entero de tipo A (H99) por citometría de flujo.

Control de ensayos para determinar la unión de anticuerpos a células de levadura.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un compuesto formado por la conjugación de uno o más restos de polisacárido, cada uno representado independientemente por la fórmula $\beta(1 \rightarrow 4)\text{-[GlcNH-R]}_n\text{-2,5-anhidromanosa}$, en donde n es un número entero positivo de 3 a 50, R es H o un grupo acilo, y el uno o más restos de polisacárido son polímeros mixtos de quitina/quitosana, con una proteína portadora inmunogénica unida covalentemente al uno o más restos de polisacárido directamente en el grupo anhidromanosa de cada uno de los restos de polisacárido.

En realizaciones más específicas de la presente invención, n es un número entero positivo de 6 a 50. En una realización, el grupo acilo R es un acetilo. En otra realización, al menos el 30 % de los grupos acilo en el compuesto son acetilo.

El campo técnico es la prevención, el tratamiento y la detección de infecciones fúngicas. Específicamente, las vacunas o inmunoterápicos que se dirigen a los componentes de carbohidratos de la pared celular fúngica pueden proporcionar tratamiento para infecciones fúngicas diseminadas o localmente invasivas. Las indicaciones de enfermedad son numerosas, incluyendo, aunque no de forma limitativa, las provocadas por formas patógenas humanas de especies de *Candida*, *Aspergillus* y *Cryptococcus*. De forma adicional, la capacidad de generar una respuesta de anticuerpos a los componentes de carbohidratos conservados de estos hongos patógenos podría conducir al desarrollo de reactivos de diagnóstico para la detección de estos agentes fúngicos en muestras biológicas de pacientes (por ejemplo, plasma, suero u otros fluidos corporales, así como cortes de tejido, etc.). Por último, puesto que las respuestas inflamatorias de tipo Th2 a la quitina se han implicado en el asma alérgica y otras afecciones alérgicas (2), una vacuna a base de quitina que dé como resultado un desplazamiento hacia una respuesta inmunitaria de tipo Th1 puede mejorar los síntomas de la inflamación inducida por alérgenos.

Otro carbohidrato fundamental de la pared celular de interés es el α -1,3-glucano de superficie. La infección exitosa por patógenos fúngicos depende de la subversión de los mecanismos inmunitarios del hospedador que detectan componentes conservados de la pared celular, tales como los beta-glucanos. Un polisacárido menos común, el α -(1,3)-glucano, es un constituyente de la pared celular de la mayoría de los patógenos fúngicos respiratorios y se ha relacionado con la patogenia o se ha vinculado directamente con la virulencia. Sin embargo, se desconoce el mecanismo preciso por el cual el α -(1,3)-glucano promueve la virulencia fúngica. El α -(1,3)-glucano está presente en la capa más externa de la pared celular de la levadura *Histoplasma capsulatum* y contribuye a la patogenia al ocultar los beta-glucanos inmunoestimuladores de la detección por las células fagocíticas del hospedador. La producción de TNF-alfa proinflamatorio por los fagocitos se suprimió por la presencia de la capa de α -(1,3)-glucano en las células de levadura o por el agotamiento basado en la interferencia de ARN del receptor de beta-glucanos delectina-1 del hospedador. Rappleye y col. han definido funcionalmente componentes moleculares clave que influyen en la interacción inicial hospedador-patógeno en la histoplasmosis y han revelado un mecanismo

importante por el cual *H. capsulatum* frustra el sistema inmunitario del hospedador. Además, proponen que el grado de esta evasión contribuye a la diferencia en el potencial patógeno entre los patógenos fúngicos dimórficos y los hongos oportunistas (25). Otro estudio sugirió la relevancia del α -1,3-glucano de la pared celular para la infección fúngica. Debido a que muchas especies fúngicas podrían utilizar potencialmente las mismas o similares estrategias de infección sigilosa, la localización específica al α -1,3-glucano fúngico, por ejemplo, confiriendo actividad de α -1,3-glucanasa a las plantas de cultivo o aplicando un inhibidor de la α -1,3-glucano sintasa fúngica, podría proporcionar una estrategia versátil para la prevención de una amplia diversidad de enfermedades fúngicas en cultivos importantes. Aunque aún queda por resolver el mecanismo detallado, lo cierto es que la retirada del α -1,3-glucano de superficie activa rápidamente las respuestas de defensa de la planta hospedadora frente a los patógenos fúngicos antes de la invasión fúngica, dando como resultado la inhibición de la infección por patógenos (26). Las paredes de las células de levadura son críticas para mantener la integridad celular, particularmente frente a desafíos tales como el crecimiento en hospedadores mamíferos. El hongo patógeno *Cryptococcus neoformans*, de forma adicional, ancla su cápsula de polisacárido a la superficie celular a través de α (1-3) glucano en la pared. Las células criptocócicas alteradas en su gen de la alfa glucano sintasa eran sensibles al estrés, incluyendo la temperatura, y mostraban dificultad para dividirse. Estas células carecían de cápsula superficial, aunque continuaron arrojando material de la cápsula al entorno. La microscopía electrónica mostró que el alfa glucano que usualmente se localiza en la parte externa de la pared celular estaba ausente, la región externa de la pared estaba muy desorganizada y la región interna era hipertrófica. El análisis de la composición de la pared celular demostró una pérdida completa de alfa glucano acompañada de un aumento compensatorio de quitina/quitosana y una redistribución de beta glucano entre las fracciones de la pared celular. Los mutantes no pudieron crecer en un modelo en ratón de infección, pero provocaron la muerte en nematodos. Estos estudios integran investigaciones morfológicas y bioquímicas del papel del alfa glucano en la pared celular criptocócica (27).

Por lo tanto, una vacuna que comprende quitina/quitosana y uno o más antígenos de glucano, por ejemplo, antígenos de glucano que contienen homopolímeros de enlaces α -1,3, enlaces β -1,3, o ambos, se dirigirá a epítomos de la pared celular fúngica altamente conservados y proporcionará una vacuna panfúngica.

La invención reivindicada proporciona vacunas antifúngicas conjugadas que se dirigen a los componentes de la pared celular de carbohidratos conservados que son elementos estructurales comunes en múltiples filos de hongos patógenos. La composición de estas vacunas puede incluir uno o más epítomos que consisten en polisacáridos, en donde uno o más restos de polisacárido son polímeros mixtos de quitina/quitosana, solos o en combinación con epítomos de β -manano o glucano. Los componentes de carbohidrato se conjugan con una proteína portadora inmunogénica apropiada como se define en las reivindicaciones, tal como el toxoide tetánico, el toxoide diftérico o factores de virulencia proteicos específicos presentes en la superficie de las células fúngicas. La proteína portadora se une covalentemente directamente a uno o más restos de polisacárido en el grupo anhidromanosa de cada uno de los restos de polisacárido.

En una realización, el β -manano puede ser un tetrasacárido de β -1,2-manosa. En la realización más simple de un tetrasacárido de β -1,2 manosa, los oligosacáridos pueden reaccionar con un polisacárido de quitina modificada, para producir una molécula multivalente. El tetrasacárido de β -1,2 manosa puede sintetizarse químicamente (23). La condensación del oligosacárido puede lograrse mediante cualquiera de los numerosos métodos disponibles en la técnica para la reacción entre el extremo reductor del oligosacárido con los grupos amino libres de la quitina modificada o a través de un brazo espaciador equipado con un grupo escuarato (23). Además, la descripción prevé una etapa adicional de conjugar el polisacárido con una proteína portadora adecuada. Esta conjugación puede conseguirse mediante una serie de medios disponibles para un experto en la técnica.

Alternativamente, en el presente documento se describe que los diferentes componentes de carbohidrato pueden entrecruzarse químicamente, ya sea directa o indirectamente. Por ejemplo, los carbohidratos pueden unirse enlazándolos entre sí en una matriz de estructura base común, tal como un sustrato dendrímérico, o mediante la co-conjugación con una proteína portadora. Otra descripción más es estructurar directamente los componentes entre sí mediante la creación de entrecruzamientos químicos entre los componentes de carbohidrato y posteriormente conjugar la matriz de polisacárido estructurada con un portador de proteína inmunogénica. Estos entrecruzamientos químicos pueden conseguirse por cualquier número de medios disponibles para un experto en la técnica, incluyendo, aunque no de forma limitativa, la aminación reductora o el uso de reactivos de entrecruzamientos químicos heterobifuncionales u homobifuncionales.

La presente invención proporciona una composición que comprende el compuesto según se reivindica, en donde para al menos el 80 % de las moléculas del compuesto en la composición n tiene un valor de 6 a 50. En una realización alternativa, la presente invención proporciona una composición que comprende moléculas del compuesto según se reivindica, en donde el valor medio de n es de 10 a 50.

Se probaron métodos para producir fragmentos derivados de quitina o quitosana para su uso en una vacuna antifúngica. Se probaron numerosas estrategias, en diversas condiciones, basadas en parte en métodos disponibles en la bibliografía (15-18). Los enfoques incluyeron métodos para obtener directamente oligosacáridos de quitina, tales como la hidrólisis ácida parcial de quitina. Las variables probadas incluyeron tiempo, temperatura y escala de reacción. En todos los métodos probados, la solubilidad fue un problema importante y el rendimiento de oligosacáridos del tamaño deseado estuvo en el intervalo decepcionante del 1 % o menos, coherente con los rendimientos publicados, pero no deseable para la producción eficiente de un antígeno vacunal. También se probaron diversas condiciones, basadas en métodos publicados, para

conseguir una desaminación nitrosa limitada de oligosacáridos o polisacáridos de quitosana, que desamina los grupos amino libres con la escisión del enlace glicosídico concomitante (fragmentación del polímero) en el residuo desaminado. Las variables probadas para la desaminación nitrosa incluyeron variar la fracción molar de ácido nitroso y comenzar con quitosana de tamaño y grado de acetilación variables. En todos estos casos, el tratamiento con ácido nitroso solubilizó las suspensiones de quitosana, pero la reacción fue difícil de controlar y, una vez más, el rendimiento de oligosacáridos del tamaño deseado fue bajo. Por último, en un intento de producir una quitina parcialmente des-N-acetilada como material de partida para la reacción de desaminación nitrosa, la quitina se trató con NaOH para efectuar una des-N-acetilación limitada antes de la desaminación nitrosa. Este tratamiento solo produjo oligosacáridos de quitina de muy bajo peso molecular.

Al no poder obtener fragmentos derivados de quitina del tamaño deseado con un rendimiento aceptable con los métodos existentes según la técnica, se ideó otra estrategia para obtener el producto deseado, que era re-N-acilar parcialmente N (por ejemplo, re-N-acetilar) quitosana para producir un polímero mixto de quitina/quitosana con un número limitado de residuos de glucosamina que contienen grupos amino libres. Debido a que la reacción de desaminación nitrosa posterior solo ocurre en los residuos de glucosamina que contienen grupos amino libres, los residuos de N-acil glucosamina (por ejemplo, N-acetil glucosamina) serían resistentes a la escisión. Puesto que la reacción de acilación (por ejemplo, acetilación) no es de naturaleza catalítica, se probó si la reacción podría controlarse ajustando la fracción molar del reactivo de acetilación presente en la reacción. Ajustando la cantidad de reactivo de acilación (por ejemplo, acetilación), se descubrió que se podía controlar directamente el tamaño de los fragmentos derivados de quitina en la reacción de desaminación nitrosa posterior. Además, las dos reacciones que conducen de la quitosana a fragmentos de quitina modificada podrían realizarse como una reacción en una sola etapa, que consiste en una reacción de acilación en fase sólida (por ejemplo, acetilación), seguida de acidificación y desaminación nitrosa para producir fragmentos de quitina modificada. Puede usarse cualquier agente de acilación convencional, por ejemplo, anhídrido acético o cloruro de acetilo, siendo ambos agentes de acetilación, o anhídrido N-propiónico o cloruro propiónico, que son agentes de propionilación.

Un impedimento de gran importancia para emplear quitina en una formulación de vacuna es su naturaleza altamente insoluble. Los métodos disponibles en la técnica para degradar la quitina en fragmentos solubles no están controlados estequiométricamente y, por lo tanto, es difícil modular el grado de despolimerización. El objetivo era producir eficientemente fragmentos derivados de quitina de tamaño suficiente para inducir respuestas de la vacuna frente a polímeros de quitina nativos en la pared celular fúngica, al mismo tiempo que cumplía con los criterios potencialmente competitivos de que los fragmentos sean solubles o lo suficientemente uniformes para que sean adecuados para la formulación como vacuna inyectable. Los siguientes ejemplos no limitativos demuestran cómo se consiguió el éxito en el cumplimiento de estos criterios en una reacción de una sola etapa. Empleando una primera etapa de re-N-acetilación parcial de quitosana en una reacción estequiométricamente limitada, fue posible fragmentar posteriormente el polímero modificado por desaminación nitrosa, de manera controlada (Ejemplo 1 y Figura 1).

La presente invención proporciona un compuesto o composición según se reivindica para su uso en un método para inmunizar a un sujeto mamífero contra un patógeno fúngico, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunogénica del compuesto o composición. El sujeto puede ser un ser humano o un animal no humano.

Para mejorar la inmunogenicidad del antígeno de carbohidrato y promover una respuesta de memoria dependiente de linfocitos T, el fragmento de quitina modificada se conjugó con toxoide tetánico. El toxoide tetánico es un ejemplo no limitativo de una proteína inmunogénica que contiene múltiples epítomos de linfocitos T auxiliares que la hacen adecuada para su uso como proteína portadora para vacunas de conjugados de carbohidratos. El Ejemplo 2 y la Figura 2 demuestran un ejemplo no limitativo de un método para la conjugación de los fragmentos de quitina que contienen aldehído con el toxoide tetánico a través de aminación reductora. El Ejemplo 3 y la Figura 3 proporcionan un ejemplo típico de una estrategia de inmunización para inducir respuestas de la vacuna en animales de prueba.

La evaluación de las respuestas de anticuerpos en ratones Balb/C inmunizados con la vacuna de quitina modificada, como se esboza en el presente documento, demuestra que la vacuna produce respuestas inmunitarias sólidas y específicas frente al antígeno inmunizante (Ejemplo 4 y Figura 4) y frente a hongos *C. albicans* enteros (Ejemplo 6 y Figura 6). Los animales inmunizados de forma simulada (PBS) presentan un nivel basal de unión a *C. albicans* enteros (Ejemplo 6A y Figura 6A), coherente con la exposición a hongos anterior. La inmunización con la vacuna de quitina modificada elevó notablemente el título de anticuerpos séricos que reconocen *C. albicans*, lo que indica una mejora de la respuesta adaptativa al hongo. La unión de *C. albicans* se inhibió sustancialmente con fragmentos de quitina modificada, lo que demuestra que una porción significativa de los anticuerpos de suero reconoce la quitina y, lo que es más importante, que los anticuerpos reconocen la quitina en el hongo nativo. Los experimentos de inhibición de antígeno verificaron la especificidad de la respuesta de la vacuna hacia el antígeno inmunizante (Ejemplo y Figura 5A). Además, los anticuerpos inducidos no mostraron ninguna reactividad cruzada detectable con múltiples glicoconjugados que contenían GlcNAc que están presentes en mamíferos (Ejemplo 5B y Figura 5B). Estos controles de especificidad negativa incluían GlcNAc-Serina unida a O, un glicano intracelular importante; ovoalbúmina y fetuína, que contienen muchos antígenos de carbohidrato unido a N y O diferentes; ácido hialurónico (HA), que es un componente importante de la matriz extracelular; y suero en bruto, que contiene multitud de glicoproteínas. Cuando los sueros de vacuna se preadsorbieron en una suspensión de partículas de quitina o quitosana, o se incubaron con quitina/quitosana soluble, se inhibió drásticamente la unión al antígeno de quitina modificada (Ejemplo 5C y Figura 5C), lo que demuestra adicionalmente la especificidad de la respuesta de la vacuna. La purificación por afinidad de antígeno de los anticuerpos séricos inducidos por la vacuna muestra que la fracción específica de quitina es capaz de unirse a *C. albicans* enteros. Estos datos

proporcionan un ejemplo concreto de una vacuna dirigida hacia un componente conservado y esencial de la pared celular fúngica, especialmente, la quitina, que está presente en todos los hongos patógenos conocidos.

El análisis de la unión de anticuerpos inducidos por la vacuna de quitina modificada a células de levadura de *C. albicans* por citometría de flujo indica que los anticuerpos de quitina modificada tiñeron positivamente las células de *Candida* con aproximadamente el 25 % de la población viva unida a una dilución 1:10 (Ejemplo 6C y panel de la parte inferior de la Figura 8C), respaldando adicionalmente los datos de unión detallados en el Ejemplo 6. Los anticuerpos de laminarina (β -glucano) de título alto generados con un conjugado de laminarina-TT también tiñeron positivamente *C. albicans* (panel superior de la Figura 8C). Estos datos sugieren que ambos carbohidratos están expuestos en la superficie del hongo.

También se examinó por citometría de flujo la unión de anticuerpos de quitina modificada, así como de anticuerpos de beta-glucano en diversas etapas del crecimiento de *Candida* en cultivo. Se obtuvieron células de levadura (después de la incubación durante la noche a 300C) y formas de micelio (filamento) (después de la incubación a 370C durante 150 minutos y 300 minutos, respectivamente) por cultivo en medio de YPD que contenía suero (Figura 7A-C).

Los resultados de la tinción de citometría de flujo indican que la unión de los anticuerpos de laminarina inducidos por la vacuna contra las células de *Candida* es mayor en las células de levadura y disminuye a medida que las células se diferencian a las formas de filamento más virulentas del hongo (Figura 8D), mientras que la unión de los anticuerpos por la quitina modificada no se ve afectada por las etapas de diferenciación del hongo, lo que indica su expresión antigénica uniforme a lo largo del proceso invasivo (Figura 8E). Estos resultados son importantes para el desarrollo de una formulación de vacuna panfúngica eficaz, ya que enfatiza la necesidad de incorporar más de un componente de carbohidrato de la pared celular en la formulación de vacuna para una eficacia óptima a lo largo del proceso invasivo fúngico.

El análisis de la unión de anticuerpos inducidos por la vacuna de quitina modificada a células de levadura de *Cryptococcus neoformans* de tipo A (H99) por citometría de flujo indica que los anticuerpos de quitina modificada tiñeron positivamente las células criptocócicas con aproximadamente el 31 %, 47 % y 60 % de unión de la población viva a una dilución 1:10 con el 25 %, 75 % y 85 % de anticuerpos conjugados de quitina modificada-TT, respectivamente (Ejemplo 6 y panel inferior de la Figura 11), respaldando adicionalmente los datos de unión detallados en el Ejemplo 6. Los anticuerpos de laminarina (β -glucano) de título alto generados con un conjugado de laminarina-TT también tiñeron positivamente *Cryptococcus neoformans* (panel superior de la Figura 11). En cuanto a *Candida albicans* estos datos sugieren que ambos carbohidratos están expuestos en la superficie del hongo criptocócico.

En un ejemplo preliminar de protección frente a una exposición letal con un hongo patógeno, los ratones Balb/C y CD1 que recibieron una vacuna de un único componente de la pared celular que comprende un conjugado de quitina modificada-toxoide tetánico, mostraron protección parcial frente a una dosis letal del 100 % de *C. albicans* (Ejemplo 7 y Figuras 9A y 9B). En un experimento de exposición letal repetida, la misma vacuna de conjugado de quitina modificada-toxoide tetánico mostró una protección parcial similar frente a *C. albicans* vivos, aunque mayor protección que un conjugado de laminarina (β -glucano)-toxoides tetánico o un conjugado de quitohexaosa-toxoide tetánico (Figura 9B). Estos resultados se ampliarán y se examinarán realizaciones adicionales de la invención, tales como vacunas que comprenden múltiples componentes de la pared celular (Ejemplo 9 y Figura 8), para determinar su eficacia en modelos similares de exposición letal *in vivo* empleando, por ejemplo, *C. albicans*, *A. fumigatus* y *C. neoformans*.

El análisis de sueros humanos normales (NHS) para determinar la presencia de anticuerpos de quitina, quitina modificada y laminarina esbozados en el presente documento demuestra que estos anticuerpos se adquieren de forma natural y existen en individuos sanos (Figura 10). Los anticuerpos de quitina parecen estar presentes en niveles significativos (Figura 10A) y estos niveles son significativamente mayores que los de aquellos frente al β -glucano (Figura 10D). Es interesante indicar que los anticuerpos de quitina se dirigen hacia un epítipo conformacional constituido por al menos un sacárido de DP6 (Figura 10C). Estos resultados son importantes para el diseño de una vacuna a base de quitina porque sugieren que una vacuna conjugada óptima debería contener fragmentos de quitina de al menos 6 residuos de GlcNAc.

La vacuna producida como se esboza en la memoria descriptiva anterior se puede formular en un portador farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución salina normal u otro portador apropiado. De forma adicional, la vacuna puede incluir de manera óptima uno o más adyuvantes para aumentar la inmunogenicidad y/o la eficacia. Pueden añadirse adyuvantes directamente a las composiciones de vacuna o pueden administrarse por separado, ya sea simultáneamente o poco después de la administración de la vacuna. Sin limitación, los adyuvantes adecuados incluyen una diversidad de adyuvantes conocidos en la técnica, solos o en combinación. Son ejemplos no limitativos una sal de aluminio tal como el gel de hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio o alumbre, pero también puede serlo una sal de calcio, magnesio, hierro o cinc, o puede serlo una suspensión insoluble de tirosina acilada o azúcares acilados, sacáridos derivatizados catiónicamente o aniónicamente, o polifosfacenos. Los adyuvantes también pueden seleccionarse, por ejemplo, de una diversidad de emulsiones de aceite en agua, agonistas de receptores de tipo Toll, (por ejemplo, agonista de receptor 2 de tipo Toll, agonista de receptor 3 de tipo Toll, agonista de receptor 4 de tipo Toll, agonista de receptor 7 de tipo Toll, agonista de receptor 8 de tipo Toll y agonista de receptor 9 de tipo Toll), saponinas o combinaciones de los mismos.

Una composición de vacuna que produce una respuesta de anticuerpos productiva puede usarse de múltiples formas. Por ejemplo, la vacuna puede usarse para la inmunización directa de pacientes con riesgo de infección fúngica. Alternativamente,

los compuestos y composiciones de la presente invención pueden usarse para aislar o generar anticuerpos contra los compuestos de la invención. Pueden prepararse anticuerpos aislados, ya sea de naturaleza policlonal o monoclonal, usando métodos conocidos disponibles en la técnica. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden usarse para cribar bibliotecas de presentación en fagos de anticuerpos humanos, mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Como otro ejemplo, las composiciones descritas en el presente documento pueden usarse para desencadenar una respuesta de anticuerpos en un hospedador apropiado y los anticuerpos resultantes pueden inmortalizarse por tecnología de hibridomas, usando métodos conocidos bien establecidos en la técnica. En otro ejemplo no limitativo más, usando métodos conocidos en la técnica, los compuestos descritos en el presente documento pueden usarse para producir directamente anticuerpos humanos usando tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos. Cualquier anticuerpo producido de este modo puede usarse para conferir protección pasiva, ya sea para su uso profiláctico o terapéutico. Los ejemplos no limitativos para usos de estos anticuerpos aislados podrían incluir la protección directa contra enfermedades fúngicas a través de inmunoterapia, la terapia de combinación con agentes antifúngicos existentes o la preparación de inmunoconjugados, por ejemplo, la conjugación directa con agentes antifúngicos. Además, estos anticuerpos pueden usarse para desarrollar una plataforma de diagnóstico para la detección de infección fúngica en muestras de pacientes.

En vista del logro descrito en la producción de un antígeno de vacuna que desencadena respuestas específicas a componentes de la pared celular fúngica, cualquiera de las estrategias basadas en anticuerpos anteriores podría extenderse a fragmentos de anticuerpos o derivados de anticuerpos modificados genéticamente, que pueden incluir una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de anticuerpos, o uno o más fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo. Los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" incluyen, aunque no de forma limitativa, anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos camelizados, anticuerpos quiméricos, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, anticuerpos de dominio único, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), etc., y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores.

Una porción de la quitina presente en la pared celular fúngica es modificada por quitina desacetilasas para producir quitosana y existe evidencia de que puede ser necesaria una mezcla de polímeros de quitina/quitosana para la integridad y función adecuadas de la pared celular (19, 20). Los datos de RMN sobre los fragmentos de quitina modificada muestran algunos grupos amino libres residuales, lo que aumenta la posibilidad de que la vacuna pueda dirigirse tanto a la quitina pura como a las regiones que contienen quitosana en la pared celular quitinosa.

Además de la quitina, los polímeros de β -manano y β -glucano comprenden los constituyentes de carbohidratos fundamentales de la pared celular fúngica. Se ha demostrado que los anticuerpos inducidos por vacunas que se dirigen a carbohidratos específicos de β -manano o β -glucano confieren protección contra enfermedades fúngicas, mostrando tanto eficacia basada en la vacuna como protección pasiva (9-11). Hasta la fecha, la quitina no se ha examinado como diana de una vacuna antifúngica. *In vivo*, estos tres componentes de carbohidratos se entrecruzan covalentemente para formar la red de la pared celular (21, 22). Las formulaciones de vacunas que consisten en quitina modificada sola, o una combinación de dos o más de los epítopos de carbohidratos conservados de la pared celular fúngica, se contemplan para producir una respuesta de la vacuna ampliamente protectora. Una vacuna de combinación de este tipo podría diseñarse ya sea como una mezcla coadministrada o como una estructura base entrecruzada que imita mejor la topografía de la superficie de la pared celular fúngica. Se prevé que estas vacunas serán muy eficaces para inducir una respuesta inmunitaria panfúngica.

La invención se entenderá mejor por referencia a los siguientes ejemplos, que ilustran, pero no limitan, la invención descrita en el presente documento.

Ejemplos

Ejemplo 1: Re-N-acetilación/desaminación parcial de quitosana para producir fragmentos de quitina modificada:

- Se suspendieron 3 g de quitosana (16,8 mmol de GlcNH_2 ; n.º de cat. de Sigma 419419) en 150 ml de H_2O en un matraz de fondo redondo de 250 ml y se colocó en una placa de agitación.

- Se añadió anhídrido acético, 795 μl , 0,5 equivalentes, con respecto al número de grupos amino, a 15 ml de EtOH.

- La solución de anhídrido acético se añadió a la suspensión de quitosana en agitación, gota a gota, durante 30 minutos, a través de un embudo de adición. La reacción se volvió muy viscosa, pero todavía era posible agitar la mezcla de reacción.

- Se dejó que la reacción transcurriera durante otros 30 minutos a temperatura ambiente.

- Se añadieron 18 ml de ácido acético glacial a la mezcla de reacción, proporcionando un pH de ~ 3 .

- Se añadieron 6 ml de una solución acuosa al 5 % recién preparada de NaNO_2 a la reacción y la mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. La reacción liberó una cantidad sustancial de gas y se volvió mucho menos viscosa durante el curso de la reacción.

- La mezcla de reacción se neutralizó con 16,5 ml de NaOH 10 N.
- La muestra se dializó durante la noche, frente a 4 l de NaCl 1 M, en una membrana de diálisis con un corte de peso molecular de 7.000. La muestra se dializó adicionalmente frente a 4 cambios de 4 l de agua a temperatura ambiente.
- La mezcla de reacción se centrifugó durante 15 minutos a 4.000 RPM para retirar el material insoluble, después se filtró a través de filtros de jeringa de 0,45 µm.
- Se retiraron muestras para el análisis por HPLC y RMN.

Ejemplo 2: Preparación de conjugado de vacuna de quitina modificada-toxoide tetánico por aminación reductora:

- Se añadieron 5 mg de toxoide tetánico (TT, 3,3 ml de solución 3 mg/ml en solución salina; Sreum Staten Institute) a 50 mg de fragmentos de quitina modificada.
- Se dejó que la reacción de la base de Schiff transcurriera durante 6 horas a temperatura ambiente.
- Se añadió cianoborohidruro de sodio repurificado, 10 mg, en un volumen de 10 µl de H₂O a la mezcla de reacción. La reacción se dejó transcurrir a temperatura ambiente y se monitorizó después de uno y tres días mediante SDS-PAGE.
- Después de la reacción, la mezcla de quitina-TT se diluyó a ~2 ml con PBS y se dializó frente a 4 l de PBS. La muestra dializada se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm. El dializado final se cuantificó mediante ensayo de BCA y se analizó mediante SDS-PAGE y HPLC.

Ejemplo 3: Inmunización de ratones Balb/C con conjugado de vacuna de quitina modificada-TT:

Se recibieron 40 ratones Balb/C hembra y se alojaron con ciclos convencionales de día/noche con comida y agua, a demanda. Se dejó que los animales se aclimataran a la instalación durante un mínimo de una semana, después se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos y se inmunizaron de la siguiente manera:

1. Se suministró una emulsión de PBS en adyuvante completo de Freund (200 µl) mediante inyección intraperitoneal en 10 ratones el día 0. Los días 28 y 38, los animales recibieron inyecciones de PBS en adyuvante incompleto de Freund, suministradas de la misma manera.
2. Se inyectó conjugado quitina modificada-TT (25 µg de antígeno) en 10 ratones en forma de una emulsión en adyuvante completo de Freund (200 µl), mediante inyección intraperitoneal el Día 0. Los días 28 y 38, los animales recibieron inyecciones de refuerzo de Quitina-TT (25 µg) en adyuvante incompleto de Freund, suministradas de la misma manera que la inmunización primaria.
3. A los animales se les inyectó Quitina modificada-TT (50 µg), según el protocolo del Grupo 2.
4. A los animales se les inyectó Quitina modificada-TT (100 µg), según los Grupos 2 y 3.

* Se extrajo sangre de los ratones y se preparó suero los Días -4, 38 y 50 para evaluar las respuestas de anticuerpos específicos de quitina.

Se extrajo sangre de los animales y se preparó suero 4 días antes de la inyección inicial (Día de estudio -4), para determinar los títulos de anticuerpos en suero preinmune. Los ratones se inmunizaron el Día de estudio 0 según los grupos experimentales esbozados anteriormente. El antígeno de BPM de Quitina-TT se suspendió en PBS a concentraciones de 0,25, 0,5 y 1,0 mg/ml, se mezcló con adyuvante completo de Freund en una relación de 1:1 y se agitó con formación de vórtice durante 20 minutos para crear una emulsión. Se administraron 200 µl de emulsión que contenía control de PBS/Freund o los antígenos de prueba (concentración final de 0,125, 0,25 o 0,5 mg/ml para un total de 25, 50 o 100 µg de conjugado de proteína, respectivamente) mediante inyección intraperitoneal, como se indicó anteriormente, a cada ratón el Día 0. Para los refuerzos posteriores el Día 28 y el Día 38, el antígeno se preparó de manera similar en adyuvante incompleto de Freund y se administró de la misma manera. Se extrajo sangre de los animales inmunizados y se preparó suero el Día 38 y el Día 50 para evaluar las respuestas de anticuerpos.

Ejemplo 4: Ensayo para determinar la respuesta de anticuerpos de ratones Balb/C inmunizados con conjugado de vacuna de quitina modificada-TT:

- Se prepararon soluciones de 2 µg/ml de dos conjugados diferentes de Quitina modificada-albúmina sérica humana (HSA) en PBS.
- Se aplicaron como recubrimiento 100 µl de cada solución en la mitad de los pocillos de una placa de ensayo de 96 pocillos (1/2 placa para cada antígeno) y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente.

- Los pocillos se lavaron 3 veces con PBST, después se bloquearon durante 1 hora con BSA al 1 % en PBS.
- Los pocillos se lavaron 3 veces con PBST.
- 5 - Los sueros de ratón de Vacuna de quitina modificada se agruparon y se diluyeron 1:20 en PBS.
- Los grupos de tratamiento fueron los siguientes:
 1. PBS/Freund
 - 10 2. Quitina modificada-TT/Freund; 25 µg/ratón
 3. Quitina modificada-TT/Freund; 50 µg/ratón
 - 15 4. Quitina modificada-TT/Freund; 100 µg/ratón
- Se sembraron 200 µl de una dilución con factor de dilución de diez de cada muestra de suero agrupada en la primera columna de pocillos de la microplaca recubierta con quitina-HSA.
- 20 - Se realizó una serie de diluciones con factor de dilución de dos para un total de 12 concentraciones de suero diferentes, que variaban de 1:200 a 1:409.600.
- Las muestras se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 25 - La placa se lavó 3 veces con PBST, después se incubó 1 hora a TA con 100 µl de IgG anti-ratón (específica de la cadena γ)-HRP diluida 1:2500 en BSA al 1 %/PBST
- Los pocillos se lavaron 3 veces con PBST, después se incubaron con 100 µl de sustrato de TMB peroxidasa SureBlue Reserve durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 30 - La reacción se detuvo con 100 µl de HCl 1 N.
- La absorbancia se leyó en un lector de microplacas a 450 nm.
- 35 Ejemplo 5: Ensayo para determinar la especificidad de la respuesta de anticuerpos de ratones Balb/C inmunizados con conjugado de vacuna de quitina modificada-TT
- A. Inhibición de antígeno
- 40 - Se prepararon soluciones 2 µg/ml de conjugados de quitina modificada y HSA (lotes n.º 2 y n.º 3) en PBS.
- Se aplicaron como recubrimiento 100 µl de cada solución en la mitad de los pocillos de una placa de ensayo de 96 pocillos y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente.
- 45 - Los pocillos se lavaron 3 veces con PBST y se bloquearon 1 hora con BSA al 1 % en PBS.
- Los pocillos se lavaron 3 veces con PBST y se almacenaron secos a 4 °C hasta su uso.
- Se prepararon soluciones 2 mg/ml de GlcNAc, HA y fragmentos de quitina modificada en PBS y se
- 50 transfirieron 200 µl de cada solución a un conjunto de tubos de titulación.
- Se realizó una serie de diluciones con factor de dilución de dos en PBS para un total de 11 concentraciones diferentes de cada inhibidor, que variaban de 2 mg/ml a 1,95 µg/ml, así como un control sin inhibir (concentraciones finales de inhibidor de 1 mg/ml a 976 ng/ml).
- 55 - La muestra agrupada del grupo de tratamiento de Quitina modificada-TT/Freund (100 µg/ratón, Día 50 de extracción de sangre) se diluyó 20:000 veces en BSA al 1 %/PBST.
- Se transfirieron 100 µl de muestra de suero diluido a cada uno de los tubos de titulación (dilución final
- 60 40:000) y se incubaron con los inhibidores durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se transfirieron 100 µl de cada muestra de suero/inhibidor a la microplaca recubierta con Quitina modificada-HSA y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 65 - La placa se lavó 3 veces con PBST, después se incubó 1 hora a TA con 100 µl de IgG anti-ratón (específica de la cadena γ)-HRP diluida 1:2500 en BSA al 1 %/PBST

- Los pocillos se lavaron 3 veces con PBST, después se incubaron con 100 µl de sustrato de TMB peroxidasa SureBlue Reserve durante 5 minutos a temperatura ambiente.

5 - Se detuvo la reacción con 100 µl de HCl 1 N y se leyó la absorbancia en un lector de microplacas a 450 nm.

B. Controles de especificidad de reactividad de anticuerpos

10 - Se prepararon soluciones 2 µg/ml de los compuestos de prueba (serina-O-GlcNAc, ovoalbúmina, fetuína, ácido hialurónico (HA), suero bovino fetal) en PBS, con la excepción de FBS, que se preparó en forma de una solución al 10 % (v:v) en PBS.

15 - Se aplicaron como recubrimiento 100 µl de cada solución en los pocillos de una placa de ensayo de 96 pocillos. Los antígenos de prueba se incubaron en la placa durante la noche a 4 °C.

- Los pocillos se lavaron 3 veces con PBS y se bloquearon durante 1 hora con BSA al 1 % en PBS. Los pocillos se lavaron 3 veces con PBST y se almacenaron secos a 4 °C hasta su uso.

20 - Se agruparon sueros de ratón de Vacuna de quitina modificada por grupo de tratamiento y se diluyeron 1:20 en PBS. Los grupos de tratamiento fueron los siguientes:

1. PBS/Freund

25 2. Quitina modificada-TT/Freund; 25 µg/ratón

3. Quitina modificada-TT/Freund; 50 µg/ratón

4. Quitina modificada-TT/Freund; 100 µg/ratón

30 - Las muestras de suero agrupadas se diluyeron adicionalmente hasta una final de 1:20.000 veces en BSA al 1 %/PBST.

- Se transfirieron 100 µl de muestra de suero diluido de cada grupo por triplicado a los pocillos de la placa de ensayo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

35 - La placa se lavó 3 veces con PBST, después se incubó 1 hora a TA con 100 µl de IgG anti-ratón (específica de la cadena γ)-HRP diluida 1:2500 en BSA al 1 %/PBST

40 - Los pocillos se lavaron 3 veces con PBST, después se incubaron con 100 µl de sustrato de TMB peroxidasa SureBlue Reserve durante 5 minutos a temperatura ambiente.

- La reacción se detuvo con 100 µl de HCl 1 N.

45 - La absorbancia se leyó en un lector de placas a 450 nm.

- Téngase en cuenta que la respuesta de ELISA para todas las réplicas del Grupo 4 estuvo fuera del intervalo lineal. A estas muestras se les asignó arbitrariamente un valor de 3,0, que está cerca del límite de detección del lector de placas. Estos valores probablemente representan una subestimación.

50 C. Absorción e inhibición de quitina/quitosana

- Se prepararon soluciones 2 µg/ml de los compuestos de prueba (quitina modificada-HSA o HA de BPM-HSA) en PBS.

55 - Se aplicaron como recubrimiento 100 µl de cada solución en los pocillos de una placa de ensayo de 96 pocillos y se incubaron durante la noche a 4 °C.

- Los pocillos se lavaron 3 veces con PBST y se bloquearon durante 1 hora con BSA al 1 % en PBS.

60 - Los pocillos se lavaron 3 veces con PBST.

- Mientras tanto, los sueros de ratón de Vacuna de quitina modificada agrupados se diluyeron a una concentración final de 1:5000 en BSA al 1 %/PBS.

65 - Se diluyó MAb de HA n.º 2 a 1:2000 en BSA al 1 %/PBS.

- Se incubaron 5 ml de muestra de suero diluido o MAb de HA durante la noche en un rotador a 4 °C con 100 mg de quitina o quitosana (ambas preparadas como suspensiones insolubles).
 - Una fracción de suero diluido de vacuna de quitina n.º 1 o MAb de HA se apartó a 4 °C para que sirviera como control positivo y para mezclar con extractos de quitina/quitosana para el experimento de inhibición.
 - En paralelo, la quitina y la quitosana se incubaron con 5 ml de BSA al 1 %/PBS de la misma manera, para extraer quitina/quitosana soluble para la prueba de inhibición.
 - Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 4500 para separar por sedimentación la quitina y la quitosana insolubles.
 - Las fracciones sobrenadantes se retiraron a tubos nuevos y se diluyeron 4 veces (1:20.000 final para la Vacuna de quitina modificada y 1:8.000 para MAb de HA) en BSA al 1 %/PBS.
 - La muestra de suero de vacuna de Quitina modificada sin tratar y MAb de HA sin tratar también se diluyeron a concentraciones finales equivalentes en BSA al 1 %/PBS (100 µl de Ab o suero + 300 µl de BSA/PBS)
 - Para las pruebas de inhibición, se diluyeron soluciones de anticuerpos o suero sin tratar 4 veces con extracto quitina o quitosana a concentraciones finales equivalentes (1:20.000 final para la Vacuna de quitina modificada y 1:8.000 para MAb de HA). Las soluciones se preincubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la adición a la placa de ELISA.
 - Se añadieron 100 µl de cada muestra, por triplicado, a tiras de ELISA recubiertas con Quitina modificada-HSA o HA de BPM-HSA, según correspondiera.
 - Las muestras se incubaron en las tiras durante una hora a temperatura ambiente.
 - Las tiras se lavaron 3 veces con PBST, después se incubaron 1 hora a TA con 100 µl de IgG anti-ratón (específica de la cadena γ)-HRP diluida 1:2500 en BSA al 1 %/PBST.
 - Los pocillos se lavaron 3 veces con PBST, después se incubaron con 100 µl de sustrato de TMB peroxidasa SureBlue Reserve durante 5 minutos a temperatura ambiente.
 - La reacción se detuvo con 100 µl de HCl 1 N.
 - Las muestras de ELISA de HA desarrollaron color muy rápidamente, por lo que la reacción se detuvo en ~ 1 minuto. De la misma manera, el control positivo en las muestras de Vacuna de quitina modificada se desarrolló rápidamente, por lo que la reacción terminó después de 2 minutos.
 - La absorbancia se leyó en un lector de microplacas a 450 nm.
- Ejemplo 6: Ensayos para determinar la inmunorreactividad de anticuerpos séricos de ratones Balb/C inmunizados con vacuna de quitina modificada-TT hacia células enteras de *C. albicans*
- A. Unión de suero entero a células de *C. albicans*
- Se seleccionó una única colonia de *C. albicans* de una placa de agar dextrosa Saboraud y se usó para inocular 2 ml de medio de crecimiento de YPD. El cultivo se cultivó durante la noche a 30 °C, con agitación a 250 RPM.
 - Se añadieron 100 µl de una suspensión de 5×10^6 células/ml en cada pocillo de una microplaca Strip Well modificada en superficie de amina. Las células se dejaron reposar durante una hora a temperatura ambiente.
 - Se añadieron 100 µl de una solución al 2 % de glutaraldehído en PBS a cada pocillo.
 - Se dejó que las células se entrecruzaran durante la noche a temperatura ambiente.
 - El fijador se aspiró y los pocillos se lavaron 3 veces con PBST.
 - Los pocillos se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con BSA al 1 % en PBS.
 - Mientras tanto, los sueros de ratón de Vacuna de quitina modificada agrupados se diluyeron a una concentración de 1:20.000 en BSA al 1 %/PBS.
 - Se distribuyeron 100 µl de soluciones 2 mg/ml de quitina modificada o PBS, por triplicado, en tubos de titulación.

- Para las pruebas de inhibición, se añadieron 100 µl de suero a los tubos que contenían los inhibidores (1:40.000 final para las muestras de suero de la Vacuna de quitina modificada y 1 mg/ml para los inhibidores). Las soluciones se preincubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la adición a la placa de ELISA.

5 - Se añadieron 100 µl de cada muestra a la placa Stripwell recubierta con *C. albicans*. Las muestras se incubaron durante una hora a temperatura ambiente.

10 - Las tiras se lavaron 3 veces con PBST, después se incubaron 1 hora a TA con 100 µl de IgG anti-ratón (específica de la cadena γ)-HRP diluida 1:2500 en BSA al 1 %/PBST.

- Los pocillos se lavaron 3 veces con PBST, después se incubaron con 100 µl de sustrato de TMB peroxidasa SureBlue Reserve a temperatura ambiente.

15 - La reacción se detuvo después de dos minutos con 100 µl de HCl 1 N.

- La absorbancia se leyó en un lector de placas a 450 nm.

B. Unión de anticuerpos reactivos a quitina modificada purificados por afinidad contra *C. albicans*

20 - Se disolvieron 20 mg de quitina modificada y HA oxidado con peryodato en 2 ml de NaPO₄ 20 mM, pH 7,5. Se requirió HA oxidado durante la noche a temperatura ambiente para disolverse.

25 - Se lavó el gel de hidrazida UltraLink (4 ml de suspensión, 2 ml de resina sedimentada) con 5 volúmenes de NaPO₄ 20 mM, pH 7,5.

- Los sacáridos disueltos se añadieron a la resina lavada y se dejaron reaccionar durante 24 horas a temperatura ambiente.

30 - El material sin unir se drenó y las resinas se lavaron con lo siguiente:

1. 20 volúmenes de columna de NaPO₄ 20 mM, pH 7,5

2. 5 volúmenes de columna de 10× PBS.

35 3. 10 volúmenes de columna de 1× PBS.

- Se diluyeron sueros de ratón de la vacuna de quitina modificada combinados (del grupo de control con PBS y 100 µg del grupo inmunizado con quitina modificada-TT) a una concentración inicial de 1:40 en BSA al 1 %/PBS

40 - Se lavaron 100 µl (200 µl de suspensión) de Quitina modificada y geles de hidrazida UltraLink de HA oxidado con 500 µl de PBS en una microcolumna de centrifugación.

- Se mezclaron 200 µl de cada suero y las resinas de afinidad y se incubaron durante 1 hora a TA.

45 - El material no unido se retiró por centrifugación durante 30 segundos a 8500 RPM.

- Las resinas se lavaron 3 x con 500 µl de PBST.

50 - Se añadieron 200 µl de glicina 0,2 M, pH 2,8 a cada resina y se dejaron interactuar durante ~ 3 min.

- La proteína eluida se recogió por centrifugación directamente en un tubo que contenía 50 µl de Tris 1 M, pH 8.

55 - Se seleccionó una única colonia de *C. albicans* de una placa de agar dextrosa Sabouraud y se usó para inocular 2 ml de medio de crecimiento de YPD y el cultivo se cultivó durante la noche a 30 °C, con agitación a 250 RPM.

- Se añadieron 100 µl de suspensión de 1×10⁷ células/ml en cada pocillo de una microplaca Strip Well modificada en superficie de amina. Las células se dejaron reposar durante 2 horas a temperatura ambiente.

60 - Se añadieron 100 µl de una solución al 2 % de glutaraldehído en PBS a cada pocillo.

- Se dejó que las células se entrecruzaran durante una hora a temperatura ambiente.

- El fijador se aspiró con cuidado y los pocillos se lavaron 3 veces con PBST.

65 - Los pocillos se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con BSA al 1 % en PBS.

- Los anticuerpos purificados por afinidad de antígeno se diluyeron 1:1.000 con BSA al 1 % en PBS.
- Se preparó una serie de diluciones con factor de dilución de 2 en tubos de titulación.
- 5 - Se añadieron 100 µl de las diluciones de anticuerpos por triplicado a la placa recubierta con *C. albicans*.
- Las muestras se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente.
- La placa se lavó 3 veces con PBST, después se incubó 1 hora a TA con 100 µl de anti-IgG de ratón (específica de cadena γ)-HRP, diluida 1:2500 en BSA al 1 %/PBST.
- 10 - Los pocillos se lavaron 3 veces con PBST, después se incubaron con 100 µl de sustrato de TMB peroxidasa SureBlue Reserve durante 5 minutos, a temperatura ambiente.
- 15 - La reacción se detuvo con 100 µl de HCl 1 N.
- La absorbancia se leyó en un lector de placas a 450 nm.

C. Unión de anticuerpos inducidos por vacuna contra *Candida albicans* por citometría de flujo:

Células de Candida: Usando un asa estéril, se sembraron *C. albicans* de solución madre congelada en una placa de SDA y se incubaron a 30 °C. Se seleccionó una única colonia de la placa de SDA usando un asa de inoculación y se inoculó en un matraz de 250 ml que contenía 50 ml de YPD, y se incubó a 30 °C con agitación a 150 rpm durante al menos 18 h. Para los experimentos en los que se usó la etapa de micelio de *Candida*, las células se incubaron a 37 °C durante 150 minutos y 300 minutos en suero que contenía YPD después de la incubación durante la noche para inducir y favorecer la diferenciación en la etapa de micelio de *Candida*. El cultivo durante la noche se transfirió a un tubo de 50 ml y se centrifugó a 1000 g durante 20 minutos y el sedimento se lavó con 2 ml de solución de PBS al menos 3 veces. El sedimento se resuspendió en 2 ml de PBS y la concentración se ajustó a 0,1 DO600 (4 x 10⁶/ml).

Células criptocócicas: Crecimiento fúngico-La siembra por estrías a partir de solución madre durante la noche se realizó usando un asa estéril y sembrando por estrías la solución madre congelada de cepa *Cryptococcus neoformans* de tipo A hasta aislamiento en una placa de SDA y se incubó a 30 °C. Se seleccionó una única colonia de la placa de SDA usando un asa de inoculación y se inoculó en un matraz de 250 ml que contenía 50 ml de YPD y se incubó a 30 °C con agitación a 150 rpm durante al menos 18 h. Para los experimentos en los que se usó la etapa de micelio de *Cryptococcus*, las células se incubaron a 37 °C durante 150 minutos y 300 minutos en suero que contenía YPD después de la incubación durante la noche para inducir y favorecer la diferenciación en la etapa de micelio de *Candida*. El cultivo durante la noche se transfirió a un tubo de 50 ml y se centrifugó a 1000 g durante 20 minutos y el sedimento se lavó con 2 ml de solución de PBS al menos 3 veces. El sedimento se resuspendió en 2 ml de PBS y la concentración se ajustó a una lectura de 1,0 DO600 (4x10⁷/ml).

Sueros y Anticuerpos: Se diluyeron sueros de ratones de diversos grupos de vacunas en 1:10, 1:50 y 1:100 en PBS y se usaron en un volumen de 15 µl/tubo. Los anticuerpos de control se diluyeron como: mAb de ratón contra *Candida*, diluciones 1:5, 1:10 y 1:20; Para pAb de conejo contra *Candida*, diluciones 1:50, 1:100 y 1:200 y se usa a un volumen de 20 µl/tubo. Se diluyeron anticuerpos secundarios marcados por FITC 1:25 en PBS y se usaron a 15 µl/tubo. Se usó yoduro de propidio a 1:2 en PBS (5 µl/tubo).

Citometría de flujo: Se transfirieron aproximadamente 100 µl de células fúngicas a los tubos y se añadieron suero y anticuerpos apropiados y se incubaron en hielo durante 60 minutos. Después, las células se lavaron 2 veces con 1 ml de PBS (centrifugando a 1000 g durante 10 min a 40 °C, decantando el sobrenadante) seguido de incubación con anticuerpo secundario durante 30 min en hielo protegido de la luz.

Se añadió yoduro de propidio diluido (sin lavado) y las células se incubaron durante 10 minutos adicionales en hielo seguido de 2 lavados con PBS y finalmente se fijaron en 200 µl de paraformaldehído al 1 %. Después, los datos se adquirieron en un instrumento FACS Calibur.

Ejemplo 7: La vacuna de quitina modificada-TT confiere protección frente a una exposición letal de hongo patógeno *C. albicans*

A. Inmunización de ratones Balb/C con vacuna de quitina modificada-TT y ratones CD1 con conjugados de Quiitoheaosa-TT y Laminarina-TT.

- Se recibieron 40 ratones hembra y se alojaron con ciclos convencionales de día/noche con comida y agua, a demanda. Se dejó que los animales se aclimataran a la instalación durante un mínimo de una semana, después se dividieron aleatoriamente en dos grupos y se inmunizaron de la siguiente manera:

- Inicialmente, los ratones BalB/c se dividieron en dos grupos, n = 20 ratones/grupo:

1. PBS/Freund; 200 µl/ratón; inyección intraperitoneal
 2. Quitina mod-TT/Freund; 200 µl/ratón; i.p.; 100 µg/ratón
- 5 - Para los animales de control con inmunización simulada, se suministró una emulsión de PBS en adyuvante completo de Freund (200 µl) mediante inyección intraperitoneal en 20 ratones el día 0. Los días 28 y 38, los animales recibieron inyecciones de PBS en adyuvante incompleto de Freund, suministradas de la misma manera como inmunización primaria.
- 10 - Para el grupo de vacunación, se suministró conjugado de Quitina modificada-TT (100 µg de antígeno, en forma de una emulsión en Adyuvante completo de Freund) mediante inyección intraperitoneal en 20 ratones (200 µl), el Día 0. Los días 28 y 38, los animales recibieron inyecciones de refuerzo de Quitina-TT (50 µg) en adyuvante de Freund incompleto, suministradas de la misma manera que la inmunización primaria.
- 15 - Se extrajo sangre de los ratones y se preparó suero los Días -4, 38, 50 y 62 para la evaluación de las respuestas de anticuerpos.
- Se usó el mismo protocolo para inmunizar ratones CD1 con quitina modificada-TT; Conjugados de laminarina-TT y quitohexaosa-TT
- 20 B. Exposición de ratones Balb/C y CD1 inmunizados con vacuna de quitina-TT con una dosis letal de *C. albicans*
- Los animales de cada uno de los grupos de inmunización anteriores se dividieron aleatoriamente en tres grupos de diez para cada cohorte de inmunización y se inocularon con células de *C. albicans*, como sigue.
- 25 Grupos experimentales: n = 10 ratones/grupo, divididos aleatoriamente en grupos
- Los grupos 1 y 2 comprenden animales de animales inmunizados con PBS (simulación)
- 30 1. Solución salina; 200 µl/ratón; inyección en la vena de la cola
2. 5×10^6 *C. albicans*; 200 µl de $2,5 \times 10^7$ UFC/ml; inyección en la vena de la cola Los grupos 3 y 4 comprenden animales de animales inmunizados con quitina modificada y TT
- 35 3. Solución salina; 200 µl/ratón; inyección en la vena de la cola
4. 5×10^6 *C. albicans*; 200 µl de $2,5 \times 10^7$ UFC/ml; inyección en la vena de la cola Ratones de monitorización:
- 40 1. Los ratones se comprobaron a diario para determinar la mortalidad y los signos de malestar:
- Disminución del consumo de alimento y agua, pérdida de peso, aislamiento/ocultamiento autoimpuesto, respiración rápida, respiración con la boca abierta, aumento/disminución del movimiento, postura/posicionamiento anormal, deshidratación, espasmos, temblor y temblores.
- 45 2. Los ratones que mostraban signos de malestar acompañados de cualquiera de los siguientes se definieron como moribundos: dificultad para caminar (incapaz de alcanzar comida y agua), evidencia de atrofia muscular o signos de emaciación, letargo (somnolencia, aversión a la actividad, falta de alerta física o mental), anorexia prolongada, dificultad para respirar y alteraciones neurológicas. Los ratones se sacrificaron cuando parecían moribundos y la muerte parecía inminente. La fecha de la muerte se registró como el día siguiente.
- 50 Ejemplo 8: Detección y caracterización de anticuerpos de Quitina y β-glucano en sueros humanos normales
- Se prepararon soluciones 2 µg/ml de diferentes conjugados de albúmina sérica humana (HSA) (quitina modificada, quitohexaosa y laminarina) en PBS.
- 55 - Se aplicaron como recubrimiento 100 µl de cada solución en la mitad de los pocillos de una placa de ensayo de 96 pocillos (1/2 placa para cada antígeno) y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente.
- Los pocillos se lavaron 3 veces con PBST, después se bloquearon durante 1 hora con BSA al 1 % en PBS.
- 60 - Los pocillos se lavaron 3 veces con PBST.
- Sueros humanos normales diluidos 1:20 en PBS.
- 65 - Se sembraron 200 µl de una dilución con factor de dilución de diez de cada muestra de suero agrupada en la primera columna de pocillos de la microplaca recubierta con diversos conjugados de HSA.

- Se realizó una serie de diluciones con factor de dilución de dos para un total de 12 concentraciones de suero diferentes, que variaban de 1:200 a 1:409.600.

5 - Las muestras se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente.

- La placa se lavó 3 veces con PBST, después se incubó 1 hora a TA con 100 µl de anti-IgG humana (específica de la cadena γ)-HRP diluida 1:2500 en BSA al 1 %/PBST

10 - Los pocillos se lavaron 3 veces con PBST, después se incubaron con 100 µl de sustrato de TMB peroxidasa SureBlue Reserve durante 5 minutos a temperatura ambiente.

- La reacción se detuvo con 100 µl de HCl 1 N.

15 - La absorbancia se leyó en un lector de microplacas a 450 nm.

Ejemplo 9: Preparación de una vacuna de toxoide tetánico de conjugado de β1,3 glucano/quitina.

20 Lo que sigue es un ejemplo de uno de varios métodos previstos para preparar una vacuna fúngica de combinación que comprende dos o más componentes conservados de la pared celular fúngica. En este ejemplo, la laminarina (polímero lineal no ramificado de β-1,3 glucano) se redujo y se oxidó con peryodato de sodio, después se conjugó directamente con quitosana a través de aminación reductora y, por último, los carbohidratos entrecruzados se conjugaron con toxoide tetánico.

25 - La laminarina se redujo con borohidruro de sodio y, posteriormente, se oxidó con metaperyodato de sodio mediante métodos convencionales.

- Se disolvieron 100 mg de laminarina oxidada en PBS (varios minutos a 37 °C para disolverla) y se mezclaron con quitosana de bajo peso molecular en una relación 1:5. La quitosana permaneció en forma de una suspensión insoluble.

30 - La reacción se colocó en una incubadora con agitación a 37 °C durante 24 horas.

- Se añadieron 20 mg de NaCNBH₃ y la reacción continuó otras 24 horas a 37 °C.

35 - La suspensión de reacción se transfirió a una columna de plástico desechable y el material insoluble se lavó abundantemente con H₂O para retirar cualquier laminarina residual sin reaccionar.

- El material insoluble lavado se resuspendió en 5 ml de ácido acético acuoso al 10 %

40 - Se añadió 1 ml de nitrito de sodio acuoso recién preparado y se dejó que la reacción transcurriera durante 60 minutos a temperatura ambiente. La mayor parte del material insoluble entró en solución durante el transcurso de la reacción.

45 - La mezcla de reacción se centrifugó 5 minutos a 4500 xG para retirar el material insoluble restante. La fracción soluble se procesó adicionalmente como se describe a continuación.

- La fracción soluble se diluyó a 15 ml, en una concentración final de NaCl 1 M y se dializó frente a 4 cambios de 4 litros de H₂O. El material dializado se liofilizó para proporcionar un polvo de color blanco esponjoso, con un rendimiento total de 90 mg.

50 - El polisacárido conjugado se analizó mediante SEC HPLC y la presencia de quitina y β-glucano en el producto se confirmó mediante RMN ¹H.

- Se añadieron 10 mg de toxoide tetánico (TT, 3,3 ml de una solución 3 mg/ml en solución salina) a 40 mg del conjugado de laminarina-quitina.

55 - Se añadió una alícuota de 2 µl de la muestra a 98 µl de tampón de muestra de LDS 1X + 5 µl de DTT 1 M para el análisis por SDS-PAGE.

- Se añadieron otros 2 µl de muestra a 98 µl de PBS 1X para el análisis por HPLC.

60 - La solución se dejó reaccionar durante 24 horas a 37 °C en una incubadora con agitación (300 RPM).

- Se añadió directamente a la reacción cianoborohidruro de sodio repurificado, 40 mg. Las reacciones se dejaron transcurrir durante 24 horas a 37 °C en una incubadora con agitación (300 RPM).

65

- Después de la reacción, la reacción de conjugación se concentró a ~2,5 ml en un dispositivo de ultrafiltración Amicon con una membrana de 10.000 CPM. La muestra se dializó frente a 3 intercambios de 4 l de PBS. El dializado final se cuantificó mediante ensayo de BCA y se analizó mediante SDS-PAGE y SEC HPLC. Después de que las muestras se ajustaran a una concentración de 1 mg/ml, se esterizaron por filtración a través de un filtro de 0,22 micrómetros.

Referencias bibliográficas

1. De Jonge R, van Esse HP, Kombrink A, Shinya T, Desaki Y, Bours R, van der Krol S, Shibuya N, Joosten MH, Thomma BP. 2010. Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science* 329: 953-5
2. Lee CG. 2009. Chitin, chitinases and chitinase-like proteins in allergic inflammation and tissue remodeling. *Yonsei Med J* 50: 22-30
3. Cutler JE, Deepe GS, Jr., Klein BS. 2007. Advances in combating fungal diseases: vaccines on the threshold. *Nat Rev Microbiol* 5: 13-28
4. Ostrosky-Zeichner L, Casadevall A, Galgiani JN, Odds FC, Rex JH. 2010. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 9: 719-27
5. Pfaller MA, Diekema DJ. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20: 133-63
6. Casadevall A, Pirofski LA. 2007. Antibody-mediated protection through cross-reactivity introduces a fungal heresy into immunological dogma. *Infect Immun* 75: 5074-8
7. Spellberg B. 2007. Prospects for and barriers to a fungal vaccine. *Expert Opin Biol Ther* 7: 1785-8
8. Cassone A, Torosantucci A. 2006. Opportunistic fungi and fungal infections: the challenge of a single, general antifungal vaccine. *Expert Rev Vaccines* 5: 859-67
9. 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. 2005. A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *J Exp Med* 202: 597-606
10. Xin H, Dziadek S, Bundle DR, Cutler JE. 2008. Synthetic glycopeptide vaccines combining beta-mannan and peptide epitopes induce protection against candidiasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 13526-31
11. Han Y, Cutler JE. 1995. Antibody response that protects against disseminated candidiasis. *Infect Immun* 63: 2714-9
12. Rachini A, Pietrella D, Lupo P, Torosantucci A, Chiani P, Bromuro C, Proietti C, Bistoni F, Cassone A, Vecchiarelli A. 2007. An anti-beta-glucan monoclonal antibody inhibits growth and capsule formation of *Cryptococcus neoformans* in vitro and exerts therapeutic, anticryptococcal activity in vivo. *Infect Immun* 75: 5085-94
13. Torosantucci A, Chiani P, Bromuro C, De Bernardis F, Palma AS, Liu Y, Mignogna G, Maras B, Colone M, Stringaro A, Zamboni S, Feizi T, Cassone A. 2009. Protection by anti-beta-glucan antibodies is associated with restricted beta-1,3 glucan binding specificity and inhibition of fungal growth and adherence. *PLoS One* 4: e5392
14. Bromuro C, Torosantucci A, Chiani P, Conti S, Polonelli L, Cassone A. 2002. Interplay between protective and inhibitory antibodies dictates the outcome of experimentally disseminated Candidiasis in recipients of a *Candida albicans* vaccine. *Infect Immun* 70: 5462-70
15. Bredehorst R, Pomato N, Scheel O, Thiem J. 1998. *Patente de los EE. UU. N. ° US-5705634A*
16. Nakao E. 1994. *Patente N. ° US-5312908*
17. Nishimura T, Eto E, Yamad T. 1989. *Patente N. ° US-4804750A*
18. Gislason J, Einarsson JM, How NC, Bahrke S. 2009. *Patente N. ° US-20090281058A1*
19. Lenardon MD, Munro CA, Gow NA. 2010. Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 13: 416-23
20. Baker LG, Specht CA, Donlin MJ, Lodge JK. 2007. Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 6: 855-67
21. Latge JP. 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol* 66: 279-90

22. Levitz SM. 2010. Innate recognition of fungal cell walls. *PLoS Pathog* 6: e1000758
23. Nitz M, Bundle D.R. 2001. J. Synthesis of Di- to Hexasaccharide 1,2-Linked - Mannopyranan Oligomers, a
5 Terminal S-Linked Tetrasaccharide Congener and the Corresponding BSA Glycoconjugates *J Org Chem* 66: 8411-
2324. Antinori S, 2013. New Insights into HIV/AIDS-Associated Cryptococcosis. ISRN AIDS 471363
25. Rappleye CA, Eissenberg LG, Goldman WE. 2007. Histoplasma capsulatum alpha-(1,3)-glucan blocks
10 innate immune recognition by the beta-glucan receptor. PNAS. 104(4):1366-70
26. Fujikawa T. y col. 2012. Surface alpha 1,3-Glucan Facilitates Fungal Stealth Infection by Interfering with
Innate Immunity in Plants *PLOS Pathogens* 8:| e1002882
27. Reese, A. J.y col. 2007. Loss of cell wall alpha (1-3) glucan affects *Cryptococcus neoformans* from
15 ultrastructure to virulence. *Mol. Microbiol.* 63, 1385-1398.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto formado por la conjugación de
5 uno o más restos de polisacárido, cada uno representado independientemente por la fórmula $\beta(1\rightarrow4)\text{-[GlcNH-R]}_n\text{-2,5-anhidromanosa}$, en donde n es un número entero positivo de 3 a 50, R es H o un grupo acilo, y el uno o más restos de polisacárido son polímeros mixtos de quitina/quitosana,
10 con una proteína portadora inmunogénica unida covalentemente a uno o más restos de polisacárido directamente en el grupo anhidromanosa de cada uno de los restos de polisacárido.
2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde:
15 n es un número entero positivo de 6 a 50; o
al menos el 30 % de los grupos acilo en el compuesto son acetilo.
3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde la proteína portadora inmunogénica se selecciona del grupo que consiste en toxoide tetánico, toxoide diftérico y un factor de virulencia de proteína fúngica.
- 20 4. El compuesto de la reivindicación 1, que comprende además uno o más epítomos de β -manano o glucano lineales unidos covalentemente a la proteína portadora inmunogénica.
5. El compuesto de la reivindicación 4, en donde el β -manano es un tetrasacárido de β -1,2-manosa.
- 25 6. El compuesto de la reivindicación 4, en donde uno o más epítomos de glucano es un epítomo de α -1,3-glucano lineal.
7. El compuesto de la reivindicación 4, en donde uno o más epítomos de glucano es un epítomo de β -1,3-glucano lineal.
- 30 8. Una composición que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde:
para al menos el 80 % de las moléculas del compuesto en la composición n tiene un valor de 6 a 50; o
35 el valor medio de n es de 10 a 50.
9. Un compuesto o composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en un método para inmunizar a un sujeto mamífero contra un patógeno fúngico, que comprende administrar al sujeto una
40 cantidad inmunogénica del compuesto o composición.
10. El compuesto o composición para su uso según la reivindicación 9, en donde el sujeto es un sujeto humano.

**Re-N-acetilación parcial de quitosana seguida de desaminación
nitrosa para producir fragmentos de quitina modificada
(reacción en una sola etapa)**

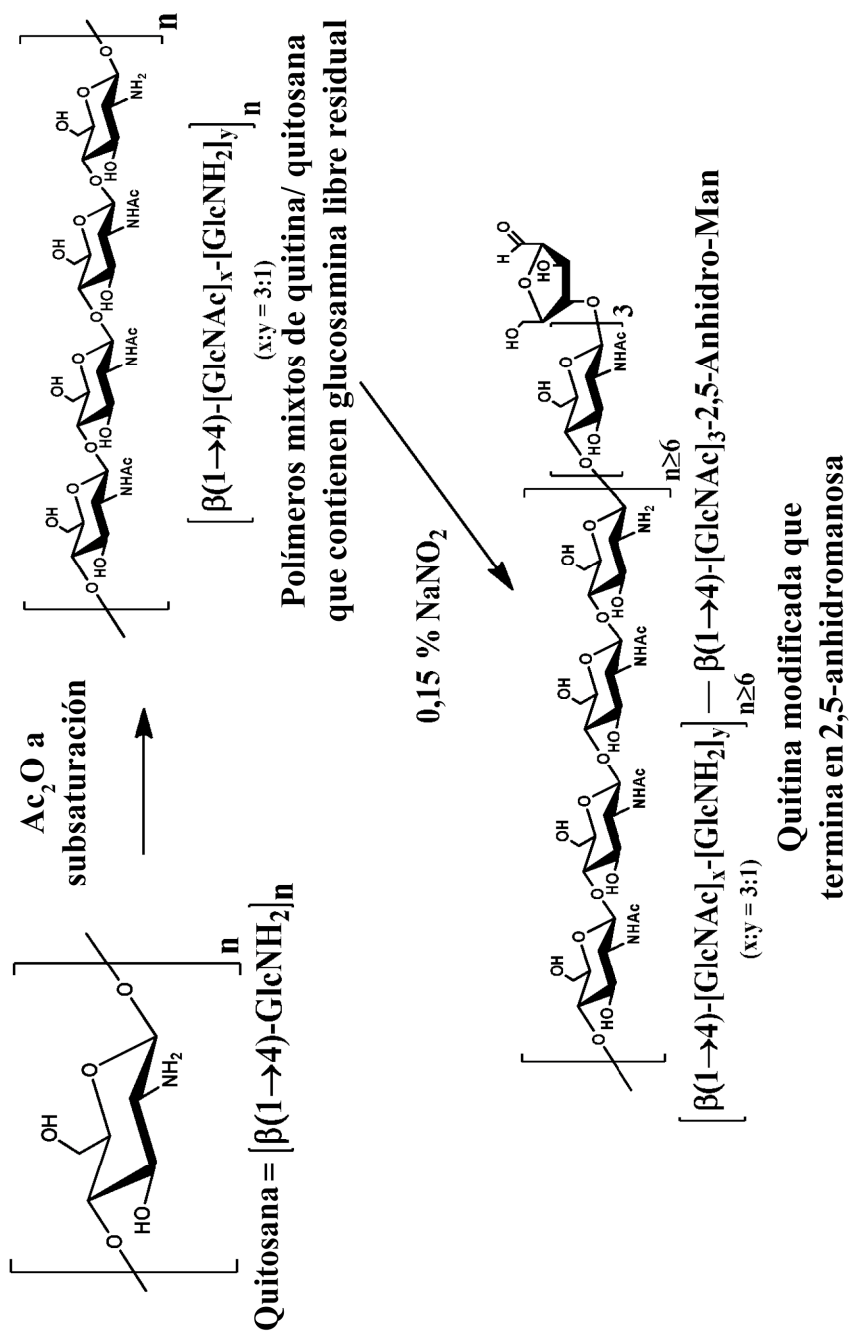


Figura 1

Conjugación de fragmentos de quitina
modificada con toxoide tetánico

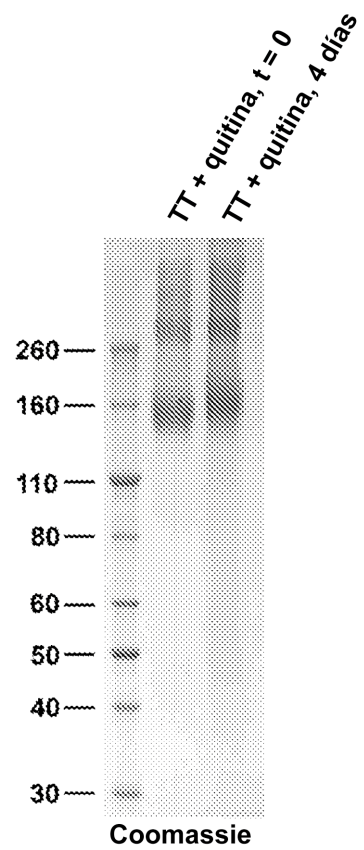


Figura 2

Programa de inmunización:

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Día -4	Recoger suero preinmune de cada grupo			
Día 0	PBS + Adyuvante completo de Freund (CFA) i.p. 200 µl	Conjugado de quitina modificada-TT + CFA 25 µg/inyección i.p. 200 µl	Conjugado de quitina modificada-TT + CFA 50 µg/inyección i.p. 200 µl	Conjugado de quitina modificada-TT + CFA 100 µg/inyección i.p. 200 µl
Día 28	PBS + Adyuvante incompleto de Freund (IFA) i.p. 200 µl	Conjugado de quitina modificada-TT + IFA 25 µg/inyección i.p. 200 µl	Conjugado de quitina modificada-TT + IFA 50 µg/inyección i.p. 200 µl	Conjugado de quitina modificada-TT + IFA 100 µg/inyección i.p. 200 µl
Día 38	Recoger suero de cada grupo			
	PBS + Adyuvante incompleto de Freund (IFA) i.p. 200 µl	Conjugado de quitina modificada-TT + IFA 25 µg/inyección i.p. 200 µl	Conjugado de quitina modificada-TT + IFA 50 µg/inyección i.p. 200 µl	Conjugado de quitina modificada-TT + IFA 100 µg/inyección i.p. 200 µl
Día 50	Recoger suero de cada grupo			

Figura 3

ELISA de vacuna de quitina modificada, antígeno de cribado del día 50: Quitina modificada-HSA

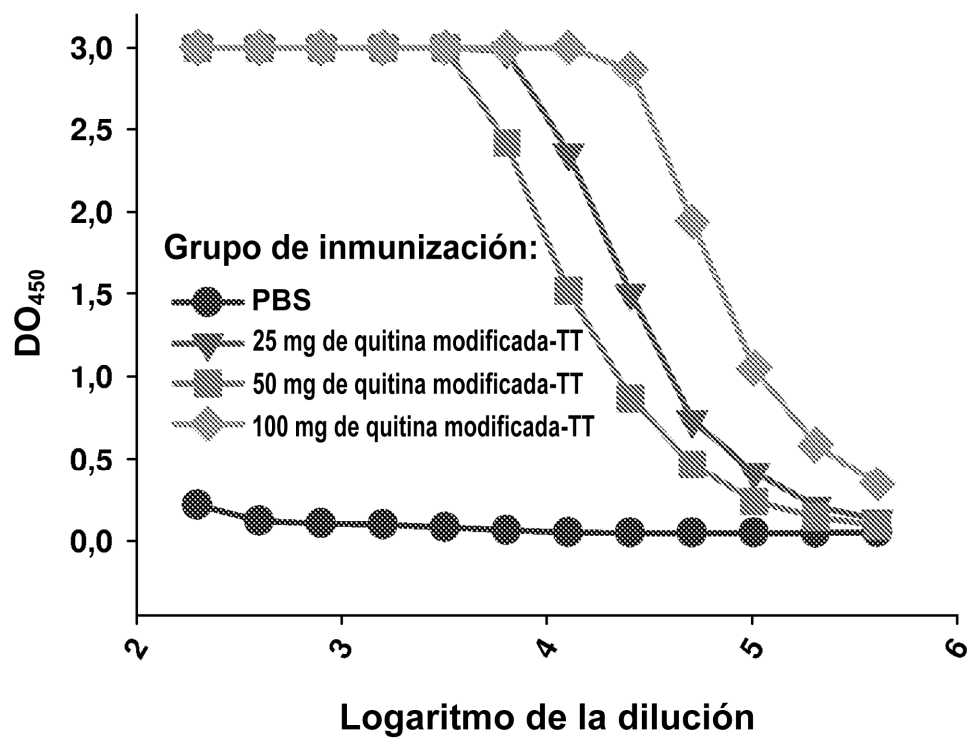


Figura 4

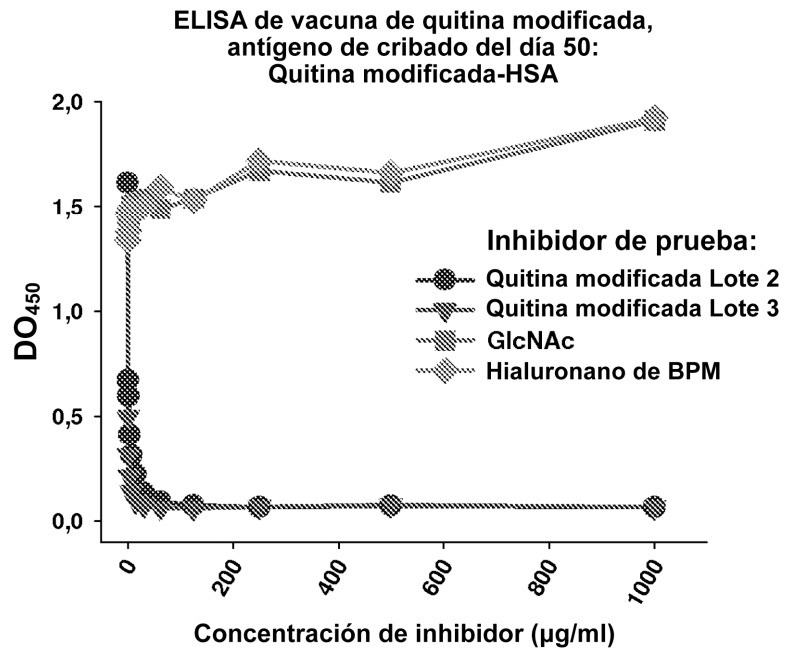


Figura 5A

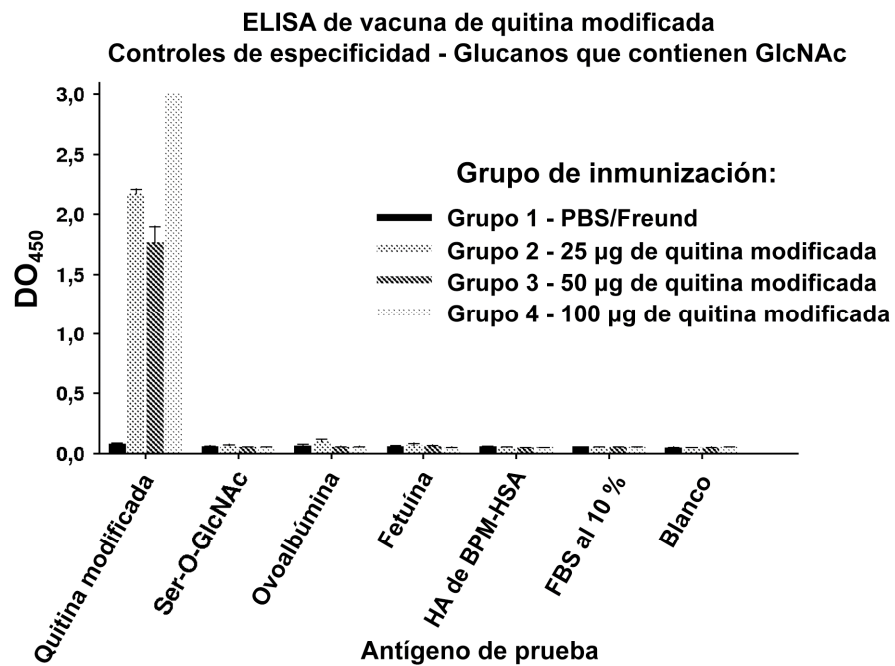


Figura 5B

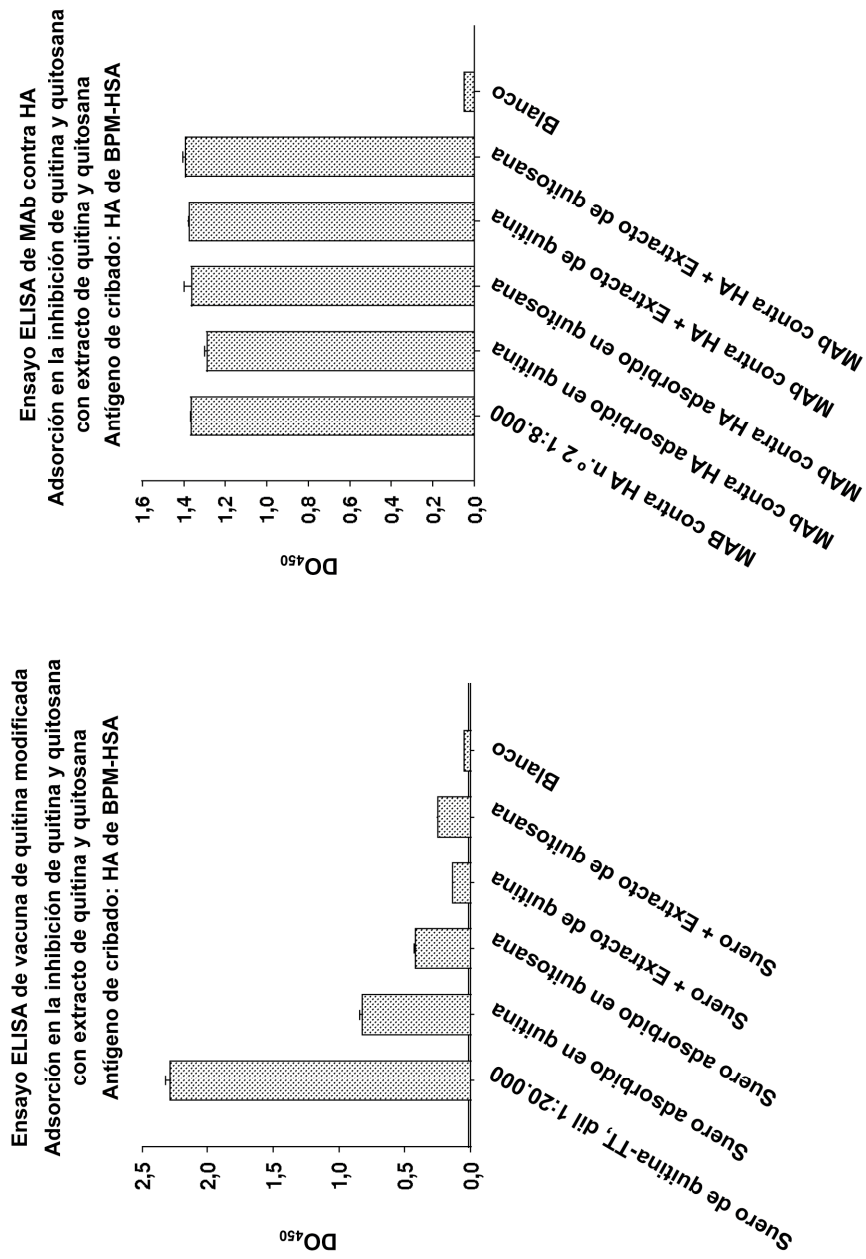


Figura 5C (izquierda)

Figura 5C (derecha)

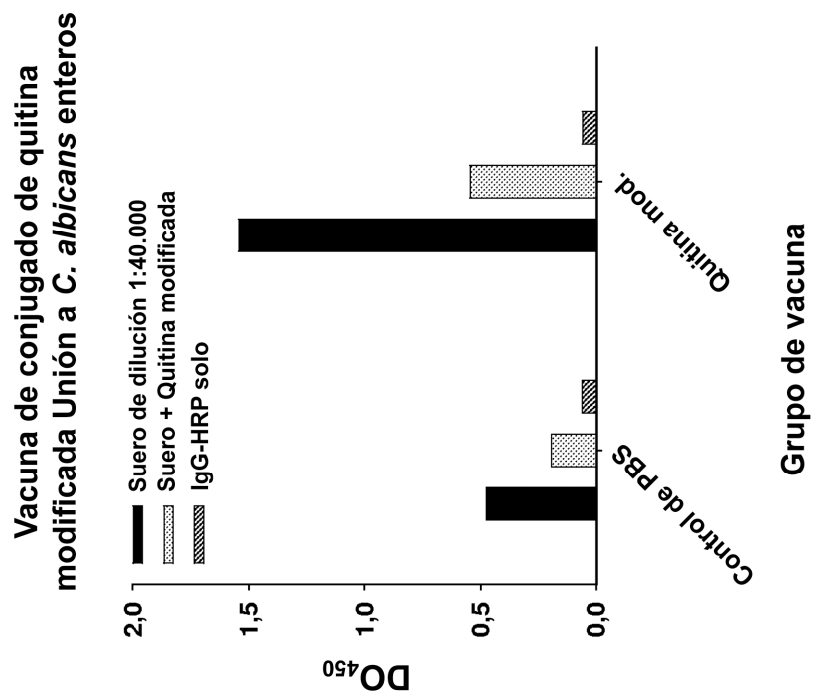


Figura 6A

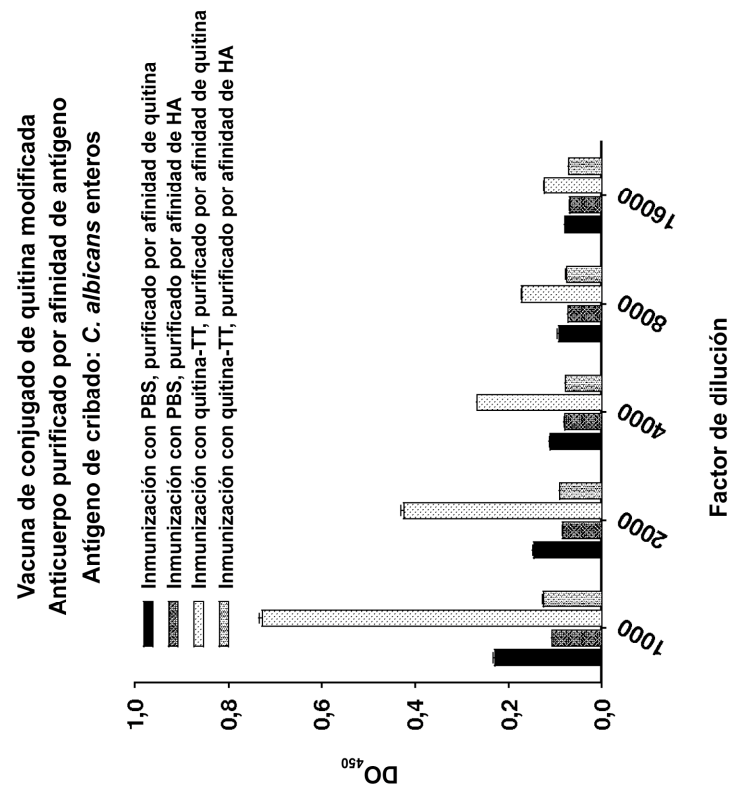


Figura 6B

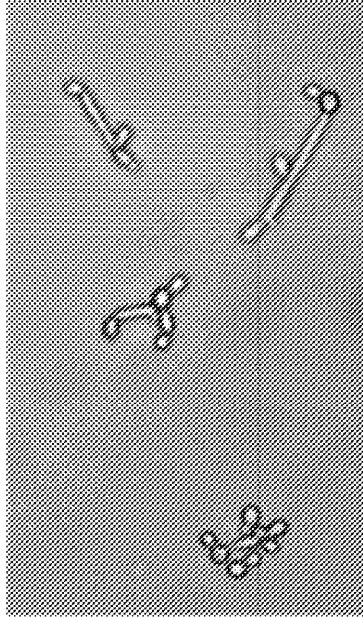


Figura 7B

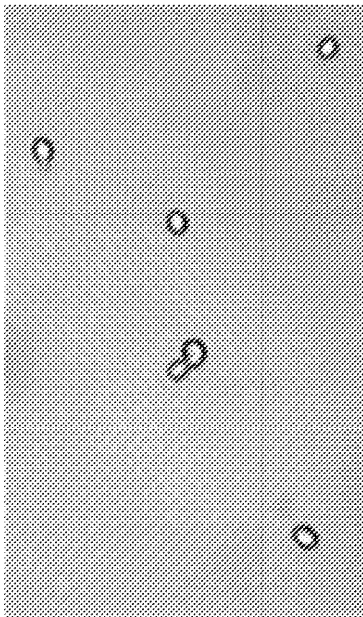


Figura 7A

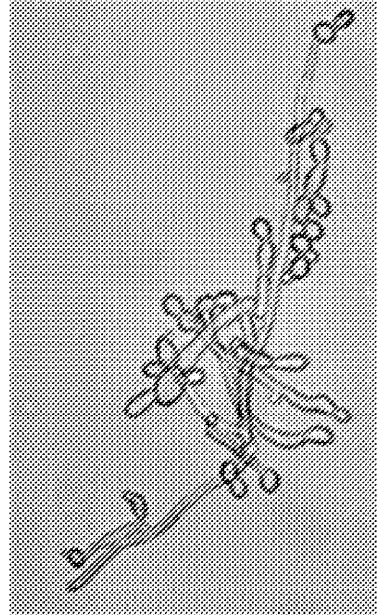


Figura 7C

Controles de ensayo

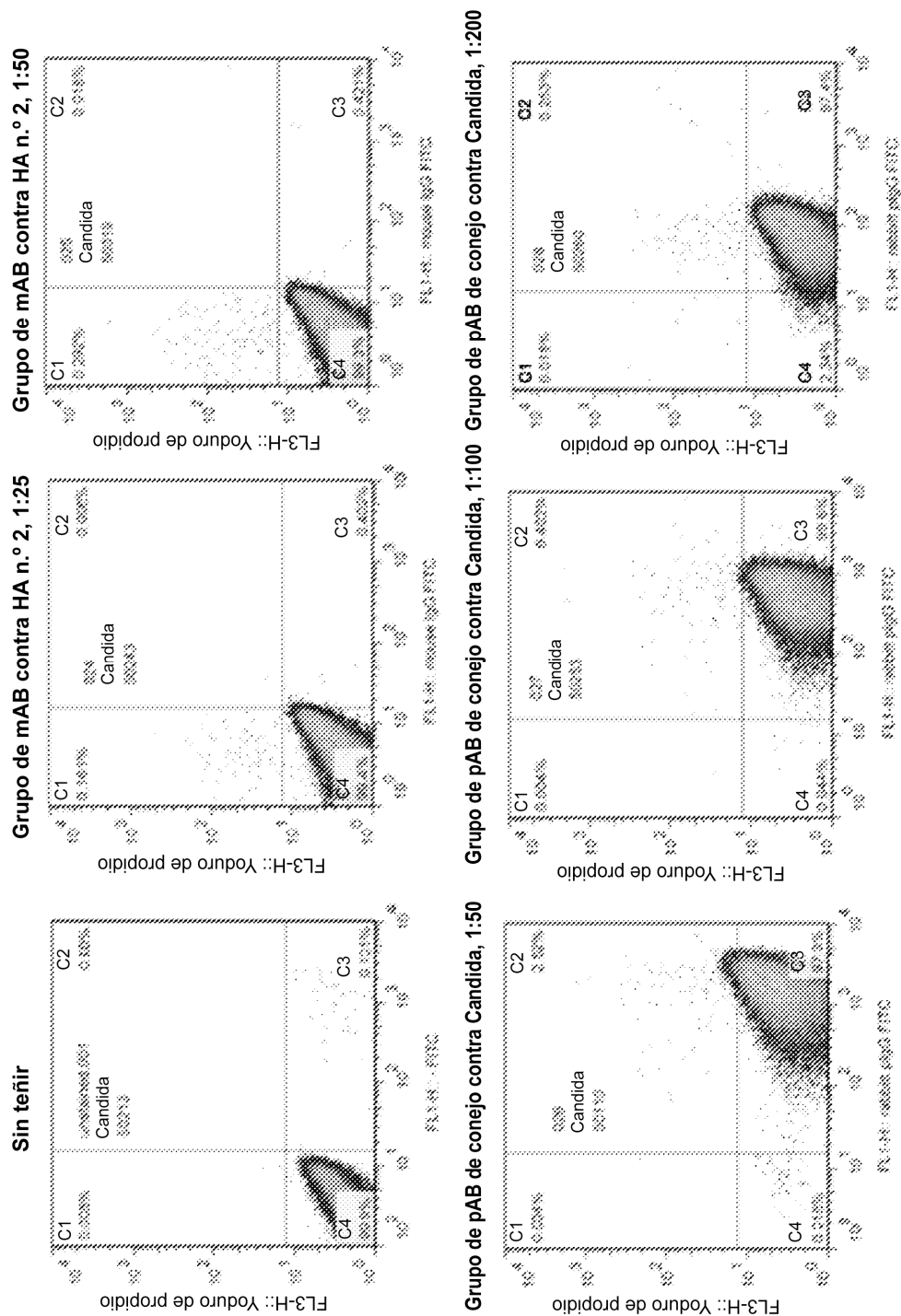
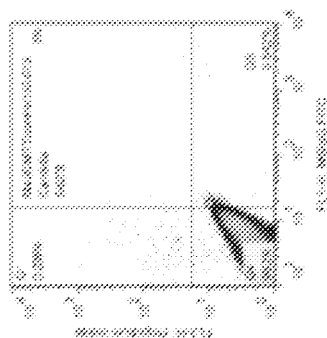


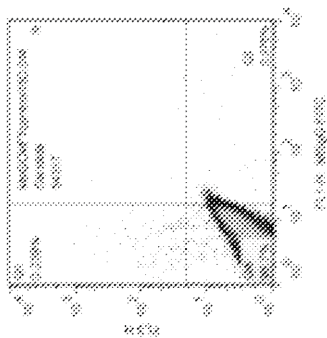
Figura 8A

Controles de anticuerpos contra la toxina tetánica

Suero de ratón de GCMP-TT, dilución 1:10

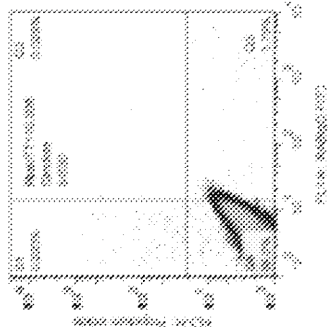


Suero de ratón de GCMP-TT, dilución 1:50

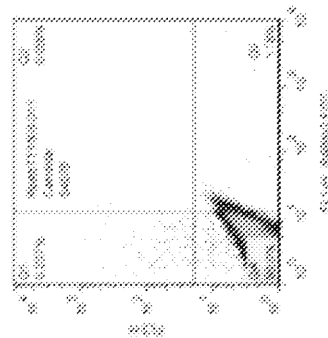


AB policlonal de conejo contra la toxina tetánica

Dilución 1:10



Dilución 1:50



Dilución 1:100

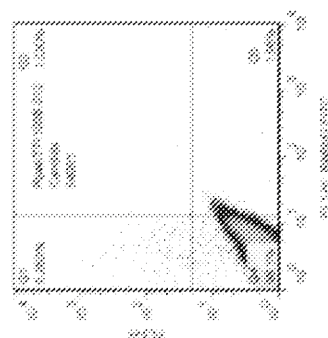


Figura 8B

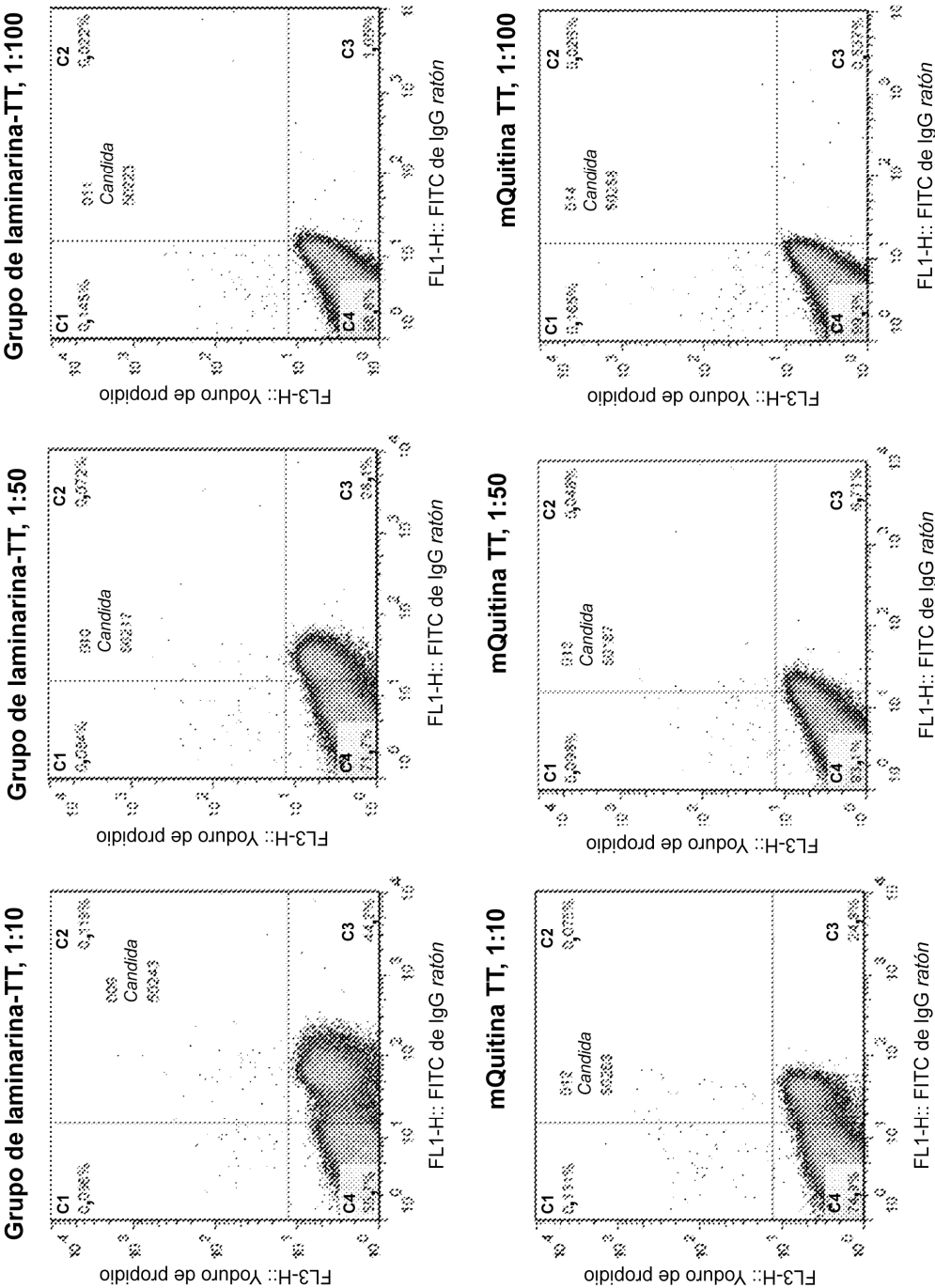


Figura 8C

Grupo de laminarina-TT

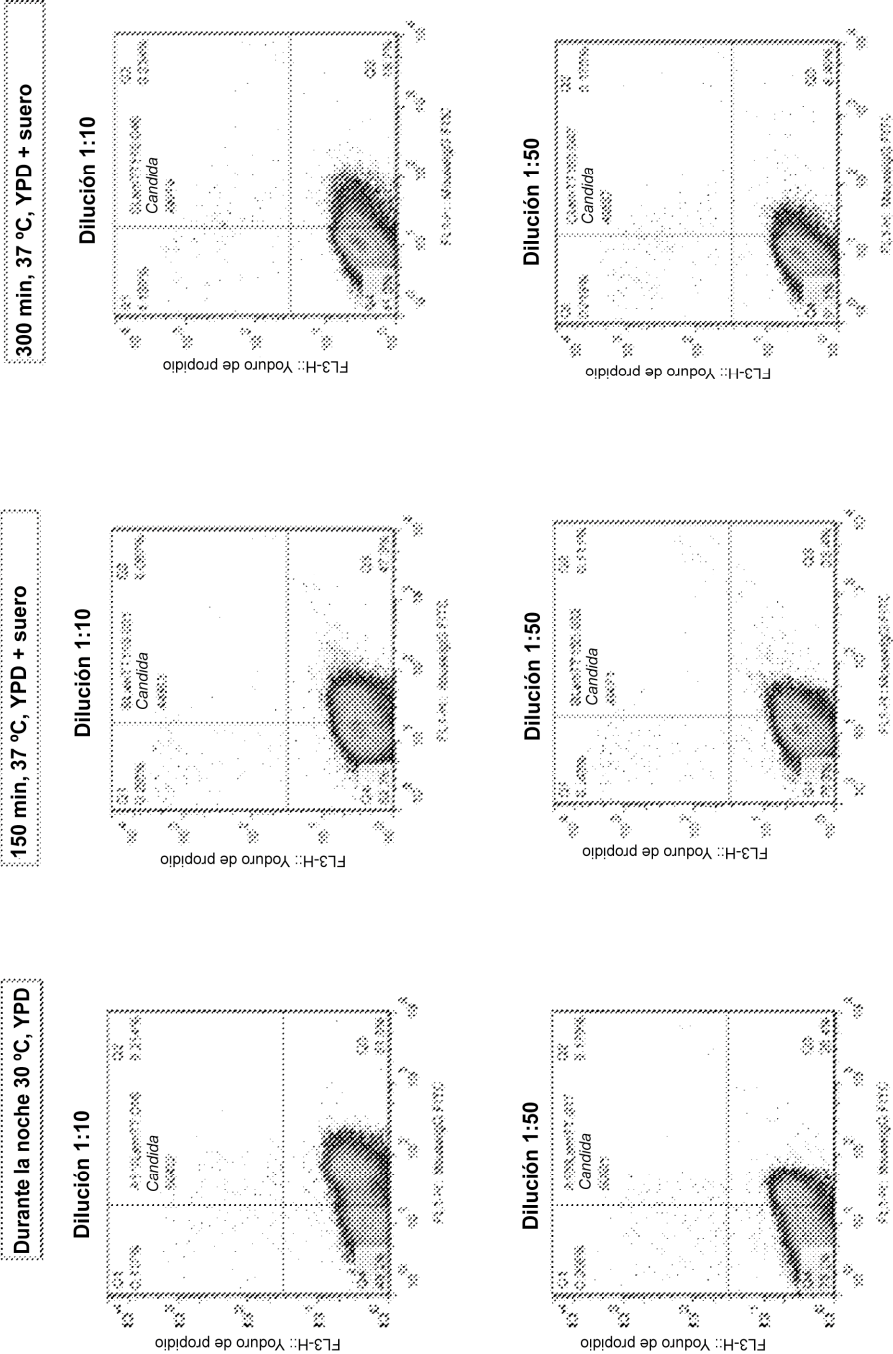


Figura 8D

Grupo de mQuitina TT

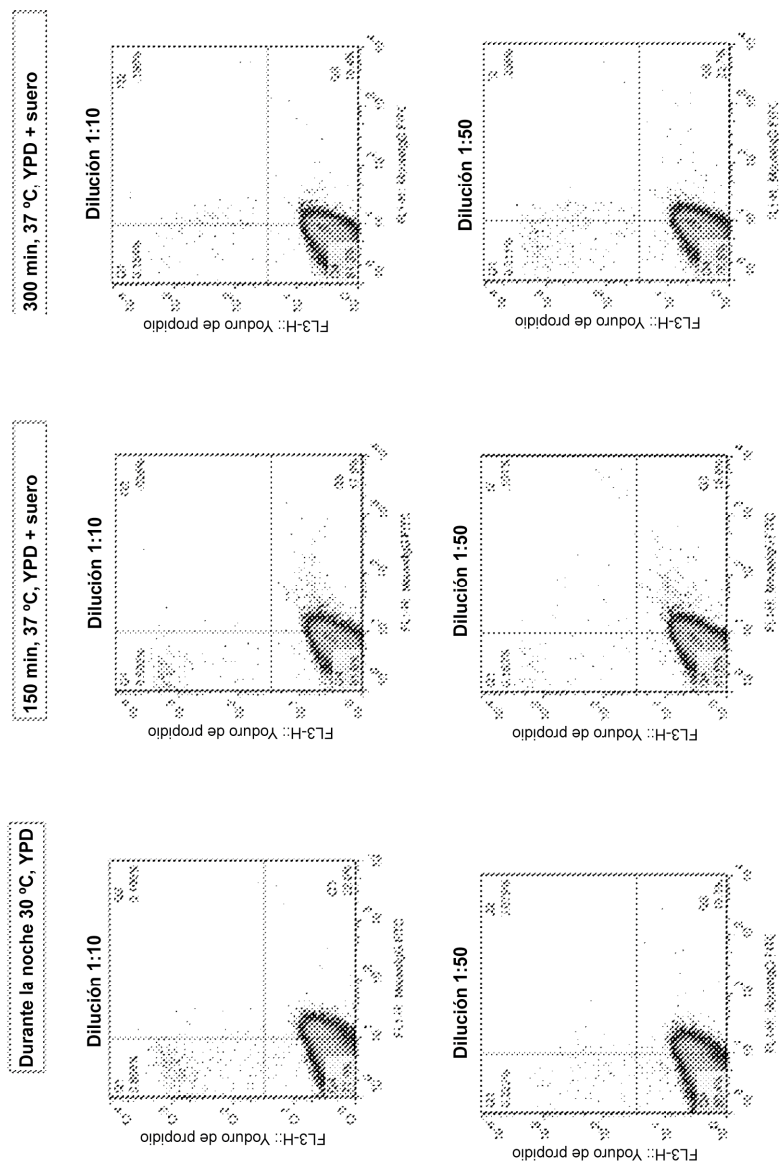


Figura 8E

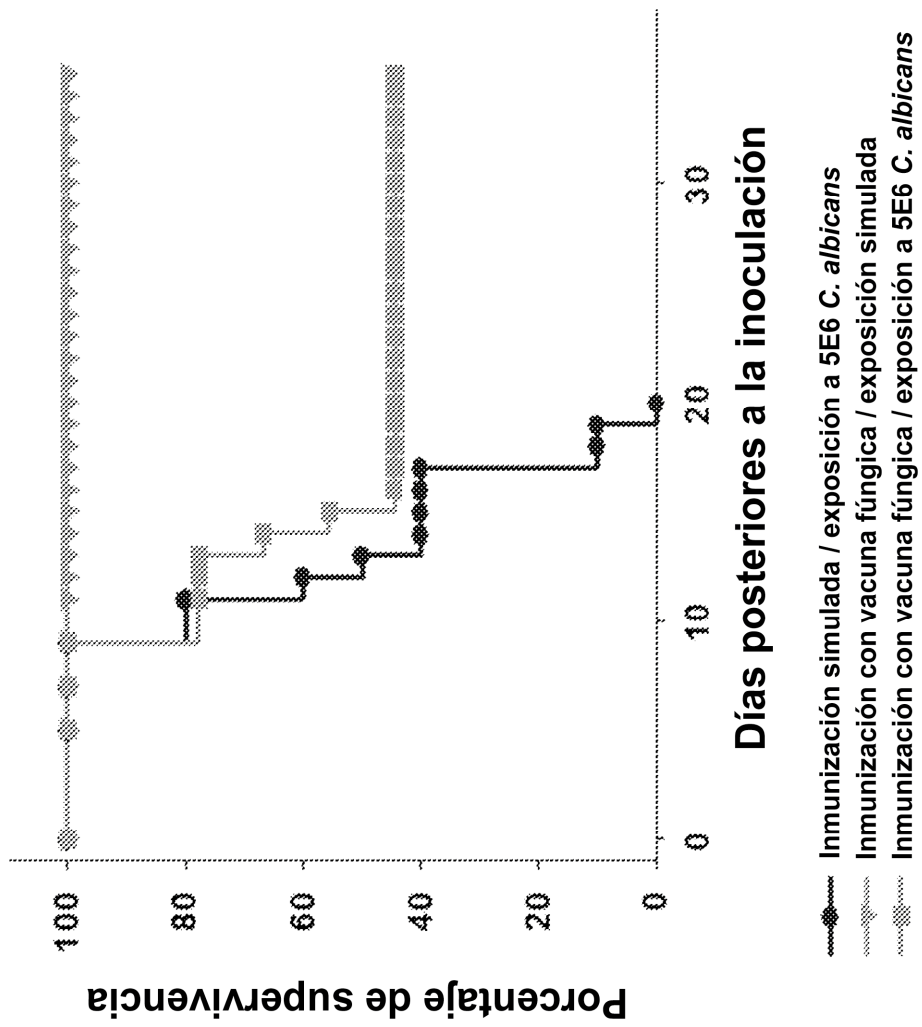


Figura 9A

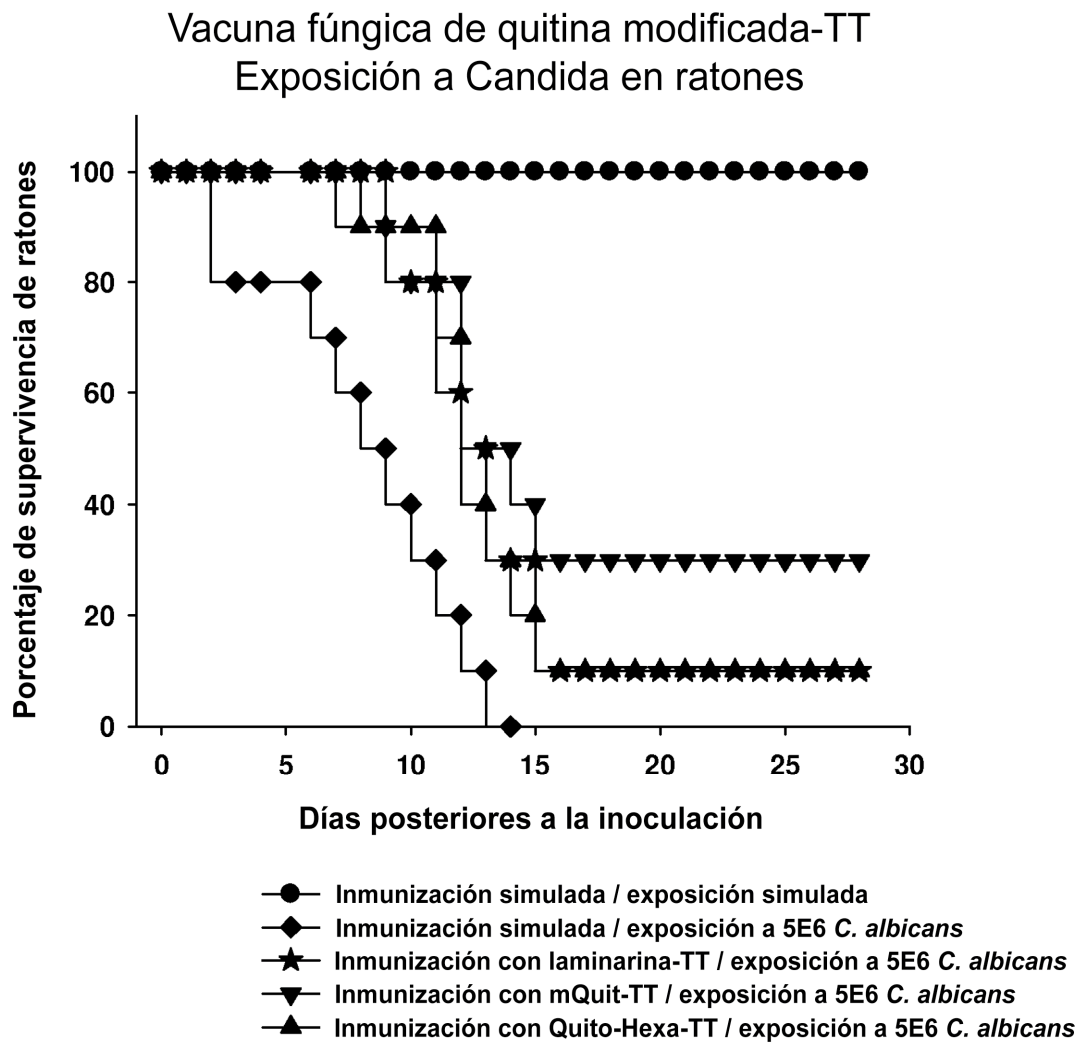


Figura 9B

Sueros humanos (12062-12072) en placa recubierta con quitina modificada-HSA

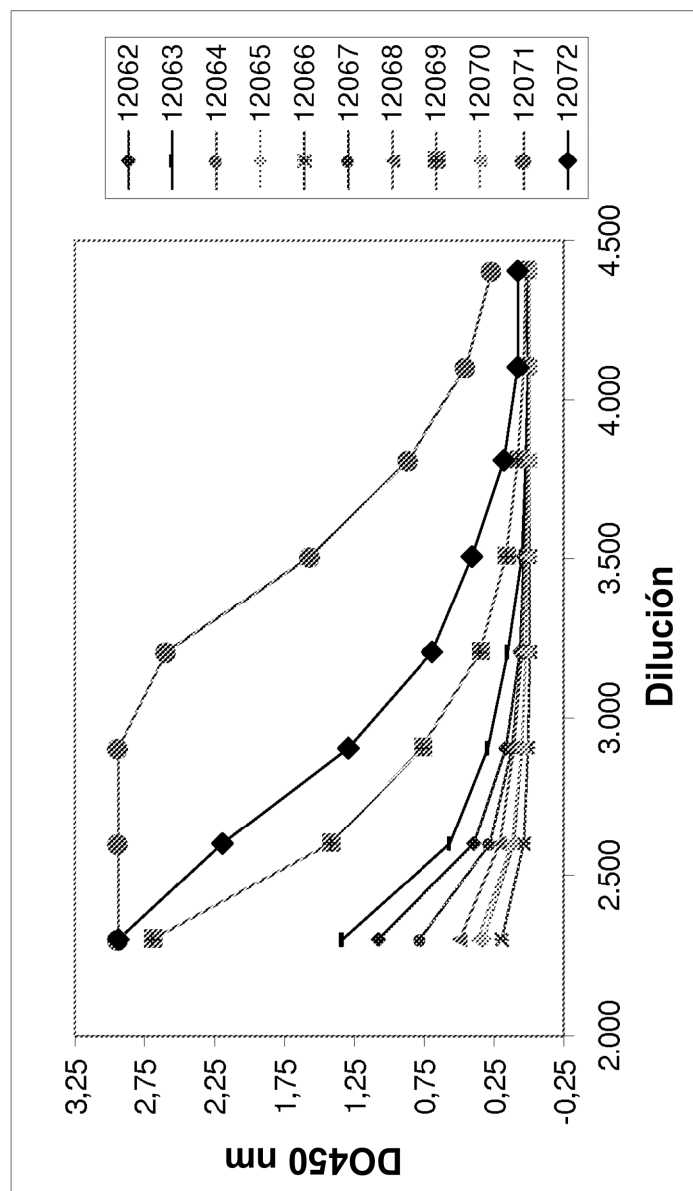


Figura 10A

Inhibición de suero humano (12017) con diferentes inhibidores en
placa recubierta con quitina modificada-HSA

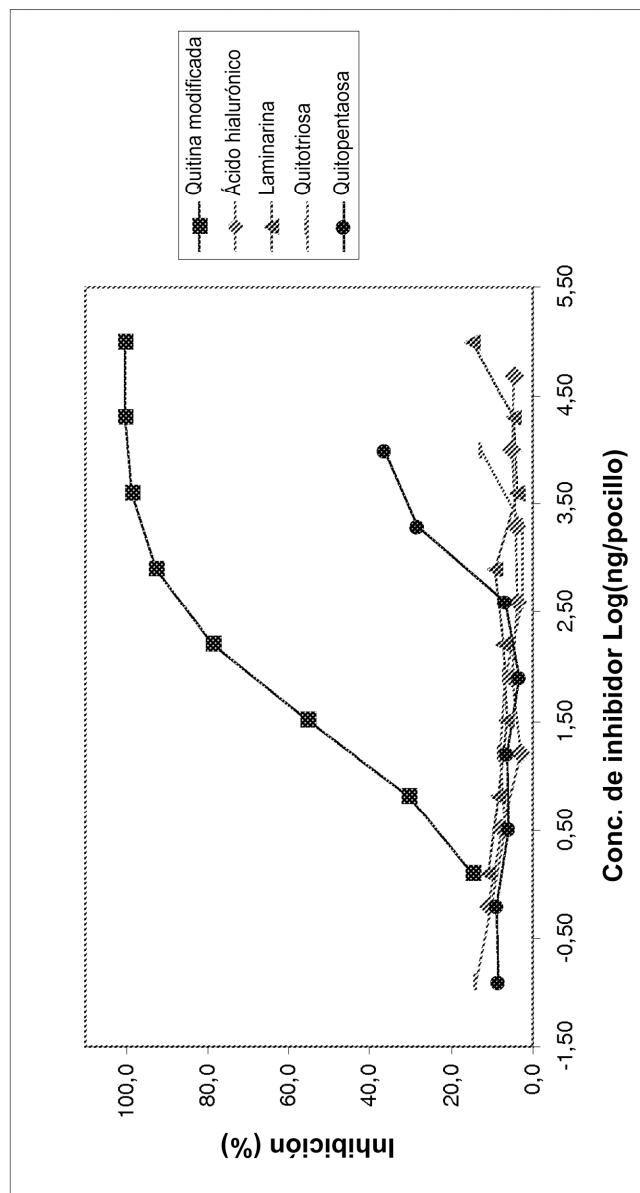


Figura 10B

Inhibición de sueros humanos con oligo-GlcNAc en placa
recubierta con Quito-Hexa-(GlcNAc)6-HSA

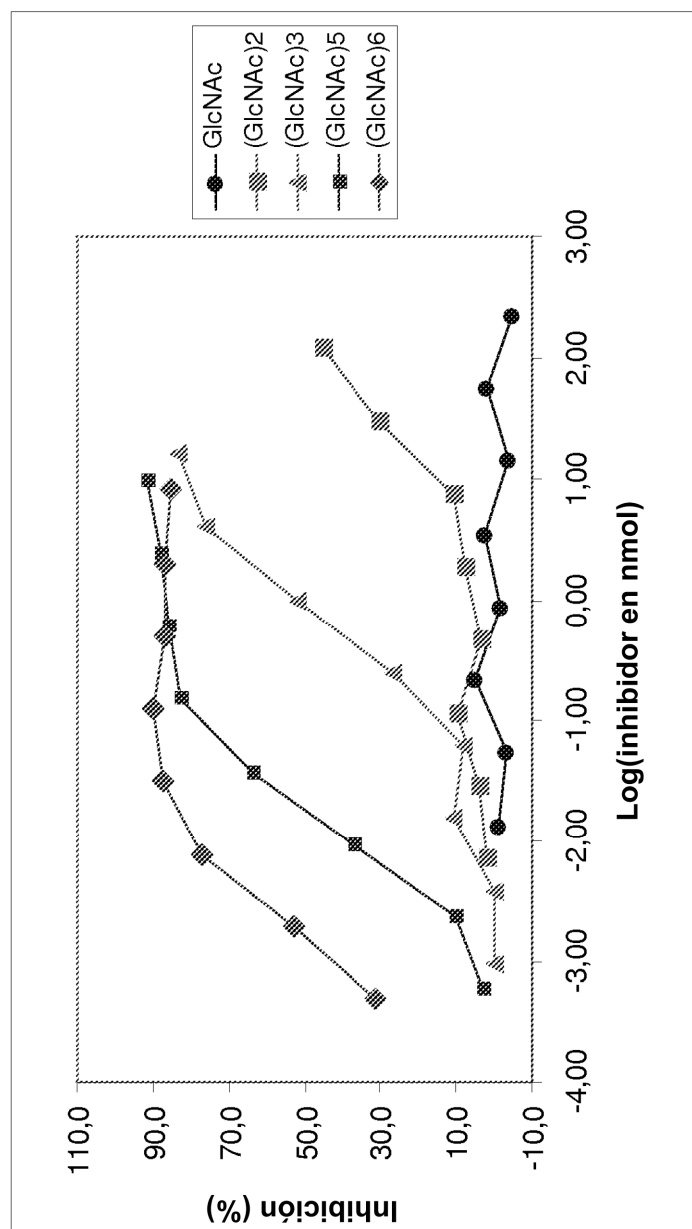


Figura 10C

IgG(γ) de sueros humanos en placa recubierta con laminarina-HSA

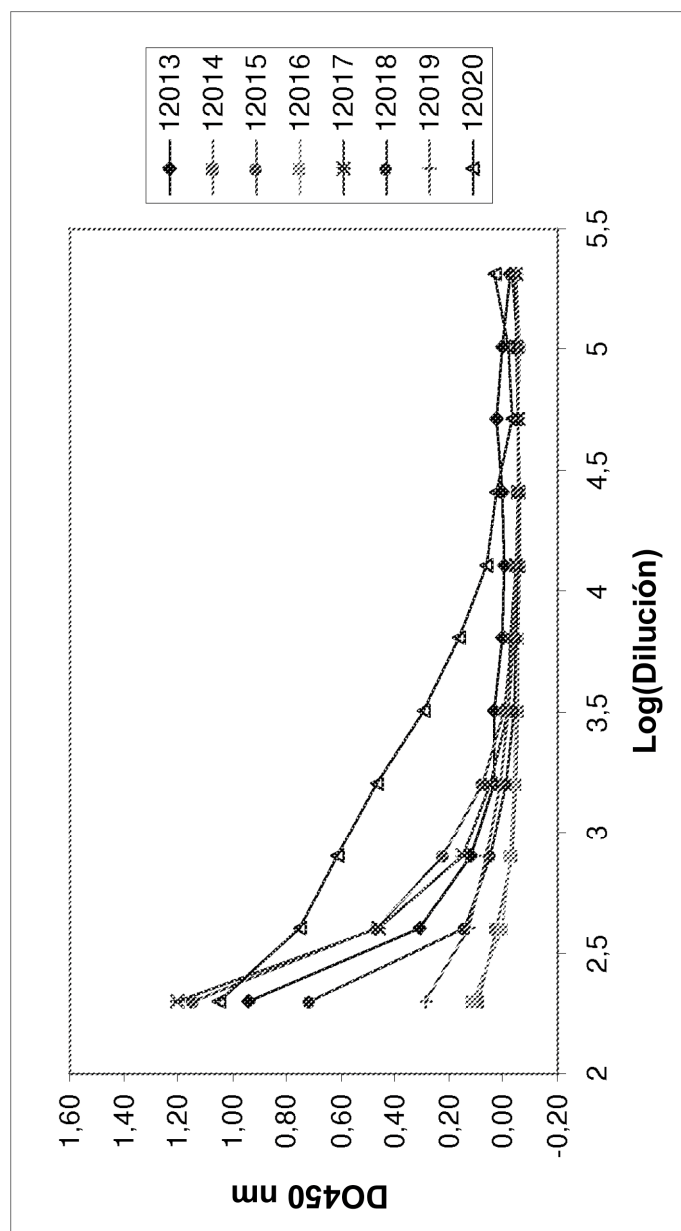


Figura 10D

Ensayo de unión por FACS de *Cryptococcus neoformans* de tipo A (H99)

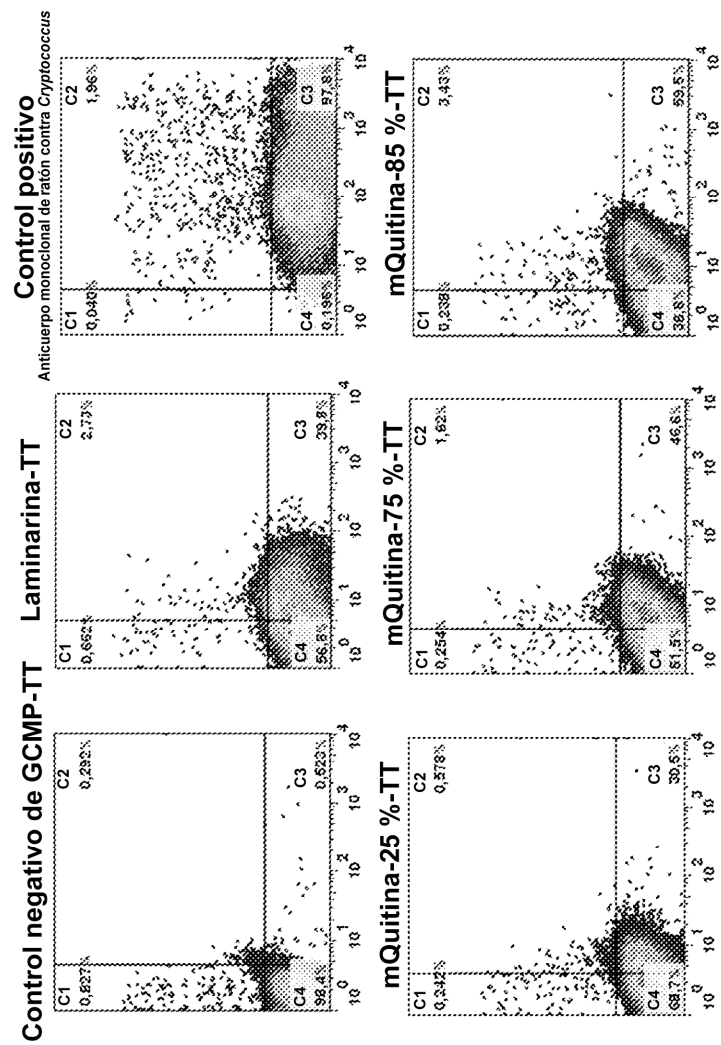


Figura 11