



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 358 804**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/205 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **04797464 .7**

(96) Fecha de presentación : **19.11.2004**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1694697**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **30.08.2006**

(54) Título: **Polipéptidos de *Campylobacter jejuni* ubicados en superficie.**

(30) Prioridad: **21.11.2003 DK 2003 01726**
25.11.2003 US 524617 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.05.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.05.2011

(73) Titular/es: **ACE BIOSCIENCES A/S**
Unsbjergvej 2A
DK-5220 Odense Sø, DK

(72) Inventor/es: **Schrotz-King, Petra;**
Skaarup, Crawford, Janne;
Nyborg, Nielsen, Pia y
Prokhorova, Tatyana, A.

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

Polipéptidos de *Campylobacter jejuni* ubicados en superficie

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a polipéptidos ubicados en la superficie celular de *Campylobacter jejuni* y su uso en la inmunización frente a la infección por *Campylobacter*, en el diagnóstico de *Campylobacter* y en la identificación de compuestos con actividad anti-*Campylobacter*.

Antecedentes de la invención

Incidencia de infecciones por *Campylobacter*

- 10 *Campylobacter*, una bacteria microaerófila gram-negativa, se identificó por primera vez como un patógeno humano en 1973. Desde entonces se ha convertido en la causa bacteriana más común de enfermedad diarreica en el mundo desarrollado, produciendo más enfermedad que los patógenos transmitidos por alimentos más reconocidos tradicionalmente, las especies de *Shigella* (spp). y *Salmonella* spp. combinadas. De las diferentes cepas de *Campylobacter* que producen enfermedad, *C. jejuni* es la más importante, siendo responsable del 99% de casos de campilobacteriosis. A nivel global, la vigilancia ha indicado una elevación constante en el número de casos notificados de campilobacteriosis desde que este organismo se reconoció por primera vez como patógeno. En efecto, la Organización Mundial de la Salud reconoce en la actualidad que las bacterias que producen campilobacteriosis son los agentes más importantes de enteritis en el mundo. Los funcionarios de salud pública internacionales estiman que *C. jejuni* solo produce de 400 a 500 millones de casos de diarrea en todo el mundo cada año, y es el patógeno transmitido por alimentos número uno en los Estados Unidos. Datos recientes durante el año 2000 ilustran la importancia de *Campylobacter* con respecto a otras causas más divulgadas de enfermedades transmitidas por alimentos. *Campylobacter* es responsable más casos, hospitalizaciones y muertes que las enfermedades transmitidas por alimentos mediadas por *Salmonella* o *E. coli*. Entre el conjunto de datos, *Campylobacter* representa más del 55% de los casos y el 33% de hospitalizaciones.

Síntomas de las infecciones por *Campylobacter*

- 25 La diarrea es la manifestación más constante y destacada de la campilobacteriosis. A menudo es con sangre. Los síntomas típicos de la infección por *C. jejuni* también incluyen fiebre, náusea, vómitos, dolor abdominal, cefalea y dolor muscular. La mayoría de los casos son leves y no requieren hospitalización y pueden resolverse espontáneamente. Sin embargo, la infección por *C. jejuni* puede ser grave y potencialmente mortal. La muerte es lo más común cuando están presentes otras enfermedades (por ejemplo cáncer, enfermedad hepática y enfermedades relacionadas con la inmunodeficiencia). Los niños menores de cinco años de edad y los adultos jóvenes de 15-29 años de edad son los grupos de edad afectados más frecuentemente. El periodo de incubación (el tiempo entre la exposición y el inicio del primer síntoma) es normalmente de dos a cinco días, pero el inicio puede producirse en tan sólo 2 días o hasta 10 días tras la ingestión. La enfermedad habitualmente no dura más de una semana, sin embargo, los casos graves pueden persistir hasta durante tres semanas (CDC Guidelines for confirmation of food-borne disease outbreaks. MMWR, 1996; 45:59).

Consecuencias a largo plazo de *Campylobacter*

- 40 La infección por *Campylobacter* a veces puede tener consecuencias a largo plazo. Algunos pacientes pueden desarrollar una enfermedad, denominada síndrome de Guillain-Barré, que afecta a los nervios del cuerpo tras la campilobacteriosis. Aunque es poco frecuente, es la causa más común de parálisis generalizada aguda en el mundo occidental. Comienza varias semanas tras la enfermedad diarreica en una pequeña minoría de pacientes con *Campylobacter*. Se produce cuando el sistema inmunitario de una persona genera anticuerpos contra componentes del *Campylobacter* y estos anticuerpos atacan los componentes de las células nerviosas del cuerpo porque son químicamente similares a componentes bacterianos.¹ El síndrome de Guillain-Barré comienza en los pies y se extiende por el cuerpo. Las sensaciones de pinchazos dan paso a debilidad que puede conducir a parálisis. Dura de semanas a meses y a menudo requiere cuidado intensivo. La recuperación completa es común, sin embargo los pacientes pueden quedar con daño neurológico grave. Aproximadamente el 15% de los pacientes con Guillain-Barré permanecen postrados en cama o confinados a una silla de ruedas tras un año. Se estima que aproximadamente uno de cada 1000 (0,1 %) casos de campilobacteriosis notificados conduce al síndrome de Guillain-Barré. Hasta el 40% de los casos del síndrome de Guillain-Barré en el RU se producen tras campilobacteriosis².
- 50 El síndrome de Miller-Fisher es otro síndrome neurológico relacionado que puede seguir a la campilobacteriosis y se produce también por imitación inmunológica¹. En el síndrome de Miller-Fisher, los nervios de la cabeza se ven más afectados que los nervios del cuerpo.

- 55 Otra afección crónica que puede asociarse con la infección por *Campylobacter* es una artritis denominada síndrome de Reiter. Ésta es una artritis reactiva que afecta lo más comúnmente a grandes articulaciones que soportan peso tales como las rodillas y la parte inferior de la espalda. Es una complicación que se asocia fuertemente con una

composición genética particular; son más susceptibles las personas que tienen el antígeno linfocitario humano B27 (HLA-B27).

Además, el *Campylobacter* puede producir también apendicitis o infectar la cavidad abdominal (peritonitis), el corazón (carditis), el sistema nervioso central (meningitis), la vesícula biliar (colecistitis), las vías urinarias y el torrente sanguíneo.

Bibliografía:

1. Ang CW *et al.* (2001) Infect Immun. 69(4):2462-2469.
2. Rees *et al.* (1995) N Engl J Med 333:1374-1379.

Tratamiento de la campilobacteriosis

Los pacientes con campilobacteriosis deben beber mucho líquido mientras que dure la diarrea con el fin de mantener la hidratación. Las medicaciones antidiarreicas tales como loperamida pueden disipar algunos síntomas. *Campylobacter* es habitualmente una enfermedad que se resuelve espontáneamente, pero cuando se identifica, está indicado el tratamiento específico con antibióticos, ya que el tratamiento puede acortar el transcurso de la enfermedad. En casos más graves de gastroenteritis, se inicia habitualmente un tratamiento con antibióticos antes de que se conozcan los resultados de los cultivos. Los antibióticos macrólidos (eritromicina, claritromicina o azitromicina) son los agentes más eficaces para *C. jejuni*. También pueden usarse antibióticos de fluoroquinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino, gatifloxacino o moxifloxacino).

Sin embargo, se ha notificado la resistencia de *Campylobacter* a agentes antimicrobianos en muchos países y está en aumento (Pedungton y Kaneene (2003) J. Vet. Med. Sci. 65(2):161-170). La resistencia a quinolonas está en aumento en Europa, Asia y los Estados Unidos. El aumento de la resistencia está relacionado, al menos parcialmente, con el uso de los antibióticos en los piensos para aves (Smith *et al.* (1999) N Engl J Med 340:1525-1532).

Estrategias novedosas para el tratamiento, la prevención y el diagnóstico de *Campylobacter*

Debido a que el aumento en la incidencia y la aparición extendida de resistencia, existe una necesidad considerable del desarrollo de nuevos productos eficaces para el tratamiento y la prevención de infecciones por *Campylobacter*. Por un lado, debido a la aparición de resistencia, existe una necesidad de compuestos anti-*Campylobacter* novedosos. Por otra parte, estudios observacionales y experimentales han proporcionado evidencias de desarrollo de inmunidad adquirida en seres humanos, lo que conduce a soportar el concepto del desarrollo de vacunas, en particular para los grupos de riesgo (Scott y Tribble (2000) En: *Campylobacter*, 2ª ed. Ed. de Nachamkin y Blaser, American Society for Microbiology, págs. 303-319). Además, existe una necesidad de nuevos métodos rápidos y fiables para el diagnóstico de las infecciones por *Campylobacter*.

Estos objetivos pueden lograrse mediante la identificación y el uso de polipéptidos adecuados de *Campylobacter jejuni* que pueden funcionar como dianas, es decir dianas para el sistema inmunitario y/o para anticuerpos, dianas para inhibidores citotóxicos, o dianas para restos indicadores en diagnóstico.

El documento WO 02/077183 (Elitra) se refiere a secuencias de ácidos nucleicos antisentido que inhiben la proliferación de procariotas. Los ácidos nucleicos pueden usarse, entre otros, para seleccionar ácidos nucleicos homólogos que se requieren para la proliferación en células distintas de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*.

El documento US 5.470.958 (Enteric Research Laboratories Inc.) se refiere a una composición antigénica que incluye antígenos que pueden obtenerse a partir de *Campylobacter jejuni*. La composición antigénica se da a conocer para su uso como vacuna para inducir anticuerpos protectores tanto contra *Campylobacter coli* como contra *Campylobacter jejuni*.

El documento CA 2.296.869 (Angela *et al.*) se refiere a proteínas de *Campylobacter jejuni* implicadas en la adhesión e invasión de dicha bacteria. Se refiere además al conjunto en un kit de los productos dados a conocer, dándose a conocer dicho kit para su uso en la detección de dicha bacteria sometiendo a ensayo para detectar una proteína o moléculas de proteína J1pA, la presencia de moléculas de ácido nucleico o la presencia de una lipoproteína o un resto lipídico en un polipéptido en una muestra. También, se refiere a una composición para el tratamiento de enfermedades infecciosas y a una vacuna.

Resumen de la invención

La presente solicitud, en una realización, se refiere a una composición que comprende

- un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO:43 en donde X₁ es V o A y X₂ es A o T y X₃ es T o A, o comprende un fragmento antigénico seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 74-81 o una variante de dicha secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos el 75% con dicha secuencia,

- un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica para dicho polipéptido,
- un vector de expresión que comprende una secuencia que codifica para dicho polipéptido,
- un virus recombinante o una célula recombinante que comprende dicho polinucleótido o dicho vector de expresión, o

5 - un anticuerpo que puede unirse a dicho polipéptido,

para su uso como medicamento.

La presente solicitud, en una realización adicional, se refiere a un anticuerpo que puede unirse a un polipéptido de SEQ ID NO:43 en donde X_1 es V o A y X_2 es A o T y X_3 es T o A para su uso como medicamento.

10 La presente solicitud en una realización adicional se refiere a una célula de *Escherichia coli* recombinante de virulencia atenuada o reducida o una célula de *Salmonella* recombinante de virulencia atenuada o reducida transformada o transfectada con un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica para el polipéptido de SEQ ID NO:43 en donde X_1 es V o A y X_2 es A o T y X_3 es T o A, o que codifica para un fragmento antigénico o una variante de dicha secuencia tal como se define en la reivindicación 1, para su uso como medicamento.

La presente solicitud, en una realización adicional, se refiere al uso de

- 15 - un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO:43 en donde X_1 es V o A y X_2 es A o T y X_3 es T o A, o comprende un fragmento antigénico o una variante de dicha secuencia tal como se define en la reivindicación 1,
- un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica para dicho polipéptido,
- un vector de expresión que comprende una secuencia que codifica para dicho polipéptido,
- 20 - un virus recombinante o una célula recombinante que comprende dicho polinucleótido o dicho vector de expresión,

para la preparación de un medicamento para la inmunización de un animal o ser humano frente a infecciones por *Campylobacter*, preferiblemente *Campylobacter jejuni*.

25 La presente solicitud, en una realización adicional, se refiere al uso de un anticuerpo que puede unirse al polipéptido de SEQ ID NO:43 en donde X_1 es V o A y X_2 es A o T y X_3 es T o A, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de infecciones por *Campylobacter*, preferiblemente *Campylobacter jejuni*, en un animal o ser humano.

La presente solicitud, en una realización adicional, se refiere a un método para detectar *Campylobacter jejuni* en una muestra que comprende las etapas de

- 30 a. poner en contacto dicha muestra con un resto indicador que puede unirse específicamente al polipéptido de SEQ ID NO:43 en donde X_1 es V o A y X_2 es A o T y X_3 es T o A, en el que el resto indicador puede además unirse específicamente a células de *Campylobacter jejuni* intactas, y
- b. determinar si se ha generado una señal por el resto indicador, detectando de ese modo si dicha muestra contiene *Campylobacter jejuni*.

35 La presente solicitud en una realización adicional se refiere a un método para identificar un inhibidor del polipéptido de SEQ ID NO:43 en donde X_1 es V o A y X_2 es A o T y X_3 es T o A, que comprende las etapas de

- a. proporcionar dos células que difieren en el nivel del polipéptido de SEQ ID NO:43 en donde X_1 es V o A y X_2 es A o T y X_3 es T o A,
- 40 b. determinar la sensibilidad de dichas células a un supuesto inhibidor, por ejemplo mediante un ensayo de crecimiento tal como se define en la reivindicación 38, y
- c. determinar si dichas dos células se ven afectadas de manera diferente por la presencia de dicho supuesto inhibidor.

La presente solicitud, en una realización adicional, se refiere a un método para identificar una pareja de unión derivada del hospedador del polipéptido de SEQ ID NO:43 en donde X_1 es V o A y X_2 es A o T y X_3 es T o A, o un fragmento del mismo tal como se define en la reivindicación 1, que comprende las etapas de

- 45 a. proporcionar membranas del hospedador purificadas y separadas por electroforesis transferidas sobre una membrana,

- b. incubar dichas membranas del hospedador con el polipéptido de SEQ ID NO:43 en donde X_1 es V o A y X_2 es A o T y X_3 es T o A, o un fragmento del mismo,
- c. determinar la unión usando anticuerpos específicos para el polipéptido de SEQ ID NO:43 en donde X_1 es V o A y X_2 es A o T y X_3 es T o A, o dicho fragmento del mismo, y
- 5 d. identificar la pareja de unión mediante elución de dicha membrana de transferencia y posterior análisis.

La presente solicitud se refiere a polipéptidos ubicados en superficie de *Campylobacter jejuni* tal como se define en la reivindicación 1. En el contexto de esta solicitud, un polipéptido “ubicado en superficie” se define como un polipéptido que es al menos parcialmente (es decir, parte de la cadena de polipéptido y/o parte de la población de las moléculas de polipéptido) ubicadas en el exterior de la membrana externa de un célula de *Campylobacter jejuni*.
 10 Por tanto, un polipéptido ubicado en superficie es un polipéptido que está expuesto completa o parcialmente al espacio exterior de la membrana externa. Los polipéptidos ubicados en superficie incluyen además todos los polipéptidos o fragmentos de polipéptidos que pueden identificarse en fracciones obtenidas mediante la extracción de proteínas de superficie a pH bajo tal como se describe en el presente documento.

Los polipéptidos ubicados en superficie son agentes atractivos para la terapia antibacteriana y/o el diagnóstico de infección bacteriana, puesto que la exposición de tales polipéptidos al espacio extracelular significa que los compuestos que interaccionan con estos polipéptidos (por ejemplo, compuestos usados para prevenir, tratar o diagnosticar infecciones bacterianas) a menudo no necesitan entrar en o pasar la membrana externa para ser eficaces.

La determinación de la localización en la superficie celular de un polipéptido de *Campylobacter jejuni* sólo puede realizarse en la actualidad de manera experimental y no mediante bioinformática, ya que no se conocen las señales o motivos de clasificación comunes para esta localización. Es posible predecir con cierto grado de certeza si entran o no los polipéptidos en el periplasma, pero no se ha identificado ningún motivo general para la localización en superficie de los polipéptidos, y por tanto no es posible predecir a partir de la secuencia sola si se transportará cualquier polipéptido periplasmático (o no periplasmático) dado a la superficie. El número de polipéptidos de superficie confirmados es relativamente bajo en *Campylobacter jejuni* e incluye principalmente proteínas estructurales de flagelos y un número pequeño de proteínas de superficie no relacionadas con flagelos, tales como PEB1-4.

Los inventores han identificado 51 polipéptidos diferentes en fracciones de superficie celular de *Campylobacter jejuni*. El método que se empleó identifica polipéptidos que se expresan a un nivel relativamente alto. La combinación de estar expuesto en superficie y estar presente en cantidades relativamente altas hace que estos polipéptidos sean sumamente adecuados como dianas para anticuerpos y por tanto para su uso en inmunización/vacunación pasiva o activa. La invención sólo se refiere al polipéptido definido por la SEQ ID NO.43. Los polipéptidos definidos por las SEQ ID NO 1-42, 44-51 simplemente se dan a conocer.

Quince de los 51 polipéptidos ubicados en superficie que se identificaron (SEQ ID NO:37-51) se han descrito previamente entre más de 36.000 otros loci como coincidencias en búsquedas de homología usando genes esenciales de otras bacterias, véase el documento WO 02/077183. El documento WO 02/077183 no describe una identificación de la localización subcelular de los polipéptidos identificados ni una determinación de sus niveles de expresión.

La combinación de estar expuesto en superficie y estar presente en cantidades relativamente altas también hace los 51 polipéptidos identificados por los inventores sumamente adecuados como dianas para el diagnóstico de campilobacteriosis, lo que permite la detección de células intactas con alta sensibilidad.

Además, la localización en superficie de los 51 polipéptidos los hace adecuados como dianas para inhibidores. Tales inhibidores pueden ser bactericidas o bacteriostáticos o pueden impedir la interacción de *Campylobacter jejuni* con el organismo hospedador (virulencia).

45 Definiciones

- Vacuna: se usa para indicar una composición que puede inducir una respuesta inmunitaria protectora frente a un microorganismo en un ser humano o animal.
- Respuesta inmunitaria protectora: se usa para indicar una respuesta inmunitaria (humoral/anticuerpo y/o celular) que induce memoria en un organismo, lo que da como resultado que el agente infeccioso, en el presente documento *Campylobacter jejuni*, se encuentre con una respuesta secundaria en vez de primaria, reduciendo así su impacto en el organismo hospedador.
- Polipéptido: a menos que se especifique de otro modo, el término “polipéptido” cuando se usa en el presente documento puede hacer referencia también a una variante o un fragmento de un polipéptido. Polipéptidos preferidos son polipéptidos antigénicos.

- Fragmento: se usa para indicar una parte de longitud no completa de un polipéptido. Por tanto, un fragmento es por sí mismo un polipéptido.
- Variante: una “variante” de un polipéptido de referencia dado se refiere a un polipéptido que presenta un determinado grado de identidad de secuencia con dicho polipéptido de referencia pero no es idéntico a dicho polipéptido de referencia.
- Antígeno/antigénico/antigenicidad/inmunógeno/inmunogénico/inmunogenicidad: hacen referencia a la capacidad de inducción de una respuesta inmunitaria.
- Portador inmunogénico: se refiere a un compuesto que asiste o fortalece directa o indirectamente una respuesta inmunitaria.
- Vector de expresión: se refiere a un plásmido o fago o virus, preferiblemente recombinante, que va a usarse en la producción de un polipéptido a partir de una secuencia de polinucleótido. Un vector de expresión comprende un constructo de expresión, que comprende un conjunto de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores o potenciadores, (2) una secuencia estructural o codificante que se transcribe en ARNm y se traduce en proteína, y que se une operativamente a los elementos de (1); y (3) secuencias de iniciación y terminación de la transcripción apropiadas.
- Pareja de unión: de un polipéptido se refiere a una molécula que puede unirse a dicho polipéptido. Tal unión puede ser indirecta, a través de otra molécula, pero es preferiblemente directa. Una pareja de unión puede ser cualquier tipo de molécula, tal como, por ejemplo, moléculas hidrófobas pequeñas o por ejemplo una macromolécula celular o extracelular, tal como una proteína, un hidrato de carbono o un ácido nucleico. Los tipos preferidos de parejas de unión incluyen anticuerpos, ligandos o inhibidores.
- Pluralidad: el término “pluralidad” indica que más de uno, preferiblemente más de 10.
- Resto indicador: el término “resto indicador” cubre una molécula o un complejo de moléculas que pueden unirse específicamente a un polipéptido y/o una célula dada, y que pueden generar una señal detectable. Preferiblemente, el resto indicador es un anticuerpo o comprende una molécula de anticuerpo. Por tanto, un resto indicador preferido es un anticuerpo acoplado a un complejo con una sustancia detectable.
- Molécula derivada del hospedador o molécula del hospedador: se refiere a una molécula que se encuentra normalmente en un organismo hospedador que puede infectarse por *C. jejuni*. Una molécula derivada del hospedador es preferiblemente un polipéptido del hospedador, preferiblemente un polipéptido humano.
- Anticuerpo: el término “anticuerpos” cuando se usa en el presente documento se entiende que cubra anticuerpos así como equivalentes funcionales de los mismos. Por tanto, esto incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (AcM), anticuerpos quiméricos, humanos o humanizados, anticuerpos de cadena sencilla, y también fragmentos de unión de anticuerpos, tales como, pero sin limitarse a, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos antiidiotípicos, híbridos que comprenden fragmentos de anticuerpo, y fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de éstos. El término también incluye anticuerpos multivalentes, multiespecíficos, tal como anticuerpos biespecíficos y mezclas de anticuerpos monoclonales.
- Constante de disociación, K_d, es una medida para describir la intensidad de unión (o afinidad o aversez) entre macromoléculas, por ejemplo un anticuerpo y su antígeno. Cuanta más pequeña es la K_d, más fuerte es la unión.
- Aislado: usado con respecto a los polipéptidos, polinucleótidos y anticuerpos dados a conocer en el presente documento, “aislado” se refiere a aquéllos que se han identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio natural, normalmente celular. Componentes contaminantes del medio natural son materiales que interferirían normalmente en los usos de diagnóstico o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos y no proteicos. Preferiblemente se aíslan los polipéptidos, polinucleótidos y anticuerpos de la invención, y las vacunas y otras composiciones de la invención comprenden preferiblemente polipéptidos aislados o polinucleótidos aislados o anticuerpos aislados.

Descripción detallada

Figuras

Figura 1. Se diluyeron 1:2000 sueros de cuatro ratones seleccionados aleatoriamente por antígeno de los experimentos ACE003b y ACE003c y se sometieron a prueba en inmunotransferencia de tipo Western frente a lisado de *Campylobacter* de células completas (B, D) o 100 ng de proteína recombinante (A, C). Proteínas marcadoras de peso molecular PM en kD: 97, 64, 51, 39, 28, 19, 14.

Figura 2. Un ejemplo de determinación del título de anticuerpos. Se diluyó en serie el suero de un ratón seleccionado aleatoriamente (uno por antígeno) de los experimentos ACE003b y ACE003c tomados en el día 21 (precedido por inmunización en los días 1 y 14) y se realizó la inmunotransferencia de tipo Western en la proteína recombinante correspondiente (100 ng/mancha).

- 5 Figura 3. Resultados de la exposición oral de ratón. Se realizaron cinco experimentos que incluyeron diferentes combinaciones de antígenos y controles tal como se enumeran a continuación:

Control negativo con alumbre en cuadrados, antígeno en triángulos, excepto por ACE017, en el que el antígeno también está en triángulos, pero el control positivo es eluato de glicina (rombos) y el control negativo es CBP (véase a continuación) y se asemejan a cuadrados.

Nombre del experimento	Antígenos usados
ACE003b	Cj0092, Cj0143c, Cj0420, Cj0772c, alumbre
ACE003c	Cj0715, Cj1018c, Cj1380, Cj1643, alumbre
ACE011a	Cj0092, Cj0143c, Cj0420, Cj0772c, alumbre
ACE011b	Cj0715, Cj1018c, Cj1380, Cj1643, alumbre
ACE017	Cj0092, Cj0143c, Cj0420, Cj0772c, Cj1018c, Cj1380, Cj1643, dominio de unión a celulosa de <i>Clostridium cellulovorans</i> (CBP, Sigma Aldrich C8581), eluato de glicina de cepas de <i>C.j.</i> mencionadas en el texto.

- 10 Figura 4. Muestra la lista de secuencias de la presente solicitud.

Tabla 1. Aparición de 8 antígenos en 13 cepas de *Campylobacter jejuni* seleccionadas al azar y una cepa de *Campylobacter coli*. Se sometieron a inmunotransferencia de tipo Western el lisado celular bacteriano de células completas de las 14 cepas enumeradas y se estudiaron mediante sondas con sueros contra los 8 antígenos.

Composiciones de vacunas y métodos de vacunación de la invención

- 15 El objetivo de la vacunación o la inmunización activa es proporcionar inmunidad protectora induciendo una respuesta de memoria a un microorganismo infeccioso usando una composición antigénica o inmunogénica. Por tanto, una vacuna es una composición que puede inducir una respuesta inmunitaria protectora frente a un microorganismo en un ser humano o animal. Una respuesta inmunitaria de este tipo puede ser una respuesta celular y/o una respuesta humoral, por ejemplo una respuesta de células T específica o una respuesta de anticuerpos.
- 20 Por consiguiente, en una realización importante, la composición es una composición de vacuna. Es decir, la invención se refiere al uso de una composición tal como se define en la reivindicación 1 como vacuna. La variante en el presente documento tiene preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 95%, tal como al menos el 96%, por ejemplo al menos el 97%, tal como al menos el 98%, por ejemplo al menos el 99% con dicha secuencia.
- 25 En otra realización de la composición anterior, el polipéptido comprende la SEQ ID NO:43, o un fragmento antigénico o variante del mismo. En una realización preferida, X₁ de la SEQ ID NO:43 es V y X₂ es A y X₃ es T. En otra realización preferida, X₁ de la SEQ ID NO:43 es A y X₂ es T y X₃ es A.
- 30 La composición puede comprender sólo un polipéptido definido por la SEQ ID NO:43 o un fragmento o variante del mismo. Sin embargo, en otras realizaciones, la composición también comprende otros polipéptidos del grupo de las SEQ ID NO:1-51 y/o fragmentos de los mismos. Por tanto, la composición según la invención también puede comprender más de uno, tal como 2, por ejemplo 3, tal como 4, por ejemplo 5, tal como 6, por ejemplo 7, tal como 8, por ejemplo 9, tal como 10, tal como un número de polipéptidos y/o fragmentos en el intervalo de desde 5 hasta 10, o más de 10, tal como, por ejemplo, en el intervalo de desde 10 hasta 20, polipéptidos diferentes seleccionados del grupo de las SEQ ID NO:1-51 o fragmentos antigénicos o variantes de los mismos.
- 35 De manera similar, la composición puede comprender sólo un polinucleótido, un vector de expresión o un virus recombinante o una célula recombinante de la invención. Sin embargo, en otras realizaciones, la composición comprende más de un polinucleótido, un vector de expresión o un virus recombinante o una célula recombinante. Por tanto, la composición según la invención puede comprender más de uno, tal como 2, por ejemplo 3, tal como 4, por ejemplo 5, tal como 6, por ejemplo 7, tal como 8, por ejemplo 9, tal como 10, o más de 10, tal como, por ejemplo,
- 40 en el intervalo de desde 10 hasta 20, polinucleótidos, vectores de expresión o virus recombinantes o células recombinantes diferentes tal como se describen en el presente documento.

Además, en algunas realizaciones, una célula recombinante de la invención puede expresar más de un polipéptido del grupo de las SEQ ID NO:1-51 y/o más de un fragmento antigénico o variante de un polipéptido seleccionado del grupo de las SEQ ID NO:1-51. Por tanto, la composición según la invención puede comprender una célula

- recombinante que comprende más de uno tal como 2, por ejemplo 3, tal como 4, por ejemplo 5, tal como 6, por ejemplo 7, tal como 8, por ejemplo 9, tal como 10, tal como un número de polipéptidos y/o fragmentos antigénicos o variantes en el intervalo de desde 5 hasta 10, o más de 10, tal como, por ejemplo, en el intervalo de desde 10 hasta 20, polipéptidos diferentes seleccionados del grupo de las SEQ ID NO:1-51 o fragmentos antigénicos o variantes de los mismos. En otra realización, la composición para su uso en la invención comprende múltiples virus recombinantes o células recombinantes descritos en el presente documento.

Vacunas que comprenden polipéptidos

En una realización preferida, la invención se refiere a una composición definida en la reivindicación 1 para su uso como vacuna.

- Por consiguiente, en esta realización, se proporciona antigenicidad o inmunogenicidad mediante la administración directa de un polipéptido ubicado normalmente en la superficie de una célula de *Campylobacter jejuni*. En una realización particular, los polipéptidos se seleccionan de manera que la composición de vacuna comprende múltiples polipéptidos que pueden asociarse con diferentes moléculas de CMH, tales como diferentes moléculas de CMH de clase I. Preferiblemente, la composición para su uso como vacuna comprende polipéptidos y/o fragmentos que pueden asociarse con las moléculas de CMH de clase I que se producen más frecuentemente. En una realización particular de la invención, la composición comprende uno o más polipéptidos y/o fragmentos que pueden asociarse con una molécula de CMH de clase I y uno o más polipéptidos y/o fragmentos que pueden asociarse con una molécula de CMH de clase II. Por tanto, la composición de vacuna en algunas realizaciones puede producir una respuesta de células T citotóxicas específica y/o una respuesta de células T cooperadoras específica. La asociación con las moléculas de CMH puede determinarse, por ejemplo, tal como se describe en Andersen *et al.* (1999) Tissue Antigens 54:185; o en Tan *et al.* (1997) J. Immunol. Methods 209:25.

Adyuvantes y portadores inmunogénicos

- Preferiblemente, la composición para su uso como vacuna, es decir la composición de vacuna, de la presente invención comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como se describe en el presente documento en la sección "Composiciones para su uso en la invención".

- La composición puede comprender además un adyuvante. Los adyuvantes son sustancias cuyas mezcla en la composición de vacuna aumenta o modifica de otro modo la respuesta inmunitaria a un polipéptido u otro antígeno. Los adyuvantes podrían, por ejemplo, ser cualquiera de: $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$, $\text{AlNa}(\text{SO}_4)_2$, $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)$, sílice, alumbre, $\text{Al}(\text{OH})_3$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, caolín, carbón, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, muramil-dipéptidos, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-DMP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-iso-glutamina (CGP 11687, también denominado nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxisforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, también denominado MTP-PE), RIBI (MPL+TDM+CWS) en una emulsión de escualeno al 2%/Tween-80.RTM., lipopolisacáridos y derivados, incluyendo lípido A, adyuvante completo de Freund (FCA), adyuvantes incompletos de Freund, adyuvante 65 de Merck, polinucleótidos (por ejemplo, poli-IC y poli-AU ácidos), cera D de *Mycobacterium tuberculosis*, sustancias encontradas en *Corynebacterium parvum*, *Bordetella pertussis*, y miembros del género *Brucella*, liposomas u otras emulsiones lipídicas, Titermax, ISCOMS, Quil A, ALUN (véanse los documentos US 58767 y 5.554.372), derivados de lípido A, derivados de toxina del cólera, derivados de HSP, derivados de LPS, matrices peptídicas sintéticas o GMDP, interleucina 1, interleucina 2, Montanide ISA-51 y QS-21. Adyuvantes preferidos que van a usarse con la invención incluyen Montanide ISA-51 y QS-21. Montanide ISA-51 (Seppic, Inc.) es un adyuvante a base de aceite mineral análogo al adyuvante incompleto de Freund, que se administra normalmente como una emulsión. QS-21 (Antigenics; Aquila Biopharmaceuticals, Framingham, MA) es una saponina altamente purificada, soluble en agua que se manipula como una solución acuosa.

Las funcionalidades deseables de los adyuvantes que pueden usarse según la presente invención se enumeran en la tabla a continuación.

- Tabla 1 Modos de acción adyuvante

Acción	Tipo de adyuvante	Beneficio
1. Inmunomodulación	Generalmente proteínas o moléculas pequeñas que modifican la red de citocinas	Regulación por aumento de la respuesta inmune. Selección de Th1 o Th2
2. Presentación	Generalmente moléculas o complejos anfipáticos que interactúan con el inmunógeno en su conformación nativa	Aumento en la respuesta de anticuerpos neutralizantes. Mayor duración de la respuesta
3. Inducción de CTL	Partículas que pueden unirse o encerrar el inmunógeno y que pueden fusionarse con o alterar las membranas celulares	Procesamiento citosólico de la proteína que produce péptidos restringidos a clase 1 correctos

	Emulsiones w/o para la unión directa del péptido al CMH-1 de superficie celular	Proceso sencillo si se conoce(n) un péptido(s) promiscuo(s)
4. Direccionamiento	- Adyuvantes particulados que se unen al inmunógeno. Adyuvantes que saturan las células de Kupffer - Adyuvantes de hidratos de carbono dirigidos a receptores de lectina en macrófagos y DC	Uso eficaz del adyuvante y el inmunógeno Como anteriormente. También pueden determinar el tipo de respuesta si es de direccionamiento selectivo
5. Generación de depósito	- Emulsión w/o para corto plazo - Microesferas o nanoesferas para largo plazo	Eficiencia Potencial para vacuna de dosis única

Fuente: **John C. Cox y Alan Coulter**. Vaccine Febrero de 1997;15(3):248-56

Una composición de vacuna según la presente invención puede comprender más de un adyuvante diferente. También se contempla que el polipéptido de *Campylobacter* de la invención, o uno o más fragmentos del mismo, y el adyuvante pueden administrarse por separado en cualquier secuencia apropiada.

- 5 Frecuentemente, el adyuvante de elección es adyuvante incompleto o completo de Freund, u organismos de *B. pertussis* inactivados, usados por ejemplo en combinación con antígeno precipitado con alumbre. Se proporciona una discusión general de adyuvantes en Goding, Monoclonal Antibodies: Principles & Practice (2^{da} edición, 1986) en las páginas 61-63. Sin embargo, Goding observa que cuando el antígeno de interés es de bajo peso molecular, o es escasamente inmunogénico, se recomienda el acoplamiento a un portador inmunogénico (véase a continuación).
- 10 También se han sugerido que diversos extractos de saponina y citocinas son útiles como adyuvantes en las composiciones inmunogénicas. Recientemente, se ha propuesto usar factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), una citocina bien conocida, como un adyuvante (documento WO 97/28816).

- Además, una composición de vacuna de la invención puede comprender un portador inmunogénico tal como una estructura de andamiaje, por ejemplo una proteína o un polisacárido, con el que puede asociarse el polipéptido de *Campylobacter* o el fragmento del mismo. Un polipéptido de *Campylobacter*, o el fragmento antigénico o variante del mismo, presente en la composición de vacuna puede asociarse con un portador inmunogénico tal como, por ejemplo, una proteína. La unión o asociación del polipéptido a una proteína transportadora puede ser covalente o no covalente. Una proteína transportadora inmunogénica puede estar presente independientemente de un adyuvante. La función de una proteína transportadora puede ser, por ejemplo, aumentar el peso molecular de, en particular, fragmentos con el fin de aumentar su actividad o inmunogenicidad, para conferir estabilidad, aumentar la actividad biológica o aumentar la semivida sérica. Además, una proteína transportadora inmunogénica puede ayudar a presentar el polipéptido de *Campylobacter* o los fragmentos del mismo a las células T. Una proteína transportadora podría ser, pero sin limitarse a, hemocianina de lapa californiana, proteínas séricas tales como transferrina, albúmina sérica bovina, albúmina sérica humana, tiroglobulina u ovalbúmina, inmunoglobulinas, u hormonas, tales como insulina. El toxoide tetánico y/o toxoide diftérico también son portadores adecuados en una realización de la invención. Alternativa o adicionalmente, pueden añadirse dextranos, por ejemplo Sepharose. Aún en otra realización, puede añadirse una célula presentadora de antígeno tal como, por ejemplo, una célula dendrítica que puede presentar el polipéptido o un fragmento del mismo a una célula T para obtener el mismo efecto que una proteína transportadora.

- 30 Se han descrito métodos para la preparación de composiciones de vacuna, por ejemplo, en el documento US 5.470.958 y las referencias en ese documento. Una cantidad eficaz del componente polipeptídico de una composición de vacuna de la invención, si se inyecta, estará normalmente en el intervalo de desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 1000 µg, tal como, por ejemplo, desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 900 µg, por ejemplo desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 500 µg, para un sujeto humano, y generalmente en el intervalo de desde aproximadamente 0,01 hasta 10,0 µg/kg de peso corporal de un sujeto animal. Los intervalos indicados anteriormente son meramente indicativos y no deben interpretarse como limitativos de la presente invención.

- Una cantidad eficaz de un polipéptido antigénico de la invención puede ser una cantidad que puede provocar una respuesta inmunitaria humoral detectable en ausencia de un inmunomodulador. Para muchos inmunógenos, esto está en el intervalo de aproximadamente 5-100 µg para un sujeto humano. La cantidad apropiada de inmunógeno que va a usarse depende de la respuesta que se desea provocar. Además, la cantidad eficaz exacta variará necesariamente de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, la edad y el estado general del sujeto, la gravedad de la afección que va a tratarse, el modo de administración, etc. Por tanto, no siempre es posible especificar una cantidad eficaz exacta. Sin embargo, la cantidad eficaz apropiada la puede determinar un experto en la materia usando sólo experimentación de rutina o el conocimiento del estado de la técnica.

Composiciones de vacuna de ADN y composiciones de vacuna que comprenden virus recombinantes o células recombinantes

Las vacunas de ADN o ARN se refieren a la introducción de, por ejemplo, un determinante de polipéptido antigénico en un paciente sobreexpresando en las células del paciente, un constructo de polinucleótido que incluye secuencias de control de la expresión unidas operativamente a una secuencia que codifica para el polipéptido de interés, en el presente documento un polipéptido de SEQ ID NO:43 o un fragmento antigénico o variante del mismo tal como se define en la reivindicación 1. Puesto que tales fragmentos no pueden contener un codón de iniciación de metionina, se incluye opcionalmente un codón de este tipo como parte de las secuencias de control de la expresión. El constructo de polinucleótido puede ser un polinucleótido no replicante y lineal, un vector de expresión circular o un vector de expresión viral o plásmido de replicación autónoma. El constructo puede integrarse en el genoma del hospedador. Cualquier vector de expresión que puede transfectar una célula de mamífero puede usarse en los métodos de inmunización de un individuo según la presente invención. Los métodos para construir vectores de expresión se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook *et al.*, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, 2^{da} Edición, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989). Se prefieren composiciones que comprenden una pluralidad de genes que expresan múltiples polipéptidos seleccionados de SEQ ID NO:1-51 y/o múltiples fragmentos antigénicos de la invención, permitiendo de ese modo la vacunación simultánea contra una variedad de dianas preseleccionadas.

Las vacunas también pueden prepararse incorporando un polinucleótido que codifica para un polipéptido antigénico específico de interés en un vector vivo pero inocuo, tal como un virus o una célula, tal como una célula de *E. coli* o *Salmonella* de virulencia atenuada o reducida. El virus recombinante o célula recombinante inocuos se inyectan en el receptor destinado. Una célula recombinante de este tipo puede añadirse viva o muerta. Si está viva, el organismo recombinante puede replicar en el hospedador mientras que se produce y presenta el polipéptido antigénico al sistema inmunitario del hospedador. Se contempla que este tipo de vacuna puede ser más eficaz que el tipo de vacuna no replicativo. Para que una vacuna de este tipo sea satisfactoria, el organismo vector debe ser viable, y o bien ser no virulento de manera natural o bien tener un fenotipo de virulencia atenuada o reducida.

Se han descrito estrategias para la vacunación usando bacterias atenuadas y cepas bacterianas adecuadas para su uso en las mismas, por ejemplo, en Makino *et al.* (2001) *Microb. Pathog.* 31:1-8; Gentschev *et al.* (2002) *Int. J. Med. Microbiol.* 291:577-582; Turner *et al.* (2001) *Infect. Immun.* 69:4969-4979; el documento WO99/49026; y el documento WO03/022307.

Ejemplos adicionales de vectores que pueden aplicarse son vectores que comprenden por ejemplo, retrovirus, tal como se da a conocer en los documentos WO 90/07936, WO 91/02805, WO 93/25234, WO 93/25698 y WO 94/03622, adenovirus, tal como se da a conocer en Berkner, *Biotechniques* 6:616-627, 1988; Li *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 4:403-409, 1993; Vincent *et al.*, *Nat. Genet.* 5:130-134, 1993; y Kolls *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:215-219, 1994), virus de la viruela, tal como se da a conocer en el documento U.S. 4.769.330; la patente estadounidense n.º 5.017.487; y el documento WO 89/01973, ADN desnudo tal como se da a conocer en el documento WO 90/11092, una molécula de polinucleótido complejada a una molécula policatiónica tal como se da a conocer en el documento WO 93/03709, y polinucleótidos asociados con liposomas tal como se da a conocer en Wang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851, 1987. En determinadas realizaciones, el ADN puede ligarse a adenovirus muerto o inactivado tal como se da a conocer en Curiel *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 3:147-154, 1992; Cotton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6094, 1992. Otras composiciones adecuadas incluyen ligandos de ADN tal como se dan a conocer en Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 264: 16985-16987, 1989), y combinaciones de lípido-ADN tal como se da a conocer en Felgner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417, 1989). Además, puede aumentarse la eficiencia de la captación de ADN desnudo en las células, recubriendo el ADN sobre perlas de látex biodegradables.

Los vectores de vacuna comprenden preferiblemente un promotor adecuado que se une operativamente a la secuencia de polinucleótido que codifica para el polipéptido inmunogénico. En la invención puede usarse cualquier promotor que puede dirigir un alto nivel de iniciación de la transcripción en las células diana. Por tanto, también pueden usarse promotores no específicos de tejido, tales como los promotores de citomegalovirus (DeBernardi *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9257-9261 [1991], y referencias en ese documento), metalotionina I de ratón (Hammer *et al.*, *J Mol Appl Gen* 1:273-288 [1982]), timidina cinasa de VHS (McKnight, *Cell* 31:355-365 [1982]), y promotores tempranos de SV40 (Benioist *et al.*, *Nature* 290:304-310 [1981]).

Métodos de vacunación

En un aspecto principal adicional, la presente invención se refiere al uso de una composición definida en la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para la inmunización de un animal o ser humano frente a infecciones por *Campylobacter jejuni*. La inmunización induce preferiblemente una respuesta inmunitaria protectora. El animal puede ser cualquier ave o mamífero, por ejemplo una gallina, un pato, un pavo, una vaca o un cerdo. Poblaciones objetivo particulares de seres humanos pueden ser individuos de poblaciones en riesgo, tales como la población de niños hasta los 4 años de edad, la población de personas en países industrializados o la población de personas no inmunizadas o semiinmunes que viajan a países en vías de desarrollo.

Los modos de administración de la composición según la invención incluyen, pero no se limitan a administración sistémica, tal como administración intravenosa o subcutánea, administración intradérmica, administración intramuscular, administración intranasal, administración oral, y generalmente cualquier forma de administración mucosa.

- 5 El efecto inmunogénico según la presente invención puede medirse, por ejemplo, mediante ensayo de anticuerpos en muestras de suero, por ejemplo, mediante un RIA. Además, el efecto puede determinarse *in vivo*, midiendo por ejemplo una capacidad de respuesta de células T aumentada para polipéptidos antigénicos dependientes de células T, siendo característica la capacidad de repuesta aumentada de una potenciación de una respuesta inmunitaria normal para tales polipéptidos antigénicos. También puede medirse un efecto inmunoestimulante como una
10 producción potenciada de células T de, en particular, IL-2, IL-3, IFN- γ y/o GM-CSF. Por tanto, pueden identificarse fácilmente polipéptidos o fragmentos de los mismos que tienen un potencial para provocar una respuesta inmunitaria potenciada examinando la producción potenciada de IL-2, IL-3, IFN- γ o GM-CSF por las células T. Young *et al.* (2000) En: *Campylobacter*, 2ª ed. Ed. de Nachamkin y Blaser, American Society for Microbiology, págs. 287-301 también describen una serie de modelos en animales adecuados que pueden usarse en la evaluación de la eficacia
15 de estrategias y composiciones terapéuticas y preventivas. Se han descrito varios aspectos relacionados con la vacunación contra *Campylobacter*, incluyendo las posibles poblaciones objetivo, modelos en animales y estrategias de vacunación por Scott y Tribble (2000) En: *Campylobacter*, 2ª ed. Ed. de Nachamkin y Blaser, American Society for Microbiology, págs. 303-319).

- Los polinucleótidos y vectores de expresión descritos en el presente documento pueden introducirse en células
20 diana *in vivo* o *in vitro* mediante cualquier método convencional: por ejemplo, como ADN desnudo (Donnelly *et al.*, Annu Rev Immunol 15:617-648 [1997]), incorporado en ISCOMS, liposomas, o eritrocitos fantasmas, o mediante transferencia biolística, precipitación con calcio o electroporación. Alternativamente, se puede emplear un vector basado en virus como medio para introducir el polinucleótido que codifica para el polipéptido de interés en las células del animal o ser humano. Los vectores virales preferidos incluyen los derivados de virus de la hepatitis de
25 replicación defectuosa (por ejemplo, VHB y VHC), retrovirus (véanse, por ejemplo, el documento WO89/07136; y Rosenberg *et al.*, N Eng J Med 323 (9):570-578 [1990]), adenovirus (véase, por ejemplo, Morsey *et al.*, J Cell Biochem, Supl. 17E [1993]), virus adenoasociados (Kotin *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 87:2211-2215 [1990]), virus del herpes simple de replicación defectuosa (VHS; Lu *et al.*, Abstract, página 66, Abstracts of the Meeting on Gene Therapy, 22-26 de septiembre de 1992, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.), virus de la viruela del canario, y cualquier versión modificada de estos vectores. Pueden cultivarse y clonarse células transfectadas *in vitro*, si se desea, antes de la introducción en el paciente.

- Además de los procedimientos *in vivo* directos, pueden usarse procedimientos *ex vivo* en los que se extraen las células de un animal, se modifican y se colocan en el mismo u otro animal. Será evidente que puede utilizarse
35 cualquiera de las composiciones indicadas anteriormente para la introducción de polipéptidos antigénicos o polinucleótidos que codifican para los mismos según la invención en células de tejido en un contexto *ex vivo*. Los protocolos para métodos de captación virales, físicos y químicos se conocen bien en la técnica. Por tanto, como alternativa a la administración de un polipéptido de la invención o un vector que puede expresar un polipéptido de este tipo directamente en el paciente, pueden extraerse células T cooperadoras del paciente; estimular esas células T *ex vivo* usando el mismo vector o polipéptido antigénico; e introducir las células T cooperadoras estimuladas en el
40 mismo paciente.

Anticuerpos y métodos para producir los anticuerpos de la invención

En una realización principal adicional, la composición para su uso como medicamento comprende un anticuerpo que puede unirse a un polipéptido definido por la SEQ ID NO:43. Un medicamento de este tipo puede usarse para la terapia con anticuerpos, tal como la inmunización pasiva de un individuo que la necesita.

- 45 En otro aspecto principal, la invención se refiere a un anticuerpo que puede unirse, preferiblemente unirse específicamente, a una célula de *Campylobacter jejuni* intacta y que puede unirse, preferiblemente unirse específicamente, a un polipéptido seleccionado del polipéptido de SEQ ID NO:43 y/o un fragmento y/o una variante del mismo tal como se define en la reivindicación 1.

- Anticuerpos preferidos son los que se unen con una constante de disociación o Kd inferior a 5×10^{-6} M, tal como inferior a 10^{-6} M, por ejemplo inferior a 5×10^{-7} M, tal como inferior a 10^{-7} M, por ejemplo inferior a 5×10^{-8} M, tal como inferior a 10^{-8} M, por ejemplo inferior a 5×10^{-9} M, tal como inferior a 10^{-9} M, por ejemplo inferior a 5×10^{-10} M, tal como inferior a 10^{-10} M, por ejemplo inferior a 5×10^{-11} M, tal como inferior a 10^{-11} M, por ejemplo inferior a 5×10^{-12} M, tal como inferior a 10^{-12} M, por ejemplo inferior a 5×10^{-13} M, tal como inferior a 10^{-13} M, por ejemplo inferior a 5×10^{-14} M, tal como inferior a 10^{-14} M, por ejemplo inferior a 5×10^{-15} M, o inferior a 10^{-15} M. Pueden determinarse
55 las constantes de unión usando métodos bien conocidos en la técnica, tales como ELISA (por ejemplo tal como se describe en Orosz y Ovadi (2002) J. Immunol. Methods 270:155-162) o análisis de resonancia de plasmón superficial.

Los anticuerpos pueden usarse para la inmunización pasiva de mamíferos, preferiblemente seres humanos, más preferiblemente pacientes inmunocomprometidos. Puede realizarse un tratamiento con anticuerpos para curar o prevenir infecciones por *Campylobacter jejuni*.

Los anticuerpos de la invención incluyen los siguientes grupos mecanísticos preferidos:

- 5 1. Anticuerpos inhibidores de la función que actúan como agente antibacteriano (afectan a la viabilidad de la bacteria). Tales anticuerpos debe ser eficaces a pesar del estado inmunitario del paciente. Preferiblemente, tales anticuerpos pueden reducir el crecimiento de *Campylobacter jejuni in vitro* hasta menos del 50%, tal como menos del 25%, por ejemplo menos del 10%, tal como menos del 5% de un control sin anticuerpo añadido.
- 10 2. Anticuerpos opsonizantes que se diseñan para potenciar la destrucción fagocítica. La eficacia de tales anticuerpos puede depender del estado inmunitario del paciente, pero es muy posible que potencien la destrucción fagocítica incluso en pacientes comprometidos.
- 15 3. Anticuerpos conjugados a un resto terapéutico tal como una toxina o un agente bactericida, por ejemplo, ricina o radioisótopos. Las técnicas para conjugar un resto terapéutico a anticuerpos se conocen bien, véase, por ejemplo Thorpe *et al.*(1982) Immunol. Rev. 62, 119-158. Estos anticuerpos también deben ser eficaces independientemente del estado inmunitario del paciente.

Un anticuerpo con o sin un resto terapéutico conjugado al mismo, puede usarse como agente terapéutico que se administra solo o en combinación con agentes quimioterápicos u otros agentes terapéuticos.

En una realización, los anticuerpos de la invención son opsonizantes así como inhibidores de la función. En otra realización, los anticuerpos de la invención son opsonizantes pero no inhibidores de la función. Este último grupo de anticuerpos, por ejemplo, pueden ser anticuerpos dirigidos contra un polipéptido diana que no es esencial para la viabilidad de *Campylobacter*.

En otro aspecto principal, la invención da a conocer un método para producir anticuerpos frente a un polipéptido definido por la SEQ ID NO:43 en un animal no humano, en el que los anticuerpos pueden unirse a una célula de *Campylobacter jejuni* intacta, comprendiendo el método las etapas de

- 25 a. proporcionar
 - un polipéptido que consiste en la SEQ ID NO:43, o que comprende un fragmento antigénico o variante de dicha secuencia tal como se define en la reivindicación 1,
 - un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica para dicho polipéptido,
 - un vector de expresión que comprende una secuencia que codifica para dicho polipéptido, o
 - 30 - un virus recombinante o una célula recombinante que comprende dicho polinucleótido o dicho vector de expresión,
- b. introducir una composición que comprende dicho polipéptido, polinucleótido, vector, virus recombinante o célula recombinante en dicho animal,
- c. producir anticuerpos en dicho animal,
- 35 d. aislar y purificar opcionalmente los anticuerpos, y
- e. seleccionar los anticuerpos que pueden unirse a una célula de *Campylobacter jejuni* intacta.

Los métodos anteriores se realizan preferiblemente en un animal transgénico que puede producir anticuerpos humanos. En una realización preferida adicional, los métodos anteriores son no terapéuticos.

Anticuerpos monoclonales/policlonales

- 40 Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales o mezclas de anticuerpos monoclonales. En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo. Los anticuerpos monoclonales (AcM) son anticuerpos en los que cada molécula de anticuerpo es similar y por tanto reconoce el mismo epítipo. El anticuerpo puede ser cualquier clase de anticuerpo, sin embargo, es preferiblemente un anticuerpo de IgG o IgA.
- 45 En general, los anticuerpos monoclonales se producen mediante una línea celular de hibridoma. Los métodos de preparación de anticuerpos monoclonales y células de hibridoma que sintetizan anticuerpos los conocen bien los expertos en la materia. Pueden prepararse hibridomas productores de anticuerpos, por ejemplo, mediante la fusión de un linfocito B productor de anticuerpos con una línea celular inmortalizada. Un anticuerpo monoclonal puede producirse mediante las siguientes etapas. Se inmuniza un animal con un antígeno tal como un polipéptido de longitud completa o un fragmento del mismo. La inmunización se lleva a cabo normalmente administrando el
- 50

antígeno a un mamífero inmunológicamente competente en una cantidad inmunológicamente eficaz, es decir, una cantidad suficiente para producir una respuesta inmunitaria. Preferiblemente, el mamífero es un roedor tal como un conejo, rata o ratón. Entonces, se mantiene el mamífero en un programa de inmunización de refuerzo durante un periodo de tiempo suficiente para que el mamífero genere moléculas de anticuerpo de alta afinidad. Se extrae una suspensión de células productoras de anticuerpos de cada mamífero inmunizado que secreta el anticuerpo deseado. Tras un tiempo suficiente para generar anticuerpos de alta afinidad, se sacrifica el animal (por ejemplo, ratón) y se obtienen los linfocitos productores de anticuerpos de uno o más de los ganglios linfáticos, bazo y sangre periférica. Se prefieren las células de bazo, y pueden separarse de manera mecánica en células individuales en un medio fisiológico usando métodos bien conocidos por un experto en la materia. Se immortalizan las células productoras de anticuerpo mediante fusión a las células de una línea de mieloma de ratón. Los linfocitos de ratón proporcionan un alto porcentaje de fusiones estables con mielomas homólogos de ratón, sin embargo, también pueden usarse células somáticas de rata, conejo y rana. Se immortalizan células de bazo de los animales productores de anticuerpos deseados mediante fusión con células de mieloma, generalmente en presencia de un agente de fusión tal como polietilenglicol. Cualquiera de varias líneas celulares de mieloma adecuadas como pareja de fusión pueden ser, por ejemplo, las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14, disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Rockville, Md.

También pueden generarse anticuerpos monoclonales mediante otros métodos bien conocidos por los expertos en la materia de la tecnología del ADN recombinante. Se ha desarrollado un método alternativo, denominado método de "presentación de anticuerpos combinatorios", para identificar y aislar fragmentos de anticuerpo que tienen una especificidad particular, y pueden utilizarse para producir anticuerpos monoclonales.

Un anticuerpo policlonal es una mezcla de moléculas de anticuerpo que reconocen un antígeno dado específico, por tanto, los anticuerpos policlonales pueden reconocer diferentes epítomos dentro de, por ejemplo, un polipéptido. En general, se purifican los anticuerpos policlonales del suero de un mamífero, que previamente se ha inmunizado con el antígeno. Los anticuerpos policlonales pueden prepararse, por ejemplo, mediante cualquiera de los métodos descritos en Antibodies: A Laboratory Manual, By Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. Los anticuerpos policlonales pueden derivarse de cualquier especie de mamífero adecuada, por ejemplo de ratones, ratas, conejos, burros, cabras y ovejas.

Especificidad

Los anticuerpos de la invención pueden ser monoespecíficos hacia los polipéptidos de SEQ ID NO:43. En otra realización, el anticuerpo es biespecífico o multiespecífico teniendo al menos una parte que es también específica hacia cualquiera de los polipéptidos de SEQ ID NO:1-51.

Los anticuerpos monoespecíficos pueden ser monovalentes, es decir, que tienen sólo un dominio de unión. Para un anticuerpo monovalente, las secuencias de aminoácidos del dominio constante de inmunoglobulina comprenden preferiblemente las partes estructurales de una molécula de anticuerpo conocida en la técnica como CH1, CH2, CH3 y CH4. Se prefieren aquéllas que se conocen en la técnica como C_L. Además, en la medida en que el dominio constante puede ser un dominio constante de cadena o bien pesada o bien ligera (C_H o C_L, respectivamente), la presente invención contemplan una variedad de composiciones de anticuerpos monovalentes. Por ejemplo, los dominios constantes de cadena ligera pueden formar puentes disulfuro con o bien otro dominio constante de cadena ligera, o bien con un dominio constante de cadena pesada. Por el contrario, un dominio constante de cadena pesada puede formar dos puentes disulfuro independientes, que permiten la posibilidad de formar puentes disulfuro tanto con otra cadena pesada como con una cadena ligera, o formar polímeros de cadenas pesadas. Por tanto, en otra realización, la invención contempla una composición que comprende un polipéptido monovalente en el que el dominio de cadena constante C tiene un residuo de cisteína que puede formar al menos un puente disulfuro, comprendiendo la composición al menos dos polipéptidos monovalentes unidos de manera covalentes por dicho puente disulfuro.

En otra realización de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo multivalente que tiene al menos dos dominios de unión. Los dominios de unión pueden tener especificidad para el mismo ligando o para diferentes ligandos.

Multiespecificidad, incluyendo biespecificidad

En una realización preferida, la invención se refiere a anticuerpos multiespecíficos, que tienen afinidad por y que pueden unirse específicamente a al menos dos entidades diferentes.

En una realización, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico, que lleva al menos dos dominios de unión diferentes, al menos uno de los cuales tiene su origen en anticuerpo. Una molécula biespecífica de la invención también puede ser una molécula biespecífica de cadena sencilla. Las moléculas multiespecíficas también pueden ser moléculas de cadena sencilla o pueden comprender al menos dos moléculas de cadena sencilla. Los anticuerpos multiespecíficos, incluyendo biespecíficos, pueden producirse mediante cualquier manera conocida por el experto en la materia. Se han desarrollado varios enfoques tales como los descritos en los documentos WO 94/09131; WO 94/13804; WO 94/13806 o las patentes estadounidenses n^{os} 5.260.203; 5.455.030; 4.881.175; 5.132.405; 5.091.513; 5.476.786; 5.013.653; 5.258.498; y 5.482.858.

El uso de un anticuerpo biespecífico o multiespecífico según la invención la invención ofrece varias ventajas en comparación con los anticuerpos mono-específicos/monovalentes. Un anticuerpo biespecífico/multiespecífico tiene un primer dominio de unión que puede reconocer específicamente y unir cualquiera de los polipéptidos de *Campylobacter jejuni* de SEQ ID NO:1-51, mientras que el/los otro(s) dominio(s) de unión puede(n) usarse para otros fines. En una realización, al menos se usa otro dominio de unión para la unión a un polipéptido de *Campylobacter jejuni*, tal como la unión a otro epítipo en el mismo polipéptido de *Campylobacter jejuni* como el primer dominio de unión. De ese modo puede aumentarse la especificidad para *Campylobacter jejuni* así como aumentar la avidéz del anticuerpo. En otra realización, el al menos otro dominio de unión puede usarse para unirse específicamente a una célula de mamífero, tal como una célula humana. Se prefiere que el al menos otro dominio de unión pueda unirse a una célula inmunoactiva, tal como un leucocito, un macrófago, un linfocito, una célula basófila y/o una célula eosinófila, con el fin de aumentar el efecto del anticuerpo en un método terapéutico. Esto puede lograrse estableciendo que el al menos otro dominio de unión pueda unirse específicamente a una proteína de mamífero, tal como una proteína humana, tal como una proteína seleccionada de cualquiera de las proteínas de diferenciación del grupo (CD), En particular, CD64 y/o CD89.

15 Anticuerpos humanizados

No siempre se desea usar anticuerpos no humanos para la terapia en seres humanos, puesto que los epítopos "foráneos" no humanos pueden provocar una respuesta inmunitaria en el individuo que va a tratarse. Para eliminar o minimizar los problemas asociados con anticuerpos no humanos, se desea modificar mediante ingeniería genética derivados de anticuerpo quimérico, es decir, moléculas de anticuerpo "humanizadas" que combinan los determinantes de unión de región variable Fab no humana con una región constante humana (Fc). Tales anticuerpos se caracterizan por una especificidad antigénica y afinidad equivalentes de los anticuerpos monoclonales y policlonales descritos anteriormente, y son menos inmunogénicos cuando se administran a seres humanos, y por tanto es más probable que los tolere el individuo que va a tratarse.

Por consiguiente, en una realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos humanizados son en general anticuerpos quiméricos que comprenden regiones derivadas de un anticuerpo humano y regiones derivadas de un anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo de roedor. La humanización (también denominada remodelación o injerto de CDR) es una técnica bien establecida para reducir la inmunogenicidad de anticuerpos monoclonales (AcM) procedentes de fuentes xenogénicas (comúnmente roedores), que aumenta la homología con una inmunoglobulina humana, y para mejorar su activación del sistema inmunitario humano. Por tanto, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que se sustituyen algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de región de entramado por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

Es importante que los anticuerpos humanizados retengan una alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, según un método preferido, se preparan anticuerpos humanizados mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulinas tridimensionales están disponibles comúnmente y los expertos en la materia están familiarizados con los mismos. Están disponibles programas informáticos que ilustran y visualizan probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis del posible papel de determinados residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, pueden seleccionarse y combinarse residuos del receptor e importar secuencias de modo que se maximice la característica deseada del anticuerpo, tal como un aumento de la afinidad por el/los antígeno(s) diana, aunque son los residuos de CDR los que influyen directa y lo más sustancialmente sobre la unión a antígenos.

Un método para humanizar AcM se refiere a la producción de anticuerpos quiméricos en los que se fusiona un sitio de unión a antígenos que comprende los dominios variables completos de un anticuerpo a dominios constantes derivados de un segundo anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo humano. Los métodos para llevar a cabo tales procedimientos de quimerización se describen, por ejemplo, en los documentos EP-A-0 120 694 (Celltech Limited), EP-A-0 125 023 (Genentech Inc.), EP-A-0 171 496 (Res. Dev. Corp. Japan), EP-A-0173494 (Universidad de Stanford) y EP-A-0 194 276 (Celltech Limited).

El anticuerpo humanizado de la presente invención puede prepararse mediante cualquier método que pueda sustituir al menos una parte de una CDR de un anticuerpo humano por una CDR derivada de un anticuerpo no humano. Winter describe un método que puede usarse para preparar los anticuerpos humanizados de la presente invención (solicitud de patente británica GB 2188638A).

Como ejemplo, los anticuerpos humanizados de la presente invención pueden producirse mediante el siguiente procedimiento:

- (a) construir, mediante técnicas convencionales, un vector de expresión que contiene un operón con una secuencia de ADN que codifica para una cadena pesada de anticuerpo en la que las CDR y tales partes mínimas de la

región de entramado de dominio variable que se requieren para retener la especificidad de unión a anticuerpos se derivan de una inmunoglobulina no humana, y las partes restantes de la cadena de anticuerpo se derivan de una inmunoglobulina humana;

- (b) construir, mediante técnicas convencionales, un vector de expresión que contiene un operón con una secuencia de ADN que codifica para una cadena ligera de anticuerpo complementaria en la que las CDR y tales partes mínimas de la región de entramado de dominio variable que se requieren para retener la especificidad de unión a anticuerpos del donante se derivan de una inmunoglobulina no humana, y las partes restantes de la cadena de anticuerpo se derivan de una inmunoglobulina humana;
- (c) transfectar los vectores de expresión en una célula hospedadora mediante técnicas convencionales; y
- (d) cultivar la célula transfectada mediante técnicas convencionales para producir el anticuerpo humanizado.

La célula hospedadora puede cotransfectarse con los dos vectores de la invención, conteniendo el primer vector un operón que codifica para un polipéptido derivado de cadena ligera y conteniendo el segundo vector un operón que codifica para un polipéptido derivado de cadena pesada. Los dos vectores contienen diferentes marcadores de selección, pero por lo demás, aparte de las secuencias codificantes de cadena ligera y pesada de anticuerpo, son preferiblemente idénticos, para garantizar, en la medida de lo posible, una expresión equitativa de los polipéptidos de cadena ligera y pesada. Alternativamente, puede usarse un único vector, incluyendo el vector las secuencias que codifican para polipéptidos tanto de cadena ligera como pesada. Las secuencias codificantes para las cadenas ligera y pesada pueden comprender ADNc o ADN genómico o ambos.

La célula hospedadora usada para expresar el anticuerpo alterado de la invención puede ser o bien una célula bacteriana tal como *Escherichia coli*, o bien una célula eucariota. En particular, puede usarse una célula de mamífero de un tipo bien definido para este fin, tal como una célula de mieloma o una célula de ovario de hámster chino.

Los métodos generales mediante los que pueden construirse los vectores de la invención, los métodos de transfección requeridos para producir la célula hospedadora de la invención y los métodos de cultivo requeridos para producir el anticuerpo de la invención a partir de tales células hospedadoras son todos técnicas convencionales. Asimismo, una vez producidos, los anticuerpos humanizados de la invención puede purificarse según procedimientos convencionales.

Anticuerpos humanos

En una realización más preferida, la invención se refiere a un anticuerpo, en el que el dominio de unión lo lleva un anticuerpo humano, es decir en el que los anticuerpos tienen un mayor grado de secuencias peptídicas humanas que los anticuerpos humanizados.

Pueden generarse anticuerpos AcM humanos dirigidos contra proteínas humanas usando ratones transgénicos que llevan el sistema inmunitario humano en vez del sistema murino. Se usan esplenocitos de estos ratones transgénicos inmunizados con el antígeno de interés para producir hibridomas que secretan AcM humanos con afinidades específicas por epítopos de una proteína humana (véanse, por ejemplo, Wood *et al.* solicitud internacional WO 91/00906, Kuchlerapati *et al.* publicación PCT WO 91/10741; Lonberg *et al.* solicitud internacional WO 92/03918; Kay *et al.* solicitud internacional 92/03917; Lonberg, N. *et al.* 1994 Nature 368:856-859; Green, L. L. *et al.* 1994 Nature Genet. 7:13-21; Morrison, S. L. *et al.* 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855; Bruggeman *et al.* 1993 Year Immunol 7:33-40; Tuaillon *et al.* 1993 PNAS 90:3720-3724; Bruggeman *et al.* 1991 Eur J Immunol 21:1323-1326). Tales ratones transgénicos están disponibles de Abgenix, Inc., Fremont, Calif., y Medarex, Inc., Annandale, N.J. Se ha descrito que la delección homocigota del gen de la región de unión de cadena pesada de anticuerpo (IH) en ratones mutantes de línea germinal y quimérica da como resultado una completa inhibición de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de línea germinal humana en tales ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos con la exposición al antígeno. Véanse, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature 362:255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immunol. 7:33 (1993); y Duchosal *et al.* Nature 355:258 (1992). Los anticuerpos humanos también pueden derivarse de bibliotecas de presentación en fago (Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol. 227: 381 (1992); Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991); Vaughan, *et al.*, Nature Biotech 14:309 (1996)).

Además se han descrito métodos adecuados para producir anticuerpos monoclonales humanos en los documentos WO 03/017935, WO 02/100348, US 2003 091561 y US 2003 194403.

Fragmentos de unión de anticuerpos

En una realización de la invención, el anticuerpo es un fragmento de un anticuerpo, preferiblemente un fragmento de unión a antígenos o una región variable. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo útiles con la presente invención incluyen Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv. La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígenos idénticos, denominados el fragmento Fab, cada uno con un único sitio de unión a antígenos, y un

fragmento residual "Fc", denominado así por su capacidad para cristalizar rápidamente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos fragmentos de unión a antígenos que pueden reticular el antígeno, y otro fragmento (que se denomina pFc'). Fragmentos adicionales pueden incluir diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv difieren de los anticuerpos completos en que los fragmentos de anticuerpo sólo llevan un único sitio de unión a antígenos. Se han preparado fragmentos recombinantes con dos sitios de unión de varias maneras, por ejemplo, mediante reticulación química de residuos de cisteína introducidos en el extremo C-terminal del VH de un Fv (Cumber *et al.*, 1992), o en el extremo C-terminal del VL de un scFv (Pack y Pluckthun, 1992), o a través de residuos de cisteína bisagra de los Fab' (Carter *et al.*, 1992).

Los fragmentos de anticuerpo preferidos retienen parte o esencialmente la totalidad de la capacidad de un anticuerpo para unirse selectivamente con su antígeno. Ciertos fragmentos preferidos se definen tal como sigue:

- (1) Fab es el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígenos monovalente de una molécula de anticuerpo. Puede producirse un fragmento Fab mediante la digestión de un anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una parte de una cadena pesada.
- (2) Fab' es el fragmento de una molécula de anticuerpo y puede obtenerse tratando el anticuerpo completo con pepsina, seguido por reducción, para producir una cadena ligera intacta y una parte de la cadena pesada. Se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos cuantos residuos en el extremo carboxilo-terminal del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo.
- (3) (Fab')₂ es el fragmento de un anticuerpo que puede obtenerse tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin posterior reducción. F(ab')₂ es a un dímero de dos fragmentos Fab' mantenidos juntos mediante dos enlaces disulfuro.
- (4) Fv es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio de unión y reconocimiento de antígenos completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en una fuerte asociación, no covalente (dímero V_H-V_L). Es en esta configuración en la que interaccionan las tres CDR de cada dominio variable para definir un sitio de unión a antígenos en la superficie del dímero V_H-V_L. Conjuntamente, las seis CDR confieren especificidad de unión a antígenos al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad para reconocer y unir el antígeno, aunque a una afinidad menor que el sitio de unión completo.

En una realización de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla, definido como una molécula modificada mediante ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, unidas mediante un conector de polipéptido adecuado como una molécula de cadena sencilla fusionada genéticamente. Tales anticuerpos de cadena sencilla también se denominan fragmentos de anticuerpo "sFv" o "Fv de cadena sencilla". Generalmente, el polipéptido de Fv comprende además un conector de polipéptido entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígenos.

Los fragmentos de anticuerpo según la invención pueden producirse en cualquier manera adecuada conocida por el experto en la materia. Ya se han desarrollado varios sistemas de expresión microbiana para producir fragmentos de anticuerpo activos, por ejemplo se ha descrito la producción de Fab en diversos hospedadores, tales como *E. coli* o levadura. Los fragmentos pueden producirse como Fab o como Fv, pero se ha mostrado adicionalmente que pueden unirse genéticamente un V_H y un V_L en cualquier orden mediante un conector de polipéptido flexible, combinación que se conoce como scFv.

Composiciones para su uso en la invención

En una realización preferida de la composición para su uso como medicamento, dicha composición comprende, además del componente activo, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" usada en relación con composiciones o vehículos representa que los materiales pueden administrarse a o en un ser humano o animal sin la producción de efectos fisiológicos indeseables tales como náuseas, mareo, molestias gástricas y similares.

La preparación de una composición que contiene principios activos disueltos o dispersos en la misma se entiende bien en la técnica. A menudo se preparan tales composiciones como componentes inyectables estériles o bien como disoluciones o bien como suspensiones líquidas, acuosas o no acuosas, sin embargo, también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para la disolución, o suspensión, en líquido antes de su uso. La preparación también puede emulsionarse. El principio activo puede mezclarse con vehículos que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo y en cantidades adecuadas para su uso en los métodos descritos en el presente documento. Vehículos adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y

combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH y similares que potencian la eficacia del principio activo.

Las composiciones de la presente invención pueden incluir sales farmacéuticamente aceptables de los componentes en las mismas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del polipéptido) que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína y similares.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables se conocen bien en la técnica. Vehículos líquidos a modo de ejemplo son disoluciones acuosas estériles que no contienen materiales además de los principios activos y agua, o contienen un tampón tal como fosfato de sodio a un valor de pH fisiológico, solución salina fisiológica o ambos, tal como solución salina tamponada con fosfato. Todavía adicionalmente, los vehículos acuosos pueden contener más de una sal tampón, así como sales tales como cloruros de sodio y potasio, dextrosa, propilenglicol, polietilenglicol y otros solutos. Las composiciones líquidas también pueden contener fases líquidas además de y con la exclusión de agua. Tales fases líquidas adicionales a modo de ejemplo son glicerina, aceites vegetales tales como aceite de semilla de algodón, ésteres orgánicos tales como oleato de etilo y emulsiones de agua-aceite.

Una composición que contiene un polipéptido o anticuerpo de la presente invención contiene preferiblemente una cantidad de al menos el 0,1 por ciento en peso de polipéptido o anticuerpo por peso de composición farmacéutica total. Un tanto por ciento en peso es una razón en peso de polipéptido o anticuerpo con respecto a composición total. Por tanto, por ejemplo, el 0,1 por ciento en peso es 0,1 gramos de polipéptido o anticuerpo por 100 gramos de composición total.

La composición también puede ser un kit en parte incluyendo además un agente antibiótico, tal como antibióticos seleccionados de β -lactamas, cefalosporinas, penicilinas, aminoglicósidos, antibióticos macrólidos (eritromicina, claritromicina o azitromicina) y antibióticos de fluoroquinolona (ciprofloxacino, levofloxacino, gatifloxacino o moxifloxacino) y/o incluyendo un agente inmunoestimulante, tal como citocinas, interferones, factores de crecimiento, por ejemplo GCSF o GM-CSF. El kit en parte puede usarse para la administración simultánea, secuencial o separada.

Polipéptidos de la invención

Fragmentos de la invención

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un fragmento de SEQ ID NO:43 definido por cualquiera de las SEQ ID NO 74-81.

Preferiblemente, los fragmentos de la invención están expuestos en superficie en una célula de *Campylobacter jejuni* intacta u otra célula cuando se expresan de manera recombinante en la misma. La exposición en superficie puede determinarse, por ejemplo, usando un anticuerpo monoclonal específico para dicho fragmento, por ejemplo tal como se describe en Singh *et al.* (2003) Infect. Immun. 71:3973-3946. También se prefieren fragmentos que pueden inducir anticuerpos que pueden unirse específicamente a una célula de *Campylobacter jejuni* intacta. Esto puede determinarse generando anticuerpos monoclonales usando dicho fragmento y la posterior caracterización de la unión de anticuerpos individuales a células intactas, por ejemplo tal como se describe en Singh *et al.* (2003) Infect. Immun. 71:3973-3946.

El polipéptido de longitud completa de SEQ ID NO:43 así como los fragmentos de la invención pueden producirse de manera recombinante mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica. Células huésped adecuados pueden ser células de mamífero, por ejemplo células CHO, COS o HEK293. Alternativamente, pueden usarse células de insecto, células bacterianas o células fúngicas. Los expertos en la materia conocen bien métodos para la expresión heteróloga de secuencias de polinucleótido en los tipos celulares enumerados anteriormente y la posterior purificación de los polipéptidos producidos, por ejemplo usando una secuencia de etiqueta, como una cola de histidina, que puede eliminarse tras la purificación. Alternativamente, pueden producirse de manera sintética fragmentos de la invención.

Variantes de la invención

En un aspecto principal adicional, la invención se refiere al uso de variantes del polipéptido expuesto en la SEQ ID NO: 43 tal como se define en la reivindicación 1 en una composición para su uso como medicamento.

Cuando se usan en el presente documento, se usan expresiones tales como “un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con la SEQ ID NO:X” de manera intercambiable con, y pretenden referirse al mismo contenido que, expresiones tales como “el polipéptido de SEQ ID NO:X y variantes de la misma, en el que la variante tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con dicha secuencia”.

Las variantes tienen una identidad de secuencia de al menos el 75%, por ejemplo una identidad de secuencia de al menos el 80%, tal como una identidad de secuencia de al menos el 85%, por ejemplo una identidad de secuencia de al menos el 90%, tal como una identidad de secuencia de al menos el 91%, tal como una identidad de secuencia de al menos el 92%, por ejemplo una identidad de secuencia de al menos el 93%, tal como una identidad de secuencia de al menos el 94%, por ejemplo una identidad de secuencia de al menos el 95%, tal como una identidad de secuencia de al menos el 96%, por ejemplo una identidad de secuencia de al menos el 97%, tal como una identidad de secuencia de al menos el 98%, por ejemplo una identidad de secuencia del 99% con el polipéptido o fragmento dado. Se determina la identidad de secuencia con cualquiera de los algoritmos GAP, BESTFIT o FASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics versión 7.0, usando los pesos de huecos por defecto.

Variantes preferidas de un polipéptido o fragmento dado son variantes en las que todas las sustituciones de aminoácidos entre la variante y el polipéptido o fragmento de referencia dado son sustituciones conservativas. Las sustituciones conservativas de aminoácidos se refieren a la capacidad de intercambio de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales de hidroxilo alifático es serina y treonina, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Grupos de sustitución conservativa de aminoácidos preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina.

Las variantes de un polipéptido o de un fragmento del mismo también incluyen formas del polipéptido o fragmento en las que se han delecionado o insertado uno o más aminoácidos. Preferiblemente, se han insertado o delecionado menos de 5, tal como menos de 4, por ejemplo menos de 3, tal como menos de 2, por ejemplo sólo un aminoácido. Las "variantes" de un polipéptido o de un fragmento del mismo también incluyen formas de estos polipéptidos o fragmentos modificados mediante modificaciones postraduccionales de la secuencia de aminoácidos.

Polinucleótidos y vectores de expresión de la invención

Vectores de expresión preferidos como los adecuados para la vacunación con ADN. Otros vectores de expresión preferidos son aquéllos en los que un polinucleótido de la invención está bajo el control de un promotor que dirige la expresión de la secuencia en *Escherichia coli* o *Salmonella*. Estos últimos vectores de expresión son útiles en la producción de un virus recombinante o una célula recombinante de la invención tal como se describe en el presente documento.

Los polinucleótidos y vectores de expresión de la invención pueden prepararse mediante técnicas de ADN recombinante convencionales que conoce bien el experto en la materia.

Células recombinantes de la invención

Se han descrito cepas bacterianas adecuadas para su uso en el presente documento, por ejemplo, en Makino *et al.* (2001) Microb. Pathog. 31: 1-8; Gentshev *et al.* (2002) Int. J. Med. Microbiol. 291:577-582; Turner *et al.* (2001) Infect. Immun. 69:4969-4979; documentos WO99/49026; y WO03/022307 y referencias en los mismos. Ejemplos de cepas de *Salmonella* adecuadas son CvD908-T7pol (Santiago-Machuca *et al.* (2002) Plasmid 47:108-119), ATCC 39183, ATCC 53647 y ATCC 53648. Ejemplos de cepas de *E. coli* adecuadas son YT106 y E1392/75-2A.

Métodos y usos de la invención

Las composiciones y otros productos definidos anteriormente pueden usarse para tratar o prevenir infecciones por *Campylobacter jejuni*, y/o la enfermedad que resulta de tales infecciones, en animales o seres humanos que lo necesitan. Preferiblemente, el animal es una gallina, un pato, un pavo, una vaca o un cerdo. Poblaciones humanas preferidas son poblaciones en riesgo, tales como la población de niños hasta los 4 años de edad, la población de personas en países industrializados o la población de personas no inmunizadas o semi-inmunes que viajan a países en vías de desarrollo.

El tratamiento y la prevención en el presente documento incluyen todos los tipos de tratamiento terapéutico y tratamiento preventivo y otros tratamientos para combatir *Campylobacter jejuni*, incluyendo pero sin limitarse a vacunación, profilaxis, inmunización activa, inmunización pasiva, administración de anticuerpos, tratamiento curativo, tratamiento de mejora. En particular, la inmunización pasiva usando anticuerpos de la invención es un tratamiento adecuado para individuos inmunocomprometidos.

Preferiblemente, dicha administración se realiza por vía parenteral, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía oral o por vía intranasal.

Preferiblemente, dicho medicamento es un medicamento adecuado para la administración parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, oral o intranasal.

Métodos de diagnóstico de la invención

La combinación de estar expuesto en superficie y estar presente en números de copias relativamente altos en las células también hace que los 51 polipéptidos identificados por los inventores sean sumamente adecuados como dianas para la detección de *Campylobacter jejuni*, permitiendo la detección de este microorganismo con alta sensibilidad.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para detectar un *Campylobacter jejuni* que comprende las etapas de

- a. poner en contacto dicha muestra con un resto indicador que puede unirse específicamente a un polipéptido que consiste en la SEQ ID NO:43, en el que el resto indicador puede unirse además, preferiblemente unirse específicamente a, células de *Campylobacter jejuni* intactas, y
- b. determinar si se ha generado una señal por el resto indicador, detectando de ese modo si dicha muestra contiene *Campylobacter jejuni* o partes del mismo.

En realizaciones preferidas de los métodos de diagnóstico anteriores, se realiza una etapa de lavado entre la etapa de puesta en contacto y la etapa de determinación, con el fin de mejorar la especificidad de detección.

La muestra puede ser, por ejemplo, heces, orina, un tejido, extracto de tejido, muestra de fluido o muestra de líquido corporal, tal como sangre, plasma o suero. Otro ejemplo de una muestra es una muestra alimenticia, tal como una muestra de carne.

Los métodos anteriores pueden usarse, por ejemplo, para diagnosticar infecciones por *Campylobacter jejuni* o campilobacteriosis en un individuo. En realizaciones preferidas de los métodos anteriores, dicho resto indicador no pasa a través de la membrana externa de una célula de *Campylobacter jejuni*. Un tipo preferido de dicho resto indicador consiste en o comprende un anticuerpo, tal como un anticuerpo de la invención tal como se define en el presente documento.

Los expertos en la materia entenderán que existen numerosos procedimientos químicos de diagnóstico clínico bien conocidos en los que puede usarse un resto indicador un producto de reacción de unión cuya cantidad está relacionada con la cantidad del ligando, en el presente documento *C. jejuni* o partes del mismo, en una muestra. Por tanto, aunque se describen métodos de ensayo a modo de ejemplo en el presente documento, la invención no queda así limitada.

La presente invención también se refiere a un sistema de diagnóstico, preferiblemente en forma de kit, para someter a ensayo la presencia, y preferiblemente también la cantidad, de *Campylobacter jejuni* en una muestra biológica. Se han descrito, por ejemplo, métodos para la preparación de kits de diagnóstico en el documento US 5.470.958 y las referencias en el mismo.

El sistema de diagnóstico incluye, en una cantidad suficiente para realizar al menos un ensayo, un resto indicador según la presente invención, preferiblemente como reactivo envasado por separado, y más preferiblemente también instrucciones para su uso. Envasado se refiere al uso de una matriz o material sólido tal como vidrio, plástico (por ejemplo, polietileno, polipropileno o policarbonato), papel, lámina metálica y similares que puede mantener dentro de límites fijados un resto indicador de la presente invención. Por tanto, por ejemplo, un envase puede ser un vial de vidrio usado para contener cantidades de miligramos de una preparación de resto indicador marcado contemplado, o puede ser un pocillo de placa de microtitulación al que se han puesto operativamente cantidades de microgramos de resto indicador contemplado, es decir, unido de modo que pueda unirse al ligando.

“Instrucciones para su uso” incluyen normalmente una expresión tangible que describe la concentración de reactivo o al menos un parámetro del método de ensayo tal como las cantidades relativas de reactivo y muestra que han de mezclarse, los periodos de tiempo de mantenimiento para las mezclas de reactivo/muestra, temperatura, condiciones del tampón y similares.

En la mayoría de las realizaciones, el método y sistema de diagnóstico de la presente invención incluyen como parte del resto indicador, un marcador o medios de indicación que pueden señalar la formación de un complejo de reacción de unión que contiene un resto indicador complejoado con el ligando preseleccionado. Tales marcadores se conocen en sí mismo en la química de diagnóstico clínico.

Los medios de marcaje pueden ser un agente de marcaje fluorescente que se une químicamente a anticuerpos o antígenos sin desnaturalizarlos para formar un fluorocromo (colorante) que es un trazador inmunofluorescente útil. Agentes de marcaje fluorescente adecuados son fluorocromos tales como isocianato de fluoresceína (FIC), isotiocianato de fluoresceína (FITC), cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo (DANSC), isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), lisamina, cloruro de sulfonil-rodamina 8200 (RB 200 SC). Otros ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, diclorotriazinilamina-fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina y similares. Se encuentra una descripción de técnicas de análisis mediante inmunofluorescencia en DeLuca,

"Immunofluorescence Analysis", en *Antibody As a Tool*, Marchalonis, *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Ltd., págs. 189-231 (1982).

Los elementos radiactivos pueden ser útiles como agentes de marcaje. Un agente de radiomarcaje a modo de ejemplo es un elemento radiactivo que produce emisiones de rayos gamma. Los elementos que emiten por sí mismos rayos gamma, tales como ^{124}I , ^{125}I , ^{128}I , ^{132}I y ^{51}Cr representan una clase de grupos indicadores de elementos radioactivos que producen emisión de rayos gamma. Se prefiere particularmente ^{125}I . Otro grupos de medios de marcaje útiles son aquellos elementos tales como ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O y ^{13}N que emiten por sí mismos positrones, o emisores beta, tales como ^{111}In o ^3H . Otros materiales radiactivos adecuados incluyen ^{131}I y ^{35}S .

Puede facilitarse la detección usando anticuerpos, en otras realizaciones, mediante el acoplamiento del anticuerpo a otra sustancia detectable, tal como una enzima, un grupo prostético, un material luminiscente o un material bioluminiscente. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa del rábano, fosfatasa alcalina, betagalactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y acuorina.

En realizaciones preferidas, el grupo indicador es una enzima, tal como peroxidasa del rábano (HRP) o glucosa oxidasa. En casos tales en los que el grupo indicador principal es una enzima tal como HRP o glucosa oxidasa, se requieren reactivos adicionales para visualizar el hecho de que se ha formado un complejo de resto indicador/ligando (inmunorreactante). Tales reactivos adicionales para HRP incluyen peróxido de hidrógeno y un precursor de colorante de oxidación tal como diaminobenzidina. Un reactivo adicional útil con glucosa oxidasa es 2,2'-amino-di-(3-etil-benzotiazolina-G-ácido sulfónico).

La unión de marcadores, es decir marcaje de polipéptidos tales como anticuerpos, se conoce bien en la técnica. Por ejemplo, pueden marcarse proteínas mediante la incorporación metabólica de aminoácidos que contienen radioisótopos proporcionados como componente en el medio de cultivo. Véase, por ejemplo, Galfre *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 73:3-46 (1981). Las técnicas de acoplamiento o conjugación de proteínas a través de grupos funcionales activados son particularmente aplicables. Véase, por ejemplo, Aurameas, *et al.*, *Scand. J. Immunol.*, Vol. 8 Supl. 7:7-23 (1978), Rodwell *et al.* (1984) *Biotech.* 3:889-894, y la patente estadounidense 4.493.795.

Pueden establecerse diversos ensayos de diagnóstico que emplean los restos indicadores anteriores para someter a prueba muestras para detectar *Campylobacter jejuni*. Se describen ensayos a modo de ejemplo en detalle en *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. Los ejemplos representativos de tales ensayos incluyen: inmunolectroforesis en contracorriente (CIEP), radioinmunoensayos, radioinmunoprecipitaciones, ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), ensayos de inmunotransferencia puntual, ensayos de inhibición o competencia, y ensayos tipo sándwich, ensayos con Immunostick (tira reactiva), inmunoensayos simultáneos, ensayos inmunocromatográficos, ensayos de inmunofiltración, ensayos de aglutinación con perlas de látex, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de biosensor y ensayos de detección con baja luminosidad (véanse por ejemplo también los documentos U.S. 4.376.110 y 4.486.530).

En una realización, los kits de diagnóstico de la presente invención pueden usarse en un formato "ELISA" para detectar la cantidad de un ligando preseleccionado en una muestra de fluido. "ELISA" se refiere a un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas que emplea un anticuerpo o antígeno unido a una fase sólida y un conjugado enzima-antígeno o enzima-anticuerpo para detectar y cuantificar la cantidad de un antígeno presente en una muestra y puede aplicarse fácilmente a los presentes métodos. Por tanto, en algunas realizaciones, un resto indicador de la presente invención puede fijarse a una matriz sólida para formar un soporte sólido que comprende un envase en los sistemas de diagnóstico objeto. Normalmente se fija un reactivo a una matriz sólida mediante adsorción desde un medio acuoso aunque pueden usarse otros modos de fijación aplicables a polipéptidos, tales como anticuerpos, que conocen bien los expertos en la materia. También se conocen bien en la técnica matrices sólidas útiles. Tales materiales son insoluble en agua e incluyen el dextrano reticulado disponible con la marca comercial SEPHADEX de Pharmacia Fine Chemicals (Piscataway, N.J.); agarosa; perlas de poliestireno de aproximadamente 1 micra a aproximadamente 5 milímetros de diámetro disponibles de Abbott Laboratories of North Chicago, Ill.; bandas a base de poli(cloruro de vinilo), poliestireno, poli(acrilamida reticulada), nitrocelulosa o nailon tales como hojas, tiras o paletas; o tubos, placas o los pocillos de una placa de microtitulación tal como los fabricados de poliestireno o policloruro de vinilo.

Un método de diagnóstico adicional puede utilizar la multivalencia de una composición de anticuerpo de una realización de esta invención para reticular ligandos, formando de ese modo una agregación de múltiples ligandos y polipéptidos, produciendo un agregado que puede precipitar. Esta realización es comparable a los métodos de precipitación inmunitaria bien conocidos. Esta realización comprende las etapas de mezclar una muestra con una composición que comprende un anticuerpo de esta invención para formar una mezcla de unión en condiciones de unión, seguido por una etapa de separación para aislar los complejos de unión formados. Normalmente, se logra el aislamiento mediante centrifugación o filtración para retirar el agregado de la mezcla. La presencia de complejos de unión indica la presencia del ligando preseleccionado que va a detectarse.

Parejas de unión e inhibidores de polipéptidos de la invención

La ubicación en superficie de los 51 polipéptidos que esta invención da a conocer los hace sumamente adecuados como dianas para parejas de unión, tales como inhibidores. Los polipéptidos ubicados en superficie de un microorganismo patógeno interactúan a menudo con el organismo hospedador. Por tanto, cualquier tipo de pareja de unión de un polipéptido ubicado en superficie puede interferir en la interacción hospedador-patógeno. Por tanto, las parejas de unión antagonizan a menudo la patogenicidad (virulencia) de un microorganismo. Una pareja de unión puede ser también un inhibidor del polipéptido al que se une.

Por tanto, en un aspecto principal adicional, la invención se refiere a métodos para la identificación de parejas de unión del polipéptido ubicado en superficie expuesto en la SEQ ID NO:43. Tales métodos pueden tener una base bioquímica o celular.

Métodos bioquímicos

En un aspecto, puede identificarse una pareja de unión derivada del hospedador de un polipéptido definido por la SEQ ID NO:43, tal como sigue: se separan de manera electroforética membranas del hospedador purificadas, se someten a inmunotransferencia sobre una membrana y se incuban con el polipéptido de interés o fragmento del mismo. Entonces puede detectarse la unión usando anticuerpos específicos para el polipéptido de interés o fragmento del mismo. La pareja de unión del hospedador a la que se ha unido el polipéptido o fragmento del mismo puede identificarse posteriormente mediante elución de la inmunotransferencia y posterior análisis mediante espectrometría de masas, o mediante cualquier otra técnica conocida en la técnica.

Si la pareja de unión de un polipéptido ubicado en superficie de un microorganismo patógeno es una molécula derivada del hospedador, entonces puede ser importante una interacción de este tipo entre el polipéptido ubicado en superficie y el hospedador para la virulencia de la bacteria. Los compuestos que interfieren en la interacción del polipéptido ubicado en superficie y la pareja de unión derivada del hospedador pueden ser así adecuados para la prevención o el tratamiento de infecciones por *Campylobacter jejuni*. Por consiguiente, otro método de la invención se refiere a un método de identificación de un inhibidor de la interacción del polipéptido ubicado en superficie de *Campylobacter jejuni* de SEQ ID NO:43 con una pareja de unión derivada del hospedador que comprende las etapas de:

- a. proporcionar el polipéptido de SEQ ID NO:43 o un fragmento del mismo,
- b. proporcionar una pareja de unión derivada del hospedador de dicho polipéptido (identificada tal como se describió anteriormente o mediante cualquier otro método),
- c. poner en contacto dicho polipéptido con dicha pareja de unión derivada del hospedador en ausencia de un supuesto inhibidor de dicha interacción,
- d. poner en contacto dicho polipéptido con dicha pareja de unión derivada del hospedador en presencia de dicho supuesto inhibidor, y
- e. determinar si la intensidad de la unión de dicho polipéptido a dicha pareja de unión derivada del hospedador que resulta de la etapa d. se reduce en comparación con la que resulta de la etapa c.

En algunas realizaciones, pueden realizarse las etapas c. y d. en dos compartimentos para muestras diferentes. En otras realizaciones, puede realizarse la etapa d. añadiendo el supuesto inhibidor a la mezcla de la etapa c. En realizaciones preferidas, el método se repite para una pluralidad de supuestos inhibidores.

Son de particular interés las parejas de unión que inhiben una actividad de un polipéptido ubicado en superficie. Tal actividad puede ser actividad enzimática, actividad de transporte, o cualquier tipo de otra actividad bioquímica o celular, preferiblemente actividad enzimática.

Parejas de unión derivadas del hospedador preferidas son polipéptidos del hospedador y lípidos del hospedador. La unión puede determinarse, por ejemplo, tal como se describe por Szymanski y Armstrong (1996) Infect. Immun. 64:3467-3474.

En realizaciones preferidas de los métodos bioquímicos descritos anteriormente, la unión entre la pareja de unión y el polipéptido ubicado en superficie o fragmento del mismo tiene una constante de disociación o K_d inferior a 5×10^{-6} M, tal como inferior a 10^{-6} M, por ejemplo inferior a 5×10^{-7} M, tal como inferior a 10^{-7} M, por ejemplo inferior a 5×10^{-8} M, tal como inferior a 10^{-8} M, por ejemplo inferior a 5×10^{-9} M, tal como inferior a 10^{-9} M, por ejemplo inferior a 5×10^{-10} M, tal como inferior a 10^{-10} M, por ejemplo inferior a 5×10^{-11} M, tal como inferior a 10^{-11} M, por ejemplo inferior a 5×10^{-12} M, tal como inferior a 10^{-12} M. Pueden determinarse, por ejemplo, las constantes de disociación mediante análisis de resonancia de plasmón superficial.

Métodos basados en células

La reducción del nivel de un polipéptido ubicado en superficie, mediante delección o alteración del gen estructural para el mismo o mediante la regulación por disminución de la expresión génica (véase a continuación), puede afectar a una célula bacteriana. La célula puede volverse más sensible a compuestos citotóxicos. Especialmente para polipéptidos ubicados en superficie, una reducción de su nivel puede afectar a la función de las partes exteriores de la célula, tales como la membrana externa o pared celular, al evitar que entren compuestos en la célula. Por tanto, la reducción del nivel de un polipéptido ubicado en superficie puede hacer una célula más "permeable" para diversos compuestos.

Además, la invención se refiere a un método para identificar un compuesto con actividad antibacteriana frente a *Campylobacter jejuni* que comprende las etapas de

- a. proporcionar una célula sensibilizada que tiene un nivel reducido del polipéptido de SEQ ID NO:43, y
- b. determinar la sensibilidad de dicha célula a un supuesto compuesto antibacteriano, por ejemplo mediante un ensayo de crecimiento, en el que el supuesto compuesto antibacteriano no puede pasar a través de la membrana externa de una célula de *Campylobacter jejuni* de tipo natural.

Preferiblemente, el método es un método de selección en el que se repite el procedimiento para una pluralidad de supuestos compuestos antibacterianos.

El fundamento subyacente a este enfoque es que una célula con un menor nivel del polipéptido ubicado en superficie presentará un aumento de la sensibilidad a compuestos citotóxicos, lo que permite la identificación de compuestos antibacterianos con baja potencia que se pierden cuando se usan células de tipo natural para el ensayo. A menudo será necesario modificar los compuestos identificados mediante este método con el fin de mejorar la potencia. Esto puede realizarse mediante modificación química.

La inhibición de la actividad de un polipéptido ubicado en superficie puede afectar a la viabilidad (es decir supervivencia, crecimiento y/o proliferación) de la bacteria. Es de particular interés la inhibición de polipéptidos ubicados en superficie que son esenciales para la viabilidad de *Campylobacter jejuni*. La esencialidad de un gen de *Campylobacter jejuni* puede investigarse, por ejemplo, tal como se describe en el documento WO 02/077183. Puede no ser necesario que los inhibidores de polipéptidos ubicados en superficie esenciales entren en la célula bacteriana para poder afectar a su viabilidad. Por tanto, generalmente se plantean menos requisitos sobre la estructura de un inhibidor de un polipéptido diana ubicado en superficie esencial que sobre un inhibidor de una diana intracelular, para ser eficaz como agente antibacteriano.

Además, la invención se refiere a un método para identificar un inhibidor de un polipéptido definido por la SEQ ID NO:43, que comprende las etapas de

- a. proporcionar dos células que difieren en el nivel del polipéptido de SEQ ID NO:43,
- b. determinar la sensibilidad de dichas células a un supuesto inhibidor, por ejemplo mediante un ensayo de crecimiento, en el que el supuesto inhibidor no puede pasar a través de la membrana externa de una célula de *Campylobacter jejuni*, y
- c. determinar si dichas dos células se ven afectadas de forma diferente por la presencia de dicho supuesto inhibidor.

Preferiblemente, se repite el método para una pluralidad de supuestos inhibidores.

El fundamento subyacente a este enfoque es que la viabilidad de una célula con una menor actividad del polipéptido esencial se verá más afectada por un inhibidor del polipéptido que la viabilidad de la célula con un mayor nivel. Si las dos células se ven afectadas de forma diferente, esto es una indicación de que el inhibidor actúa sobre la diana o al menos en la misma ruta bioquímica.

En algunas realizaciones del método, las dos células con diferente actividad del polipéptido de interés son una célula de tipo natural (u otra célula con actividad de tipo natural del gen de interés) y una célula sensibilizada con una actividad reducida del polipéptido de interés. En algunas realizaciones, el nivel diferente o reducido en la célula sensibilizada puede ser un nivel de expresión diferente o reducido del gen de interés (dando como resultado un número de copias diferente o reducido del polipéptido). Esto puede lograrse poniendo el gen bajo el control de un promotor regulable o mediante la expresión regulable de un ARN antisentido que inhibe la traducción de un ARNm que codifica para el polipéptido esencial. En otras realizaciones, la actividad diferente o reducida puede ser una actividad diferente o reducida del polipéptido de interés, por ejemplo debido a una mutación, tal como una mutación sensible a la temperatura.

Se han descrito modos adecuados de generación de células sensibilizadas y de uso de éstas en la selección de inhibidores en el documento WO 02/077183. Pueden obtenerse células sensibilizadas haciendo crecer una cepa mutante de *C. jejuni* de expresión condicional en presencia de una concentración de inductor o represor u otras condiciones que proporcionen un nivel de un producto génico requerido para la viabilidad bacteriana de tal manera

que la presencia o ausencia de su función se convierta en una etapa determinante de la velocidad para la viabilidad. Se han descrito, por ejemplo, promotores regulables para *Campylobacter jejuni* en Kelana *et al.* (2003) J Food Prot 66: 1190-1197 y Dedieu *et al.* (2002) Appl Environ. Microbiol. 68:4209-4215. La expresión subletal del gen diana puede ser tal que la inhibición del crecimiento es de al menos aproximadamente el 10%, tal como al menos aproximadamente el 25%, por ejemplo al menos aproximadamente el 50%, tal como al menos aproximadamente el 75%, por ejemplo al menos el 90%, tal como al menos el 95%.

En otra realización de los ensayos basados en células de la presente invención, se obtienen células sensibilizadas mediante la reducción de la actividad en nivel de un polipéptido requerido para la viabilidad bacteriana usando una mutación, tal como una mutación sensible a la temperatura, en el polipéptido. El crecimiento de tales células a una temperatura intermedia entre las temperaturas permisiva y restrictiva produce células con actividad reducida del producto génico. Se apreciará que el método anterior puede realizarse con cualquier mutación que reduzca pero no elimine la actividad o nivel del producto génico que se requiere para la viabilidad bacteriana. Este enfoque puede combinarse también con el enfoque de expresión condicional. En este enfoque combinado, se crean células en las que hay una mutación sensible a la temperatura en el gen de interés y en las que este gen también se expresa de manera condicional.

Cuando se seleccionan inhibidores de un polipéptido esencial, puede medirse la inhibición del crecimiento comparando directamente la cantidad de crecimiento, medida mediante la densidad óptica del cultivo con relación a un medio de crecimiento sin inocular, en una muestra experimental con la de una muestra control. Los métodos alternativos para someter a ensayo la proliferación celular incluyen medir emisiones de constructos indicadores de proteína fluorescente verde (GFP), diversos ensayos de actividad enzimática, y otros métodos bien conocidos en la técnica. Otros parámetros usados para medir la viabilidad incluyen, por ejemplo, las unidades formadoras de colonias. El método anterior puede realizarse en fase sólida, fase líquida, una combinación de los dos medios precedentes, o *in vivo*. Pueden transferirse múltiples compuestos a placas de agar y someterse a prueba simultáneamente usando equipo automático y semiautomático.

Los ensayos basados en células de la presente invención pueden detectar compuestos que presentan una potencia baja o moderada frente a la molécula diana de interés porque tales compuestos son sustancialmente más potentes con células sensibilizadas que con células no sensibilizadas. El efecto puede ser tal que un compuesto de prueba puede ser dos a varias veces más potente, por ejemplo al menos 10 veces más potente, tal como al menos 20 veces más potente, por ejemplo al menos 50 veces más potente, tal como al menos 100 veces más potente, por ejemplo al menos 1000 veces más potente, o incluso más de 1000 veces más potente cuando se somete a prueba con las células sensibilizadas en comparación con células no sensibilizadas.

También puede usarse una cepa mutante de *Campylobacter jejuni* que sobreexpresa un polipéptido ubicado en superficie para identificar un compuesto que inhibe un polipéptido de este tipo. Si el compuesto es citotóxico, la sobreexpresión del polipéptido diana puede hacer las células más resistentes. Por tanto, la invención también da a conocer un método para hallar un inhibidor del polipéptido ubicado en superficie de *Campylobacter jejuni* de SEQ ID NO:43 que comprende las etapas de

- a. proporcionar dos células que difieren en la actividad de los polipéptidos ubicados en superficie de *Campylobacter jejuni* de SEQ ID NO:43, en las que una célula contiene un número de copias sustancialmente de tipo natural de dicho polipéptido y la célula contiene más del número de copias de tipo natural de dicho polipéptido,
- b. determinar la sensibilidad de dicha células a un supuesto inhibidor, por ejemplo mediante un ensayo de crecimiento, y
- c. determinar si dichas dos células se ven afectadas de forma diferente o no por la presencia de dicho supuesto inhibidor.

Puede lograrse la sobreexpresión usando promotores fuertes o introduciendo múltiples copias del gen estructural para un polipéptido ubicado en superficie. Se han descrito promotores fuertes de *Campylobacter jejuni* por Wosten *et al.* (1998) J. Bacteriol. 180:594-599. Como también la sobreexpresión de polipéptidos que no son la diana celular de un inhibidor puede hacer las células resistentes a un inhibidor, será necesario verificar la inhibición del polipéptido diana de interés por parte de un supuesto inhibidor por otros medios, como por ejemplo un ensayo bioquímico.

Además de los inhibidores de una actividad bioquímica u otra actividad celular de un polipéptido ubicado en superficie, pueden usarse los métodos celulares descritos anteriormente para identificar compuestos que reducen el nivel de expresión de una diana, y de ese modo su número de copias, por ejemplo interfiriendo en la regulación génica.

En realizaciones preferidas de cualquiera de los métodos bioquímicos o basados en células para hallar parejas de unión o inhibidores, se repite el método para una pluralidad de compuestos candidatos.

Ejemplos

Estrategia:

Las etapas experimentales en el proyecto son las siguientes: aislar proteínas de superficie mediante elución a bajo pH. Analizar mediante geles 2-D y espectrometría de masas. Clonar en vector de expresión de *E. coli*. Producir proteína recombinante, inmunizar ratones, exponer los ratones inmunizados a *Campylobacter jejuni* y examinar la protección frente a la enfermedad y la colonización intestinal. También se evalúa la ubicación en superficie de *E. coli* y *Salmonella* (si es positiva, existe un potencial para su uso en cepas de vector atenuadas).

Cultivo bacteriano:

Campylobacter jejuni (C.j.) cepa ML53 (serotipo 0:19), un aislado clínico de heces humanas, lo donó Karen Krogfeld (SSI). Se hizo crecer de manera rutinaria sobre placas de agar sangre a 37°C en atmósfera del 10% de CO₂, 5% de O₂.

Extracción de proteínas de superficie:

Se hicieron crecer bacterias durante la noche sobre placas de agar sangre, se recogieron en Tris 50 mM pH 7,8 y se sedimentaron mediante centrifugación a 6000 g durante 5 minutos. Se resuspendió el sedimento en glicina 0,2 M pH 2,2 y se mezcló suavemente la suspensión bacteriana a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se sedimentaron de nuevo las bacterias mediante centrifugación a 6000 g durante 5 minutos, se recogió el sobrenadante que contenía proteínas de superficie, se neutralizó con NaOH y se congeló a -80°C. se desaló la muestra en columna de desalación Hi-Trap de Amersham antes de la electroforesis en gel 2-D.

Electroforesis en gel 2-D:

Se realizó la electroforesis en gel bidimensional o bien con el sistema Ettan Dalt 2 (Amersham Biosciences) o con el sistema Novex NuPage (Invitrogen) según el manual proporcionado con el sistema de gel.

Brevemente: se realizaron ejecuciones monodimensionales con tiras de IPG coladas previamente de o bien 7 cm o bien 24 cm (intervalo de pH de 3-10 ó 6-11) usando el sistema de isoelectroenfoque Ettan IPGphor (Amersham Biosciences) según las instrucciones del fabricante. Se realizó el isoelectroenfoque en las siguientes condiciones: tiras de pH 3-10 de 7 cm: 8000 Vh, tiras de pH 6-11 de 7 cm: 16000 Vh, tiras de pH 3-10 de 24 cm: 52000 Vh. Se realizó la segunda dimensión usando geles al 12,5% colados previamente (Amersham Biosciences) a 5 W por gel durante 15 min. entonces 170 W en total durante 4-6 horas para tiras de 24 cm. Se corrieron las tiras de 7 cm en el sistema Novex NuPage (Invitrogen) usando geles al 4-12% colados previamente (Invitrogen) a 200 voltios durante 40 minutos. Se tiñeron con plata los geles según un método modificado descrito originariamente por Mortz *et al.* (2001) Proteomics 1(11), 1359-1363, y se recogieron las manchas para el análisis de espectrometría de masas usando el Ettan Spot Picker de Amersham según las instrucciones del fabricante.

Espectrometría de masas:

Se hizo la recogida de manchas de proteínas específicas, y se pusieron en agua Milli-Q. Se lavaron estos fragmentos de gel con NH₄HCO₃ 50 mM / etanol al 50% y se deshidrataron mediante incubación en etanol al 96%. Se realizaron la reducción y alquilación mediante incubación en disolución reductora (DTT 10 mM, NH₄HCO₃ 50 mM) a 56°C seguido por una incubación a temperatura ambiente en disolución de alquilación (yodoacetamida 55 mM, NH₄HCO₃ 50 mM) en la oscuridad. Entonces se realizaron dos ciclos de lavado y deshidratación antes de la adición de 5 µl de disolución de tripsina (tripsina 12,5 ng/µl de Promega en NH₄HCO₃ 50 mM, acetonitrilo al 10%). Entonces se añadió una cantidad adicional de disolución de bicarbonato de sodio y se incubaron los digestos durante la noche a 37°C. Se añadió ácido trifluoroacético al digesto durante la noche seguido por incubación con agitación.

Se usaron partes del extracto en análisis de huella dactilar peptídica mediante masas MALDI-TOF (Reflex IV, Bruker Daltonics, Alemania) y se usó la lista de picos en la búsqueda en la base de datos frente a un base de datos de *Campylobacter jejuni* específica. Se usó el algoritmo de puntuación y el programa de búsqueda Mascot (Matrix Science, RU) en la búsqueda en base de datos. Se fijó la tolerancia de masa del péptido en 60 ppm y 0,5 Da, respectivamente. Se ajustaron los parámetros de búsqueda para incluir la oxidación de Met, la adición de grupos carbamidometilo a Cys, y se permitió que a la tripsina le faltase un sitio de escisión por péptido.

En total, se identificaron 51 proteínas de *Campylobacter jejuni* diferentes usando este procedimiento. Las secuencias de longitud completa de estas proteínas se facilitan en las SEQ ID NO:1-51 (véase la figura 4). Las proteínas en la lista de secuencia se clasifican funcionalmente según la clasificación del Instituto Sanger. Todas las proteínas que se predijeron a partir de la secuencia genómica pero que no se habían caracterizado anteriormente, y no tenían ninguna homología con proteínas caracterizadas previamente, se clasificaron como hipotéticas por el Instituto Sanger. Las que tenían homología con proteínas conocidas se nombraron como la proteína conocida correspondiente con el prefijo "probable" o "supuesta", dependiendo del grado de homología. Algunas proteínas tienen pequeños motivos, que no permitió asignarles una función bioquímica/metabólica precisa a las mismas, pero que sí permitió afirmar el hecho de que tienen una determinada característica, tal como motivos de unión a nucleótidos, sitios de unión a membrana, etc. Las supuestas proteínas periplasmáticas se clasificaron como tales

con una base similar (tienen un motivo N-terminal corto (4-6 aminoácidos), que puede mediar el transporte al periplasma).

Estudios bioinformáticos:

- 5 Se realizaron estudios del índice de antigenicidad usando los parámetros por defecto determinados usando el software de análisis de secuencias Lasergene de la empresa DNASTar (Burland, TG (2000) Methods Mol. Biol. 132:71-91). Se predice que las secuencias expuestas en las SEQ ID NO:52-119 son particularmente fragmentos antigénicos de sus polipéptidos de longitud completa correspondientes (véase la figura 4).

Clonación y expresión en *E. coli*:

- 10 Se amplificaron por PCR genes correspondientes a las proteínas de interés y se clonaron en un vector de expresión de *E. coli* que contenía cola de His (pET101, Invitrogen). Se transformaron los plásmidos resultantes en *E. coli* cepa BL21 (DE3) y se indujo la expresión de proteínas con IPTG 0,5 mM durante 4 horas. Se preparó eluato de glicina como anteriormente y se analizó para determinar la presencia de la proteína de *Campylobacter jejuni* recombinante mediante tres métodos independientes: tinción de Coomassie, inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpo anti-cola de His, y análisis por espectrometría de masas. Se llevó a cabo la detección de la ubicación en superficie para ocho plásmidos (los que expresan Cj0092, Cj0143c, Cj0420, Cj0715, Cj0772c, Cj1018c, Cj1380 y Cj1643). Se encontraron las ocho proteínas en la superficie celular de *E. coli*.

Se purificó la proteína recombinante a partir de cultivos hechos crecer e inducidos tal como se describió anteriormente usando agarosa NTA-Ni (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Se dializaron las proteínas purificadas frente a PBS y se mantuvieron congeladas a -80.

20 Inmunización de ratones

Determinación de la dosis de antígeno.

- Para determinar la dosis de inmunización y el programa de tiempos de vacunación óptimos para cada proteína, se inmunizaron ratones con 1, 5, 10 y 25 microgramos de cada proteína. Se mezcló la cantidad apropiada de proteína disuelta en PBS con 100 µg de alumbre (hidrogel de Al, Brenntag Biosector)/ratón y se hizo rotar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se ajustó el volumen a 0,5 ml con PBS. Se inmunizaron ratones por vía subcutánea 3 veces (día 0, 14, 28). Se extrajo sangre en el día 0 y 7 días después de cada inmunización (día 7, 21, 35). Se extrajo una muestra de sangre de 200 µl de sangre del plexo retroorbitario en el día 7, se dejó coagular durante 1 hora, se centrifugó durante 10 min. a 3500g, y se recogió el suero.

Análisis de las extracciones de sangre

- 30 Se monitorizó la respuesta de anticuerpos determinando el título de anticuerpos en las extracciones de sangre. Esto se realizó mediante inmunotransferencia de tipo Western. Se diluyó en serie el suero con PBS/Tween al 0,1% desde 1:100 hasta 1:25600. Se corrió la proteína recombinante en geles de pocillos preparativos (2-D) (Invitrogen) de modo que 1,5 mm de la banda de proteína en la membrana correspondería a 100 ng de la proteína. Se usó el aparato Surf-Blot aparato con ranuras de 1,5 mm de ancho (Idea Scientific, Minneapolis, MN) para realizar inmunotransferencias de tipo Western. Se usaron diluciones de suero como el anticuerpo primario y anticuerpos anti-ratón conjugados con fosfatasa alcalina (Sigma) como anticuerpo secundario. Se revelaron las inmunotransferencias con comprimidos FastTab (Sigma). Todos los antígenos pudieron detectarse a una dilución de antisero de entre 12800 y 25600 cuando se aplicaron a 5, 10 y 25 microgramos/animal.

Inmunización para la exposición

- 40 Se inmunizaron ratones con 25 microgramos de vacuna de proteína recombinante preparada como anteriormente, en los días 0, 14 y 28. Se realizaron extracciones de sangre en los días 7, 21 y 35 y se sometieron a prueba como anteriormente. A los ratones, que no se usaron para experimentos de exposición en el plazo de dos semanas desde la última inmunización de refuerzo, se les administró de nuevo una inmunización de refuerzo con 10 microgramos de proteína recombinante una semana antes de la exposición.

45 Exposición oral de ratones

- Se hizo crecer *Campylobacter jejuni* cepas ML1 y ML53 (aislados clínicos donados por Karen Krogfeld, SSI) durante la noche sobre placas de agar sangre a 42°. El día antes de la exposición, se recogieron bacterias en caldo de infusión cerebro-corazón que contenía extracto de levadura al 1% y se diluyeron hasta DO₆₀₀ de 0,05 para obtener un cultivo iniciador. Se sembraron matraces de 75 cm² que contenían 20ml de agar BHI con 25 ml del cultivo iniciador y se incubaron durante la noche a 42°. El día de la exposición, se recogieron bacterias mediante centrifugación a 6000 g durante 5 minutos y se resuspendieron en caldo BHI/YE nuevo hasta DO₆₀₀ de 1 (de 5x10⁸ a 10⁹ unidades formadoras de colonias (ufc)/ml; se determinaron las ufc reales para cada lote sembrando en placa diluciones en serie sobre placas de agar BHI). Se mantuvo la suspensión en hielo hasta que se les administró a los ratones (habitualmente en el plazo de 3 horas desde la preparación).

Se expusieron 6-8 ratones vacunados por antígeno por vía oral a $2,5 \times 10^8$ ufc de *Campylobacter jejuni* (0,5 ml de la suspensión preparada como anteriormente). Se recogieron cada día cinco gránulos fecales (o todos los gránulos fecales en el experimento ACE017), se pusieron en 0,5 ml (o 5 ml) de caldo BHI/YE complementado con el 10% de glicerol y congelado a -80° .

- 5 Se monitorizó la colonización mediante el sembrado en placa sobre medios selectivos para *Campylobacter*. Se homogeneizaron los gránulos fecales, se ajustó el volumen a 2 (o 12) ml, y se pusieron 250 μ l del homogeneizado en 1,5 ml de caldo BHI/YE sobre la parte superior de la placa de agar sangre. Se incubaron las placas a 42° durante 2-3 horas, y se extendieron 150-250 μ l del líquido sobre placas de agar de Karmali, que se incubaron entonces a 42° durante 48 horas. Se puntuaron las placas tal como sigue: se asignó una puntuación de 1000 si se observó un césped confluyente, una puntuación de 500 si podían distinguirse colonias separadas en el césped, y una puntuación de 0-100, si el número de colonias era inferior a 100 (se contaron las colonias en ese caso). Se promedió la puntuación a lo largo de todos los ratones para cada antígeno cada día.

Selección de cepas

- 15 Se seleccionaron 13 cepas de *Campylobacter jejuni* y una cepa de *Campylobacter coli* para determinar la presencia de los 8 antígenos usados en los experimentos de exposición de ratones. Se corrió célula completa lisada en gel de SDS y se sometió a inmunotransferencia de tipo Western con antisueros de ratones inmunizados.

Resultados:

Se realizaron cinco experimentos incluyendo diferentes combinaciones de antígenos y controles tal como se enumera a continuación:

Nombre del experimento	Antígenos usados
ACE003b	Cj0092, Cj0143c, Cj0420, Cj0772c, alumbre
ACE003c	Cj0715, Cj1018c, Cj1380, Cj1643, alumbre
ACE011a	Cj0092, Cj0143c, Cj0420, Cj0772c, alumbre
ACE011b	Cj0715, Cj1018c, Cj1380, Cj1643, alumbre
ACE017	Cj0092, Cj0143c, Cj0420, Cj0772c, Cj1018c, Cj1380, Cj1643, dominio de unión a celulosa de <i>Clostridium cellulovorans</i> (CBP, Sigma Aldrich C8581), eluato de glicina de C.j. cepas ML1 y ML53.

- 20 Se presenta un ejemplo de los análisis de sangre realizados con las extracciones de sangre de ratones de los experimentos ACE003b y ACE003c en las figuras 1 y 2.

Se presentan los resultados de la exposición en la figura 3.

Se presentan los resultados de la selección para determinar la presencia de antígenos en diferentes cepas de *Campylobacter* en la tabla 1.

- 25 Secuenciación de ADN de ACE 393 de la cepa ML53 (serotipo 0:19):

La secuenciación de ADN de ACE 393 (SEQ ID NO:120) de la cepa ML53 reveló 3 diferencias en comparación con la secuencia publicada en el NCBI a nivel de aminoácidos tras la traducción en la secuencia de la proteína.

Las diferencias fueron las siguientes:

- 30 Posición 70 de la secuencia de aminoácidos: V (secuencia pública) por A (cepa ML53)
Posición 136 de la secuencia de aminoácidos: A (secuencia pública) por T (cepa ML53)
Posición 168 de la secuencia de aminoácidos: T (secuencia pública) por A (cepa ML53)

- 35 Se llevó a cabo una verificación experimental de la secuencia de la proteína de ACE 393 recombinante de la cepa ML53 (0:19) que se usó para los estudios de eficacia con animales iniciales. El análisis incluyó: determinación de masa intacta mediante MALDI-TOF; análisis de gel 1D; análisis de gel 2D e inmunotransferencia de tipo Western en gel 2D. Los datos (no mostrados) se basaron en el constructo inicial, es decir, la secuencia que incluye una cola de 6 His C-terminal y una región conectora V5. Todos los ensayos y análisis se llevaron a cabo con ACE 393 obtenido tras purificación con Ni-His según protocolos convencionales.

- 40 A partir del análisis intacto de ACE 393, se observaron dos proteínas. Estas dos masas coincidían perfectamente la masa predicha de una forma truncada N-terminal (- 21 aminoácidos) y una forma truncada N-terminal similar con truncamiento C-terminal adicional de 19 aminoácidos. La SDS-PAGE 1D mostró dos manchas, una mayoritaria y una minoritaria. Esto correspondía bien con los datos del análisis MALDI-TOF intacto. Los datos de mapeo de péptidos de estas dos manchas no mostraron ninguna diferencia posiblemente debido a sobrecarga. Los números de manchas en el análisis de gel 2D indicaron que la mezcla podría contener más de dos componentes. Los datos

indicaron que los cambios podrían deberse a diferencias en la carga debidas al número de moléculas de SDS. Los datos de inmunotransferencia de tipo Western usando los anticuerpos de ratón proporcionaron el mismo patrón y se ajustaron bien a los datos de tinción con plata.

Análisis de huella dactilar peptídica mediante MALDI-TOF de ACE 393 nativo y recombinante

5 Forma nativa

Se encontró la forma nativa de ACE 393 en 4 geles 2D diferentes que contenían lisado de células completas de *Campylobacter*. La identificación se basó en el análisis de huella dactilar peptídica mediante MALDI-TOF con una cobertura de secuencia del 40 al 55%.

10 Se hizo una búsqueda de los datos de huella dactilar peptídica mediante MALDI-TOF péptido frente tanto a la secuencia pública como a la secuencia encontrada de manera interna ACE-393 (ML53, 0:19). La secuencia interna proporcionó dos péptidos adicionales:

131-143 DIVLDTEIGGVAK (SEQ ID NO:121)

166-190 FAASTSTITLSDDINLNIEVEANEK (SEQ ID NO:122)

(los aminoácidos en negrita son las diferencias entre las dos secuencias)

15 El péptido que contiene la última modificación en comparación con la secuencia pública (68-73; LDATIK (SEQ ID NO: 123)) es demasiado pequeño para encontrarse mediante análisis de huella dactilar peptídica mediante MALDI-TOF.

Forma recombinante

20 El análisis de huella dactilar peptídica mediante MALDI-TOF de la proteína recombinante reveló las mismas dos modificaciones que se encontraron en el análisis de la proteína nativa. Se identificaron péptidos adicionales a partir de la secuencia de conector-His.

Regiones hipervariables

25 Se comprobaron secuencias diana frente a posibles regiones hipervariables y homopoliméricas descritas en "The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. Nature. 2000 10 de feb.;403(6770):665-8." Las dianas descritas en el presente documento no se encontraron en estas regiones variables, haciéndolas por tanto particularmente adecuadas como candidatos a vacuna.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende
 - un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO:43 en donde X_1 es V o A y X_2 es A o T y X_3 es T o A, o comprende un fragmento antigénico seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 74-81 o una variante de dicha secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos el 75% con dicha secuencia,
 - un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica para dicho polipéptido,
 - un vector de expresión que comprende una secuencia que codifica para dicho polipéptido,
 - un virus recombinante o una célula recombinante que comprende dicho polinucleótido o dicho vector de expresión, o
 - un anticuerpo que puede unirse a dicho polipéptido,
 para su uso como medicamento.
2. Composición según la reivindicación 1, en donde la composición comprende
 - un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO:43 en donde X_1 es V o A y X_2 es A o T y X_3 es T o A, o comprende un fragmento antigénico seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 74-81 o una variante de dicha secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos el 75% con dicha secuencia,
 - un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica para dicho polipéptido,
 - un vector de expresión que comprende una secuencia que codifica para dicho polipéptido, o
 - un virus recombinante o una célula recombinante que comprende dicho polinucleótido o dicho vector de expresión.
3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho polinucleótido comprende la secuencia SEQ ID NO:120.
4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la variante tiene una identidad de secuencia de al menos el 95%, tal como al menos el 96%, por ejemplo al menos el 97%, tal como al menos el 98%, por ejemplo al menos el 99% con dicha secuencia.
5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el polipéptido comprende una etiqueta, por ejemplo una cola de histidinas.
6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la célula recombinante es una célula de *Escherichia coli* de virulencia atenuada o reducida o una célula de *Salmonella* de virulencia atenuada o reducida.
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la célula recombinante está viva.
8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la célula recombinante está muerta.
9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 2-8, en la que el medicamento es una vacuna.
10. Composición según la reivindicación 9, comprendiendo la composición un portador inmunogénico, por ejemplo una proteína transportadora, en la que el portador inmunogénico preferiblemente está unido a dicho polipéptido.
11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 9-10, comprendiendo la composición un adyuvante.
12. Composición según la reivindicación 1, comprendiendo la composición un anticuerpo que puede unirse al polipéptido de SEQ ID NO: 43, en donde X_1 es V o A y X_2 es A o T y X_3 es T o A.
13. Composición según la reivindicación 12, en la que el anticuerpo puede unirse además a una célula de *Campylobacter jejuni* intacta.
14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, en la que el anticuerpo es policlonal.

15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, en la que el anticuerpo es monoclonal.
16. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en la que el anticuerpo es un anticuerpo humano o anticuerpo humanizado.
- 5 17. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, en la que el anticuerpo es un fragmento de unión de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab)₂ y Fv.
18. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo la composición un vehículo farmacéuticamente aceptable.
19. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, siendo la composición adecuada para administración sistémica.
- 10 20. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, siendo la composición adecuada para administración intravenosa, intramuscular o subcutánea.
21. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, siendo la composición adecuada para administración oral.
- 15 22. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, siendo la composición adecuada para administración intranasal.
23. Anticuerpo que puede unirse al polipéptido de SEQ ID NO:43, en donde X₁ es V o A y X₂ es A o T y X₃ es T o A o un fragmento antigénico seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 74-81 o una variante de dicha secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos el 75% con dicha secuencia, para su uso como medicamento.
- 20 24. Anticuerpo según la reivindicación 23, en donde el anticuerpo puede unirse además a una célula de *Campylobacter jejuni* intacta.
25. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 24, siendo el anticuerpo policlonal.
26. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 24, siendo el anticuerpo monoclonal.
- 25 27. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26, siendo el anticuerpo un anticuerpo humano o anticuerpo humanizado.
28. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 24, siendo el anticuerpo un fragmento de unión de un anticuerpo.
- 30 29. Célula de *Escherichia coli* recombinante de virulencia atenuada o reducida o de *Salmonella* recombinante de virulencia atenuada o reducida transformada o transfectada con un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica para el polipéptido de SEQ ID NO:43 en donde X₁ es V o A y X₂ es A o T y X₃ es T o A, o que codifica para un fragmento antigénico seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 74-81 o una variante de dicha secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos el 75% con dicha secuencia, para su uso como medicamento.
30. Uso de
- 35 - un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO:43, en la que X₁ es V o A y X₂ es A o T y X₃ es T o A, o comprende un fragmento antigénico seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 74-81 o una variante de dicha secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos el 75% con dicha secuencia
- un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica para dicho polipéptido,
- 40 - un vector de expresión que comprende una secuencia que codifica para dicho polipéptido, o
- un virus recombinante o una célula recombinante que comprende dicho polinucleótido o dicho vector de expresión,
- para la preparación de un medicamento para la inmunización de un animal o un ser humano frente a infecciones por *Campylobacter*, preferiblemente *Campylobacter jejuni*.
- 45 31. Uso según la reivindicación 30, en donde la inmunización induce una respuesta inmunitaria protectora.
32. Uso según la reivindicación 30 ó 31, en el que el medicamento es un medicamento adecuado para administración parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, oral o intranasal.

33. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 30-32, en el que el medicamento comprende además un adyuvante.
- 5 34. Uso de un anticuerpo que puede unirse al polipéptido de SEQ ID NO:43, en donde X_1 es V o A y X_2 es A o T y X_3 es T o A o un fragmento antigénico seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 74-81 o una variante de dicha secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos el 75% con dicha secuencia, preferiblemente un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 28, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de infecciones por *Campylobacter*, preferiblemente *Campylobacter jejuni*, en un animal o un ser humano.
- 10 35. Método para detectar *Campylobacter jejuni* en una muestra que comprende las etapas de
- a. poner en contacto dicha muestra con un resto indicador que puede unirse específicamente al polipéptido de SEQ ID NO:43, en donde X_1 es V o A y X_2 es A o T y X_3 es T o A, en donde el resto indicador además puede unirse específicamente a células de *Campylobacter jejuni* intactas, y
- b. determinar si se ha generado una señal por el resto indicador, detectando de ese modo si dicha muestra contiene *Campylobacter jejuni*.
- 15 36. Método según la reivindicación 35, en donde dicho resto indicador no pasa a través de la membrana externa de una célula de *Campylobacter jejuni*.
37. Método según cualquiera de las reivindicaciones 35 a 36, en donde dicho resto indicador consiste en o comprende un anticuerpo, como un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17.
- 20 38. Método para identificar un inhibidor del polipéptido de SEQ ID NO:43, en donde X_1 es V o A y X_2 es A o T y X_3 es T o A, que comprende las etapas de
- a. proporcionar dos células que difieren en el nivel del polipéptido de SEQ ID NO:43, en donde X_1 es V o A y X_2 es A o T y X_3 es T o A,
- b. determinar la sensibilidad de dichas células a un inhibidor putativo, por ejemplo mediante un ensayo de crecimiento, en donde el inhibidor putativo no puede pasar a través de la membrana externa de una célula de *Campylobacter jejuni*, y
- 25 c. determinar si dichas dos células se ven afectadas de manera diferente por la presencia de dicho inhibidor putativo.
- 30 39. Método para identificar una pareja de unión derivada del hospedador del polipéptido de SEQ ID NO:43, en donde X_1 es V o A y X_2 es A o T y X_3 es T o A o un fragmento antigénico seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 74-81, que comprende las etapas de
- a. proporcionar membranas del hospedador purificadas y separadas por electroforesis transferidas sobre una membrana,
- b. incubar dichas membranas del hospedador con el polipéptido de SEQ ID NO:43 en donde X_1 es V o A y X_2 es A o T y X_3 es T o A o un fragmento antigénico seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 74-81,
- 35 c. detectar la unión usando anticuerpos específicos para el polipéptido de SEQ ID NO:43 en donde X_1 es V o A y X_2 es A o T y X_3 es T o A o un fragmento antigénico seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 74-81, e
- d. identificar la pareja de unión mediante elución de dicha membrana de transferencia y posterior análisis.

Fig. 1

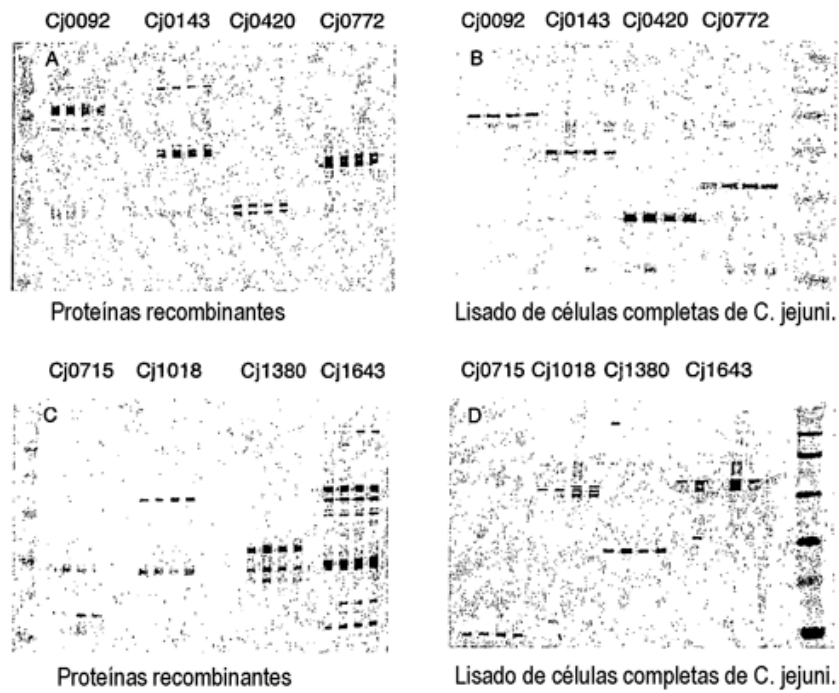


Fig. 2

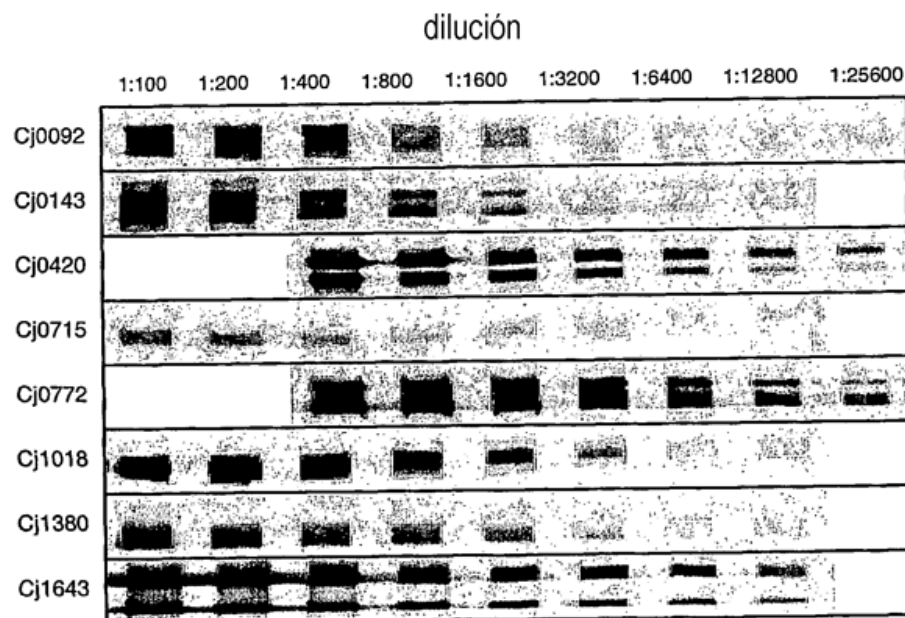


Fig. 3

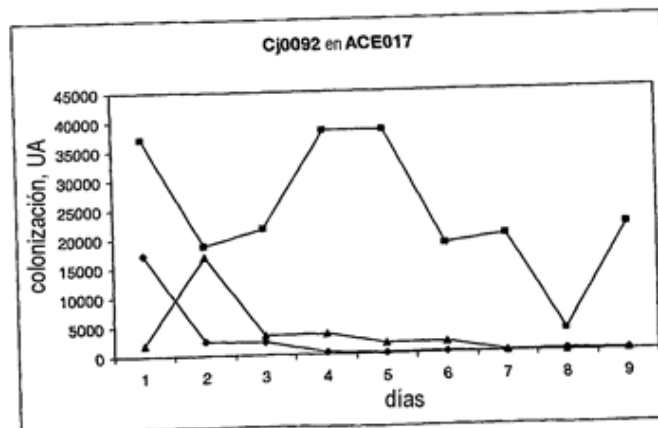
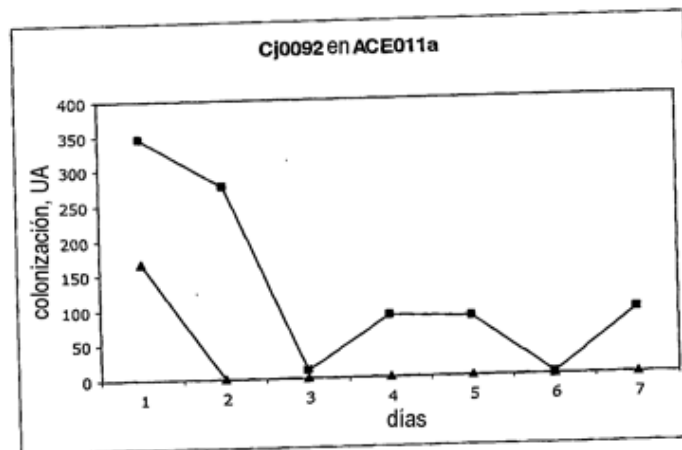
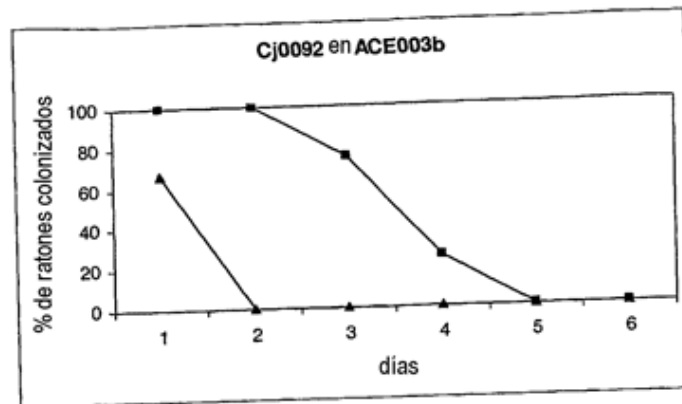


Fig. 3

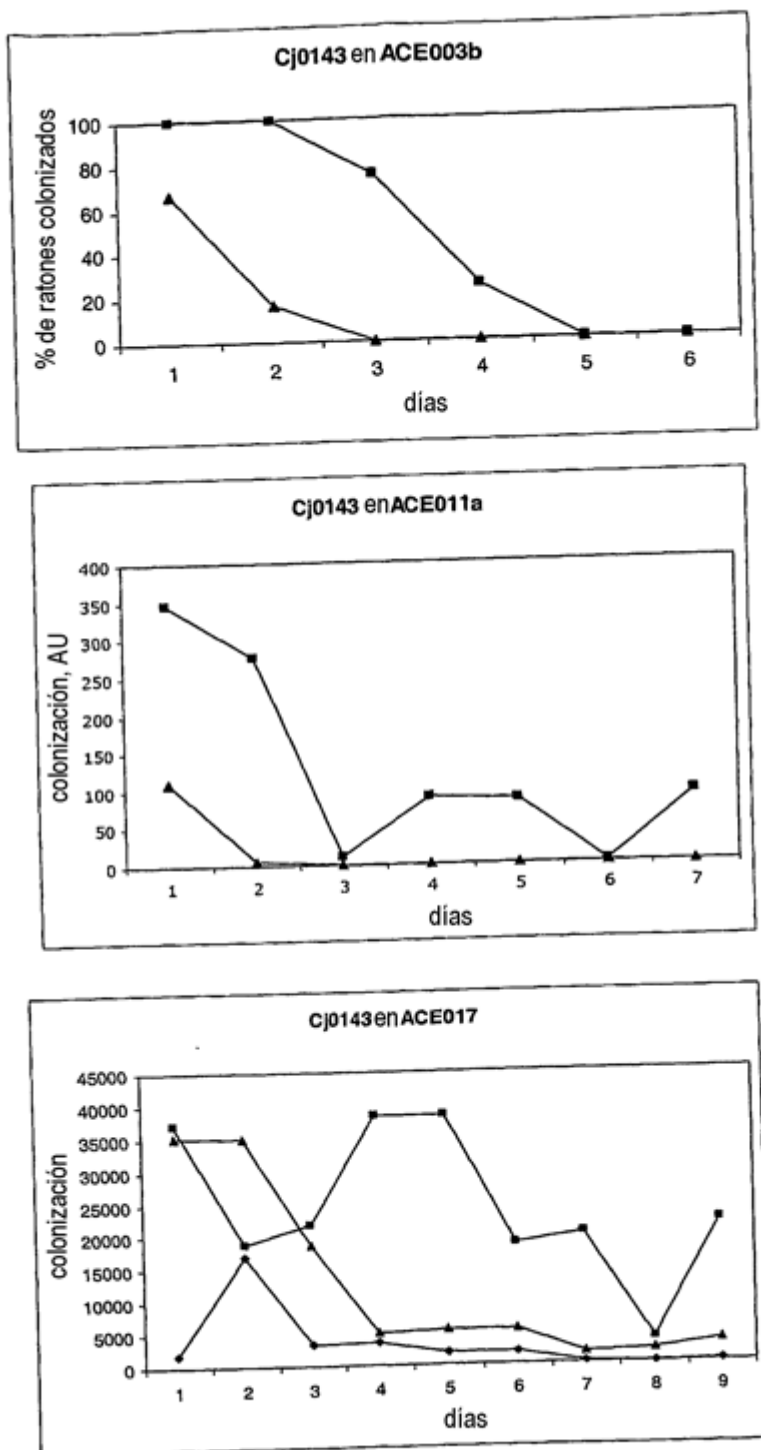


Fig. 3

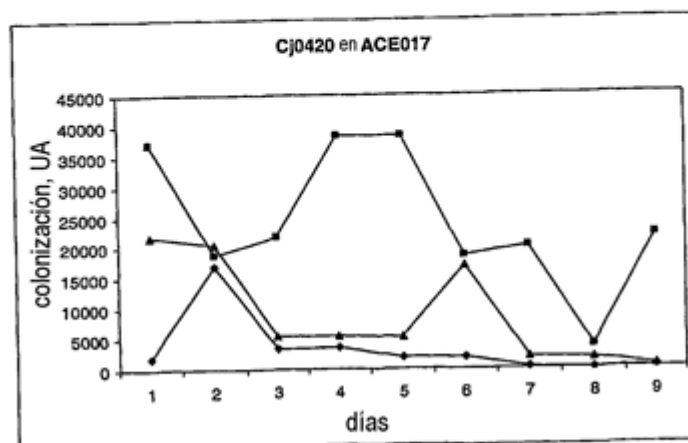
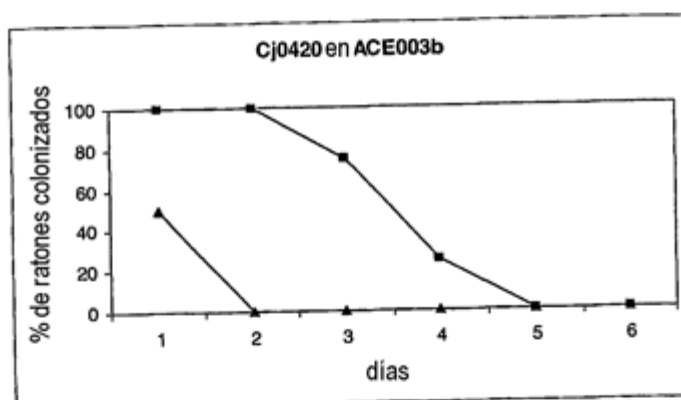
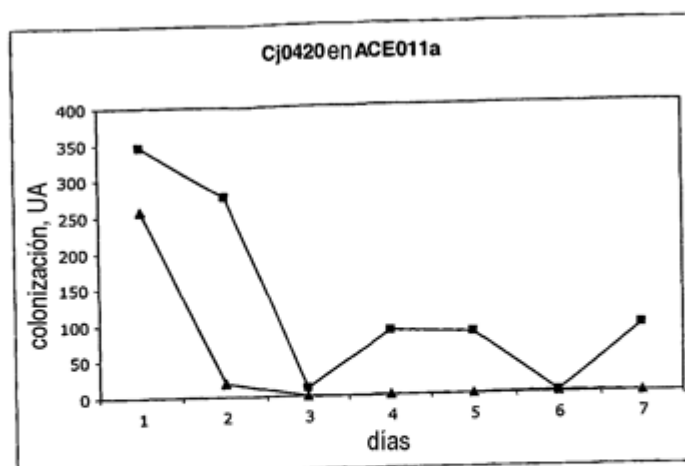


Fig. 3

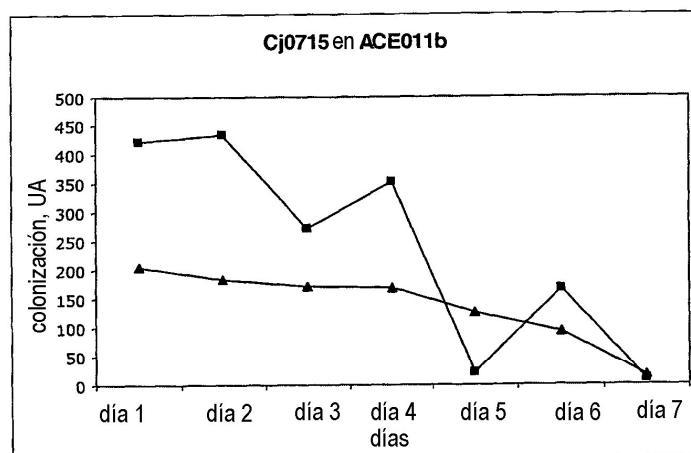
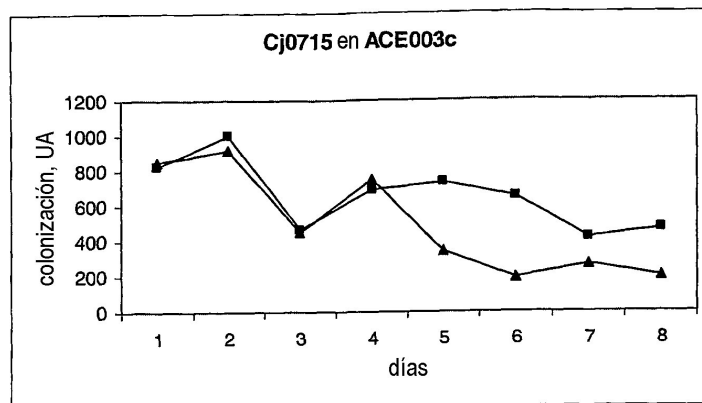


Fig. 3

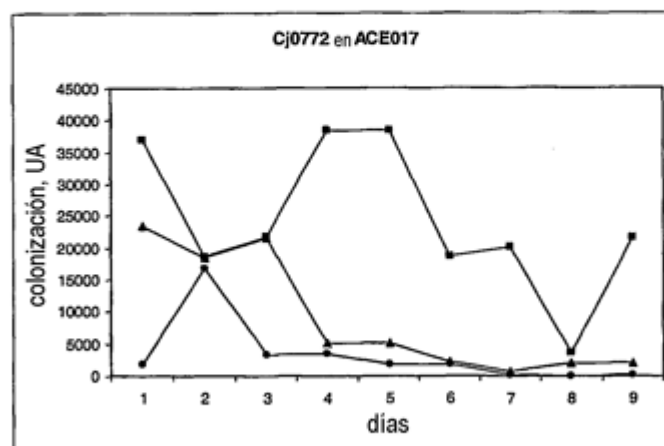
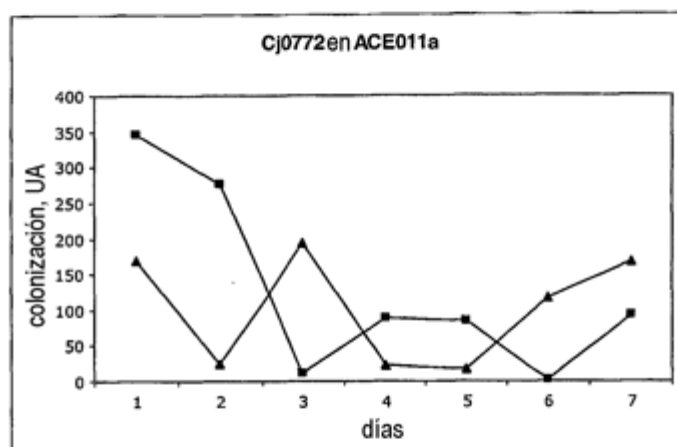
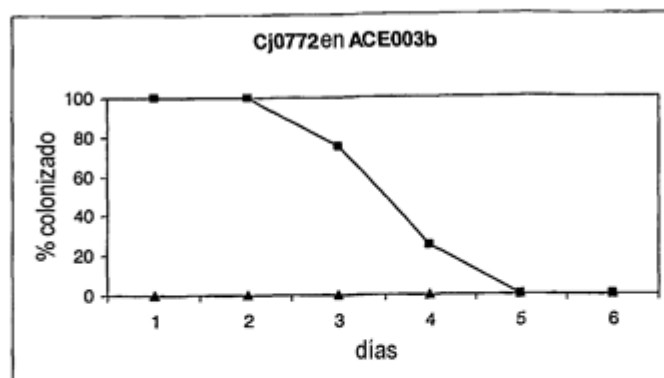


Fig. 3

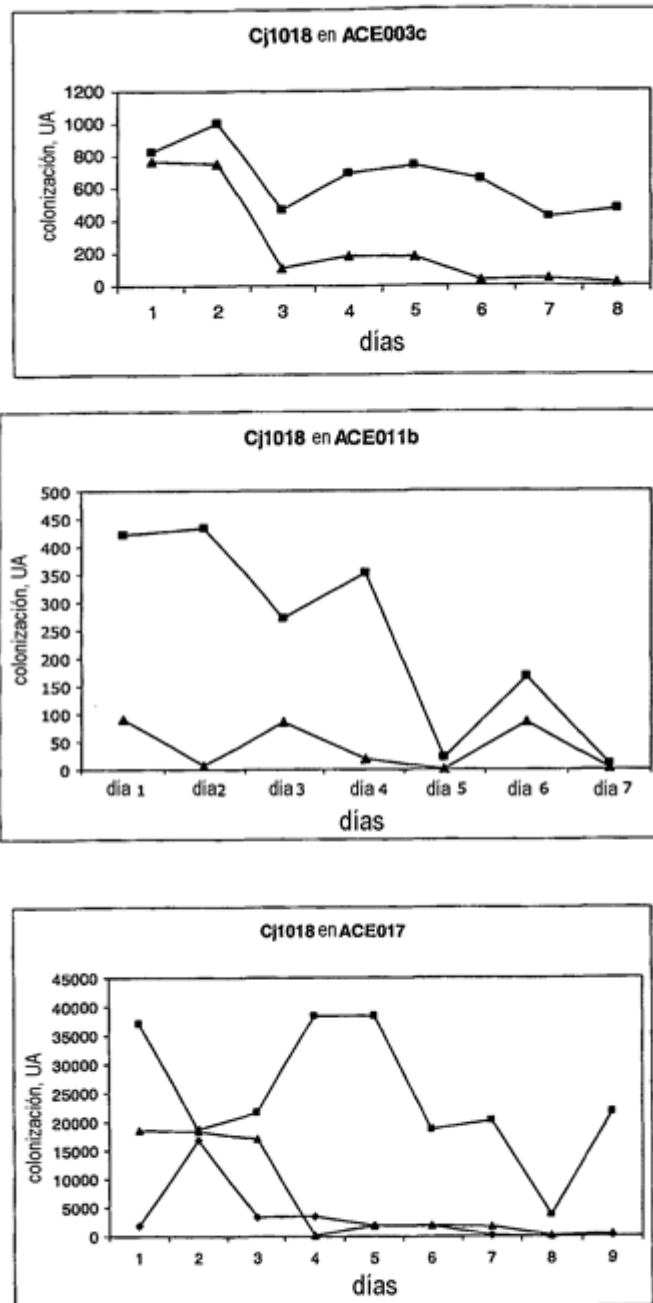


Fig. 3

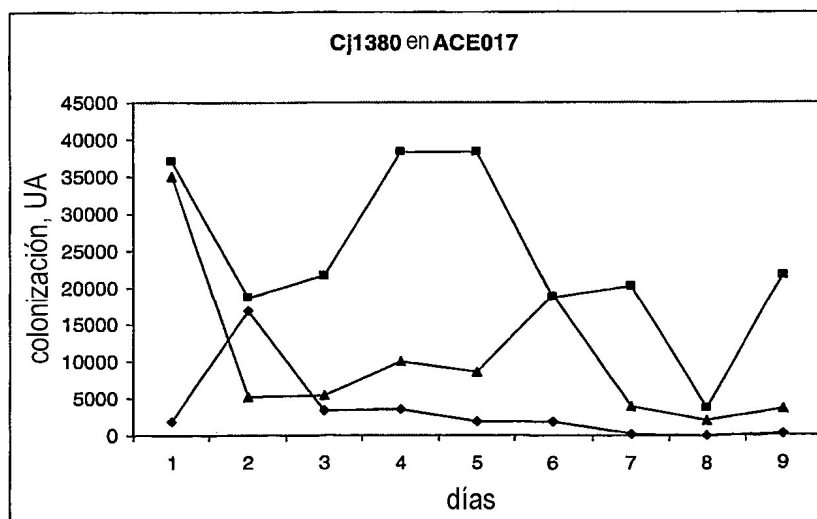
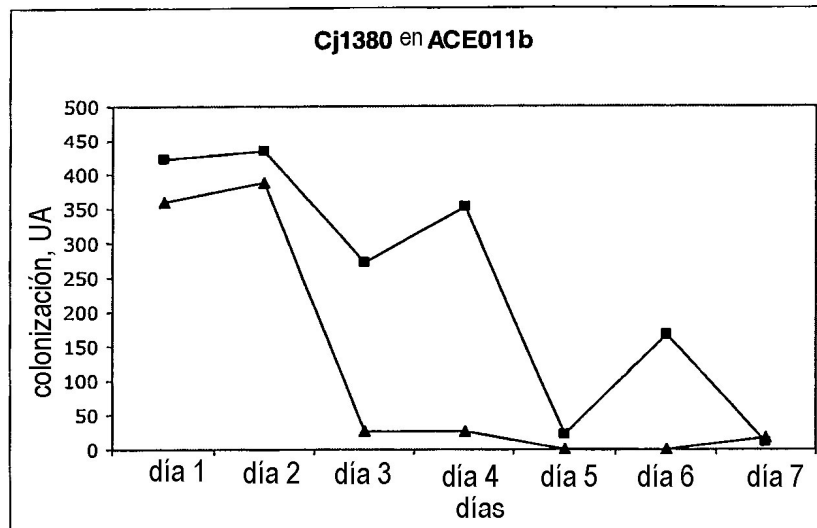
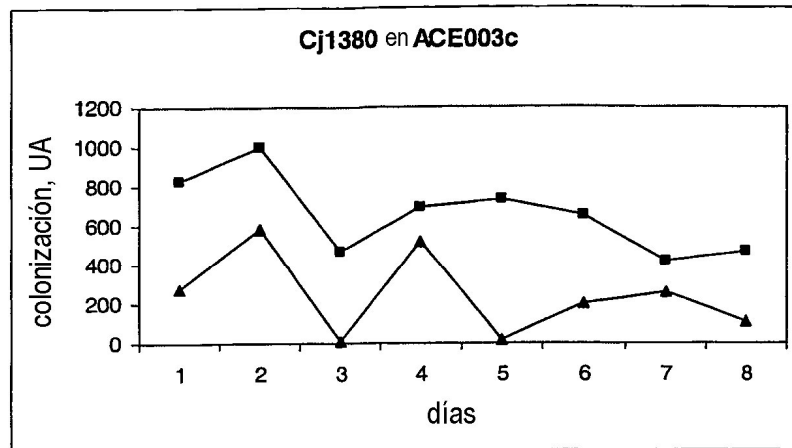


Fig. 3

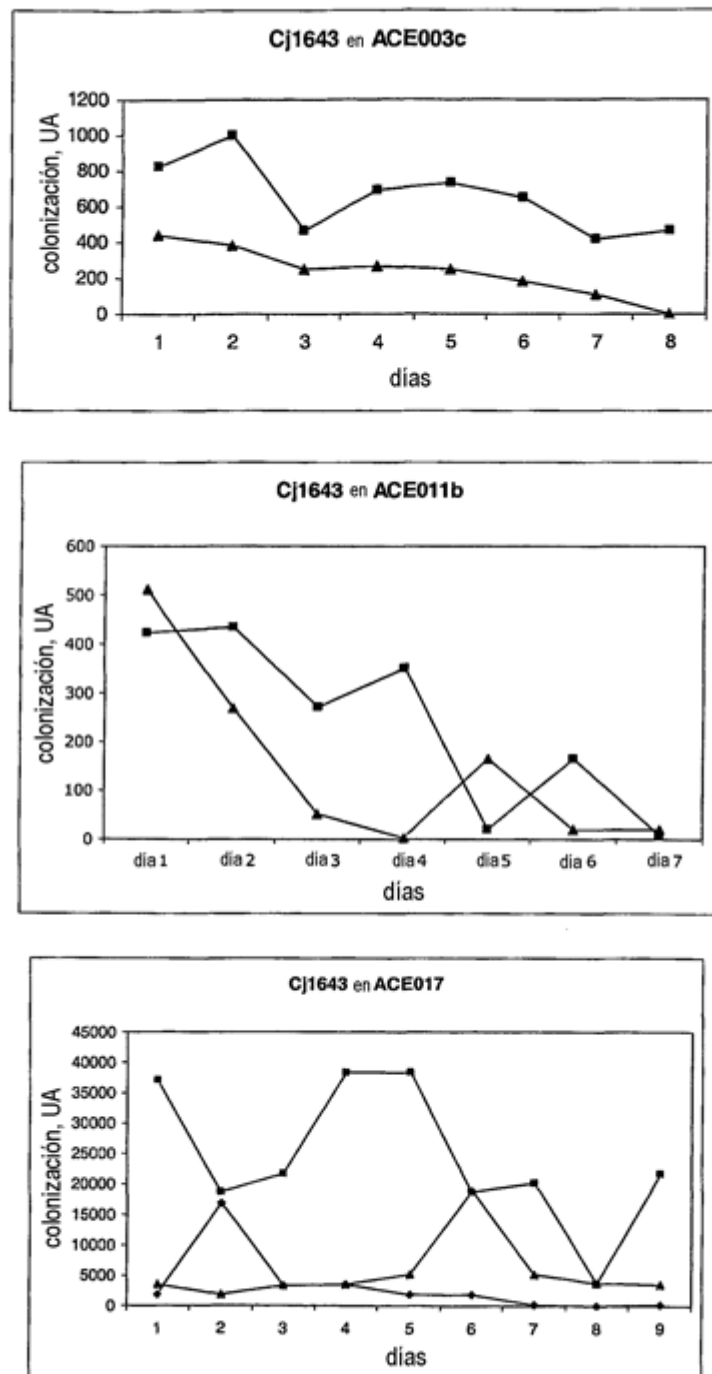


FIG. 4

Lista de Secuencias

SEQ ID NO:1

ACE83 Cj0092

>AnrP630851 (NC_002163) supuesta proteína periplasmática [c. jejuni]
 MKKILFIGSLVMASLLYAQGSQPVEITQQDINTQNEMSDASTKDITPKSIEDFFEEFADNFGIEYGITKD
 GKTFYTGKSTVAVNDTDPQFAQALQNAQKAMNLQSEFIRDAFGRIATSKIQNYEADNSTNAKEFDEL
 KGDKVDQILNKLTLQLAGAQLDKALDGLDITNSLSEDRKKTLLKQEFNKMTNAIGSMSGLVPVQTI
 QRRGEYDVGVVAVISNKTRQLAKDMALARQSAIKGKGKAISEYLPKDTKGFLNEYGIRLVYDENGAPIIL
 SYGNWGYVADPSNAKKTNILEDRAKETALTADAIIIEFINTNLKDKERTTGDYEEIIKQSINVDSS
 TQEQTNITNIIDKVNKIKASASGKIRGIRTLKKWSYTSENGIEHVGAVERFYSYENLANTNEALNSKSN
 ATKNEAKSSSIQRSSNVVNSMDDF

SEQ ID NO:2

ACE 5 Cj0005

>AnrP544820 (NC_002163) supuesta oxiodoreductasa que contiene molibdeno
 [c.

MKQNDQKENRRDPLKNIGLGLFGISVLSNFSFENFLGSKALAKELPDFKIEGKKDLIYHGEKPLTAETEI
 YALDSDFTKPENFFVRNGLPPSLETIKERLHKWTLIEDGESIINKKSYTIEDLKKKFKTYTYALTVEC
 GGNRSEVIPSTKGTQWGYGAVACGRWTVRLKDILKDCGINKDAVYIGYIGIDTKLNGEETSPISRGVP
 ISKALQDETLIAWAYEGKDIPLVNGYPLRLVCGGYPASTSGKWLYKISVRNKIHDGEKMEGSYKVPVNPV
 KPGDFNYKGEMKIIIESMPIRSIVITNIKNGSEIKANKKFEVRGKAWAGELEVSEVYVSNYDYGVTWTAKVE
 KPLNRLAWQKWSAQISIPTKGYEIIWARAIDSQNSQPMVLAQWNPGGYINNACHRVNVYGV

SEQ ID NO:3

ACE 29 Cj0029

>AnrP372217 (NC_002163) L-asparaginasa citoplasmática [c. jejuni]
 MKKAKSRIAILGTGGTIAGFIDSTIATGGAAGIDIDVLIAVPOIRDLADISWEQIANIDSSNMCDIEI
 WLRALKIAKLFABGIDGVVITHGTDTMEETAYFLNLTKSDKPVVLVGAMRPSTAIADGPKNLYNABA
 LVVNKEAKNKGVMVAINDKILSARGVVKTHSLNVDAPSSPDPGLGYIVDGKVPFYNNVIKAHTKNAPFD
 VSKLTSLPKVDILYSYNDGSGVAALKEFHGTKGIVVAGSGAGSIHKNQKDVLEKLLKGLKVVVSSRV
 VAGCVAVSDSDEKLGFI SAEDLNPOKARVLLMLALTKTSDPKKIQEYFLKY

SEQ ID NO:4

ACE 37 Cj0037

>AnrP501075 (NC_002163) supuesto citocromo c [c. jejuni]

MKKHILLGLCLSLSLSAKSVSDYKVGELSDKEGVEYFKELSKRPVQEWPNKNSINDVPGKGQGDILIR
 YGIELLSKTESTLGPYSKLKTSNEVNCISCHMDNDGNGLPGTKKYVIFFLNILNNYPRLDIETMKIISV
 EDRIRGMGGTDSHRFPNDSEKEMKAILAYPKWLKEAYGIKDGVKLEGGDFPAKMNFNNRPAFPVRGKKLP
 NCVACHGERGLGVKNDNYEQSGHLYPSLLIYPDGGHMAMI PFLARFLKSAMPPGASADNPILSDEDALD
 IAAVNTGFMVMPITTTENRAGLDATYKSPSLKPEYFASPQQNLDPKEYIKVKYGPWKNPNHFPGE

SEQ ID NO:5

ACE 84 Cj0093

>AnrP666574 (NC_002163) supuesta proteína periplasmática [c. jejuni]

MKIIKILFLGLFLSLSLNAKVITTTSTKSSTGEGTGLTREDAINNAIIEAIGKMSGVSINSLKKSNTSVS
 TDNSGSNIQDNYSEQISKATKGRADTYEINSVEQDANGKYTANVTIFKTTTCKKYQAPGLSADNRRSITV
 FDSTPDAAKRGIGSALQKKIISDLLQSRKPNVLRDSSGGYEMEKALIKSGDAASDEVYKLKNMLATDYI
 LLFSISGLEGKQKTSNLTGKSKTEIEVIVDYRVLLFATRQIKFSNTLSMKVNLKDNLSANETALKQIAN
 RIAGDILNAIYPLKVASVENNEVIFSQSLNQGDVYECFALGVKIKDITYTKENTGRVESKTGSIEITRTSP
 KFSYAKITSGSVKVGDICRPLSNTGSGNGYITGRDANYQTQEGGGVNLGF

SEQ ID NO:6

ACE 98 Cj0107

>AnrP732169 (NC_002163) subunidad beta del sector F1 de ATP sintasa [c. jejuni]

MQGFISQVLGPVVDVDFNDYLPQINEAIVVNFSEBGKHKLVLEVAHLGDNRVRTIAMDMTDGLVRGLK
 AEALGAPISVPVGEKVLGRIFNVGTGLIDEGEEISFDKKWAIHRDPAPFEDQSTKSEIFETGIKVVLLA
 PYAKGGKVGLPGGAGVGKTVIIMELIHNVAFKHSGYSVFAGVGERTREGNDLYNEMKESNVLDKVALCYG
 QMNEPFGARNRIALTGLTMAEYFRDEMGLDVLMIIDNIFRFSQSGSEMSALLGRIPSAVGYPQLASEMG
 KFQERITSTKKSITSVQAVYVPADDLTDPAPATVFAHLDATTVLNRAIAEKGIYPAVDPLDSTSRMLDP
 NIIGEBHYKVARGVQSVLQKYDLQDI IAILGMDLSEEDKLVERARKIEKFLSQPFVFAEVFTGSPGK
 YISLEDTIAGFKGILEGKYDHLPENAFYVMGNIDEALAKADKLKG

FIG. 4

SEQ ID NO:7
ACE 103 Cj0112
>AnrP511634 (NC_002163) proteína periplasmática [c. jejuni]
MKKIVAIFLVFLGSLWAEDPVIDVNSGVLPKIIIVKDNSNLSDENLKKSFYNIIVNDLKVSSNFEVVAN
ATETSNIYIFETLKNKNTLSLVKIKAGGSDKSEQTYTLNGLBQYPPFLAHKSVKASVNALGLAPVDWMD
HKILIIARNSSSKSQIIMADYTLTYQKVIVDGGILNLFPKWGNKEQTLFYTTAYDHDKPTLYRYDLNTNKA
SKILSSGGMVVASDVNVDSKLLVTMAFKDQPDVLYDLNTKNLTQLTNYSGIDVNGNFIGSDDSKVVFV
SDRLGYPNIFMQDLNSNSAEQVVFHGRNNSAVSTYKDFLVYSSREPQAGVFNIYLSINSIDYIRQLTAN
GKNLFRPSSDGGSIIVFIKYLGAQSALGVIRVNANKTFYFPLRVGKIQSIDW

SEQ ID NO:8
ACE 134 Cj0143
>AnrP57234 (NC_002163) proteína de unión a soluto periplasmática para el sistema de
transporte ABC [c. jejuni]
MKKIIILFILSLGIFYTFTQAKNLEQEQTSSNLVSVSIAPQAFVVKIAANTLDVNVILPPNSNEHNFEF
KPSTMKKLEKSDIYFTIGLEFEKVPTDKFKQNFPKLQVINMQKNIALIQTHDTHHEHSHHEHGHGFDP
HTWLDPIVLQTMALNIYDTLTIQKYPQENLYKENLDKFLAELDSLNLQIASKLEKLNREFVYVHPSWTY
FAKRYNLTQIPVEILGKEPKSKDLQKLITLMKDKNLKVIFVQNGFPENAAKTLAKECDAKIYKIDHLSYD
WENELLKTADAFSHNL

SEQ ID NO:9
ACE 159 Cj0169
>AnrP829849 (NC_002163) superóxido dismutasa [c. jejuni]
MFELRLKLPYDTNAPGDFLSAETPSYHHGKHHTYVTVNLNNLIKDTFAGKDLVSIKTSNGGVFNAAQV
YNHDFYFDCIKPSTGCGCGSCQSIDANLQAALKEKFGSLENFKAEIFKATGVPGSGWFWLVYNTKNQK
LEFVGTSNAATPITEDKVPLLVVDVWEHAYYVDHRNARPAYLEKPYAHINWEFVAKAYEWALKEGMSVS
FYANELHPVK

SEQ ID NO:10
ACE 183 Cj0193c
>AnrP139712 (NC_002163) factor desencadenante (peptidil-prolil cis/trans isomerasa,
chaperona) [c. jejuni]
MEVKAQQLDSVNATASVKIPSGMIKSEVENLAKKASKSVKMDGFRPGKVPVSAVLKRYERELTQDABQNL
FKSAVNSALQELKKENKELVGEPEYFEKFDKDGEEIAELILSFKPEIKLEGYEKLIPEYQTPKVSKEID
EKDELLKRFATPEAIKTKRALKEGDPKAFDFEGFVDDKAFEGGKAENYVLEIGSKQFIPGPFEDGMVGMK
IGEEKIDKVFPEKEYGAHLAGKDAVFKVLHEIQELKIPELDDEMLKLLPGEEKASVEVLDEKLKEQI
KNEKLPKLVNDELKGPADALIEKYNFDLPKGIVEQETDMQMAAFNTPSEKIEELKASKEKYQEKRS
FKEEAQKSVKLTFFIIDEALAKLRKIEVNDQELQAIYFAYRYGMNPKEHLENYKKQGALPAVKMALIEEK
LPNDIFIPKTEKSEKVSKEKEDK

SEQ ID NO:11
ACE 259 Cj0285c
>AnrP467527 (NC_002163) proteína de quimiotaxia [c. jejuni]
MPDENIVKTSNEMELVDPRIFKQGHDKVYEGYGVNVSVKREIIPSLTELPGVDPDYIEGIFDLRGVV
IPVNNLAKWMQITEPESTMLKPRVITIEFSNIIIGFIVHEAKRIRINWKDIEPATFTSGSGALDGKIT
GVTRIENDEVLLILDLESVVEDLGIYAPKTDIDFGKIEKFTGTALILDDSMATARKRVKEMMQMGFQVVE
AKDGVGINKLEELSQIYGESLNDTLKIIIVSDVEMPQMDGFHFAARIKEDPRFKDIPVFNSSLNNEFMN
EKGQVQAGGEGYLVKFNASDFFNEIAKVIKKHQSSEQG

SEQ ID NO:12
ACE 332 Cj0358
>AnrP681041 (NC_002163) supuesto citocromo C551 peroxidasa [c. jejuni]
MKVKSLLIASLVAFSSLNAAASLIDEAKNSGLVALPKDQKGVDEILKQNGVKAASEFTLEKAEKGKLYFEP
RLSKSGIISCNTHNVGLGGTDGISTAGHKWTANPHHLNSPTVYNAVLNNTQFWDGRAGTLADQAKGPI
QADPEMATPAKLAVEKISSLEPYVSEFKKIYKSGVNFNDNIADAIANFERTLITPSRFDKFLGDEKALT
KEEQKGLKLFIDKGCVACHNGVNLGGNMQAFEVAGKYKFANLGDGFGDANGMVKTPTLRNVAETAPYFHN
GAIWNLKDAIKEMGSVQLGIKISDKAKSIETPLKSLTGTKPAIVYPQLPISTEKTPKPEL

SEQ ID NO:13
ACE 419 Cj0448c
>AnrP569688 (NC_002163) supuesta proteína de traducción de señales de tipo MCP
[c. jejuni]
MFGSKINHSDLQKLEENKNLTHKIEKFQSENLELKNKITSLEQAALSKLKTDLNVLTLGVKNITII
QGDMLNENKAEVISSYSKTLAEMDELNHIANSINASLGNITESANKTRDVAGTLHRSVDEITNVINLI
KDVSQDTNLLALNAAIEARAGEHGRGFAVVADEVRLKLAETQKATTEVEMNINLLKQANEMYTQSEQV
EKISIDNSAHIMSFSEKFTHLVNEAHSTNSNAVGIASEAFVSLAKLDHIAFKLNGYKEIFSKSGKQLADH
TSCRIGKWLASTGKERFGQNKSFLLKINEPHEKVHENMNAITANTEDISKDITQHSIINKCEVAENASL

FIG. 4

DLPNVFKEMLESDH

SEQ ID NO:14

ACE 420 Cj0449c

>AnrP852550 (NC_002163) proteína hipotética Cj0449c [C. jejuni]
MLHEYRELMSSELKGDHFDKLFDRHNELDMDIKDAEGRSLSSMEISTLKKEKLHVKDELSQYLANYK
K

SEQ ID NO:15

ACE 481 Cj0511

>AnrP255677 (NC_002163) supuesta proteasa secretada [C. jejuni]
MMELILKTRFFAGLAGFATTFILCLFLTSHLQAKVDQKEEQVQKRLEALDKLTAKTTLAIVEQYVDDQNI
SDLVDKSLSGLLSNLDAHSSFLNEKDFNDMKIQTNGEFGGLGITVGMKDGALTVVSPIEGTPADKAGIKS
GDIILKINDEATLGINLNDKMRGKPKTQITLTIFRKGATKPPDVTLTREIIEKIESVYAKMIENENIL
YLRVTNFDKNVVDVASKELKKYFNVKGVILDLRNNPGGLLNQAIGLVNLFVDKGVIVSQKGRIASENQY
KADPKNKISNASLVVLVNGGSASASEIVSGALQDLKRGVIVGENTFGKGSVQQIIPINKTEALRLTIARY
YLPSSGRTIQAVGVKPDIEVFPKGVNTQEDGFSIKESDLKQHLESELEKIDKNKKEDKQENKDNKNLISQK
QINDDAQLSAIDTIKILNIKQGG

SEQ ID NO:16

ACE 528 Cj0559

>AnrP252410 (NC_002163) oxidoreductasa [C. jejuni]
MKKIDLIIVVGAGPTGIGCAVEAKLNKEVLILEKSNNICQTLMQFYKDGKRVDKAYKGCEGTHGHVFFE
DGTKESTIETFNALKEHNIEVEFGSEVESVKNENGVLVSTAGVYECNNIIVAIGRMGKPNKPDYKLP
MTLTKIINFNANSVLGNELILVVGGSNAAEYAVDLANSNQVSLCYRKKEFTRLNDINLKDIEAGNSGK
VELKLGIDINEVEDDNGKAKVNFTDGTSDIYDRIIYAIGGSTPLDFLQKCGINVDDKGVPLMDENKQSNV
KGIFVAGDIATKNGASIVTGLNDVAVKILSVL

SEQ ID NO:17

ACE 582 Cj0613

>AnrP916533 (NC_002163) posible proteína de unión a fosfato periplasmática
[C. jejuni]
MKKILSLSVTSLALCGALNAVDLKIAGSSSTVYPFTSFVAEEYASIKNTKTPIVESLGTGGGPKVFCEGTT
DISNASRPMKLESEFETCKKAGVTDIVGMIGYDGIIVLAQNKTNAPLNITKKELFLALAKEIPQNGKLIPN
PYTNWQINKNLNPKISVYGPSSSGTRDTIELVMSDVSKKIPEYKGEYKTIRQDGAYIPSGENDNLI
VSKLTIDKDAFGIFGYSLVNSDKINAAIDGVTPEESIADEKYELARSLFIYINAKKNPKKAPDFAK
IYMSDDLAKSGGELEKIGLVPLSDDKLKASQKHVEDRKILNDELVKAGKVF

SEQ ID NO:18

ACE 605 Cj0636

>AnrP126795 (NC_002163) proteína de la familia NOL1\NOLP2\ sun[C. jejuni]
MQNILSSFAQEKNVCFANTLKTSEIELEKEFLKQNLKFKKINVCYLFDAKDKAILSSMKAFNEAHFYI
QNYSSYLALNLEVKAGQSVLDMCAAPGGKSINLANFMQNTGYLACNEMSRDRFFILQKNLKNYGVNAKV
FMKDGNKIGNLCLPKFDKILLDAPCSTFAKIGFDLEKSYKEIKNIAKTQKKLLHSALKALKIGGELVYST
CTPTKEENEEVIALNKSEFKLELLDIDLENVEAKAGQSEEFAEISKRRILPSLDYDGFPIAKLRKLC

SEQ ID NO:19

ACE 667 Cj0706

>AnrP327756 (NC_002163) proteína hipotética Cj0706 [C. jejuni]
MNKYLEQLVLLSKIDQEIDSYPKIDSINKTLKDAELKIEKINADLEKIDIEIKDIENQKIQNNAHISEF
SAKIKDLSKSGVVKTEKEANALKIEEDIAKEQLDAANDEIVRLDKILENKETYKKELEEEKIKQEQNIN
EIRVSIKSEMEVLEKDRMSVYDKTKLVSEMNQKVLSPYEKIRKWAKNTAVVPVKKQACYGCFMKIYDKT
YLSVVGEEIVTCPHCGRILYKEQEEQN

SEQ ID NO:20

ACE 676 Cj0715 proteína periplasmática de tipo transtiretina

>AnrP684299

[C. jejuni]

MFSIKKTLILLASVPMFLSATEYQLSTHVLDITSGQPAPKVVELYKLEANQQWKKVSEEFTEENGRIGD
LLPYEKAENRAPGIYKLFPTKDYTTSHKINTFYFPFEVSFELSKDQKHYPITLSPFGYSTYRGS

SEQ ID NO:21

ACE 731 Cj0779

>AnrP191193 (NC_002163) probable tiol peroxidasa [C. jejuni]
MSIVNPKGNPKLKGNSVEVGADAPKVNKAKDLVIEIGAAGKTQIILSVPSLDPVCATEAREFNKKV
ASYNGAEVIVVSMDFAMGRFCSTEGIENLSVASDFVAKEFGKYGVLINEGALEGLLARAVFVKEGK
VAYKELVNEITEMPDIAKLDAFFGGSSCCGCGCH

FIG. 4

SEQ ID NO:22

ACE 853 Cj0909

>AnrP318705 (NC_002163) supuesta proteína periplasmática [C. jejuni]
 MKKILLLGALFAVNLWAVNDIEVKNAFVKQTPPHAQNSAIFLTIFNNTNKDIALISAKSDISEVSELHTH
 IHKDGKMMMQKIPEIIIIKAHSSTELKSGGYHIMLLKLKKPIIKDTKVNLDLKFNNHKTIELKNIDSKEF

SEQ ID NO:23

ACE 937 Cj0994c

>AnrP493933 (NC_002163) ornitina carbamoiltransferasa [C. jejuni]
 MKHFLTLDLDFSKKEILSLVNHASELKKEPKKLLQDKTLAMIFEKNSTRTRMAFELAITELGGKALFLSSN
 DLQLSRGEPVKDTARVIGAMVDFVMMRVNKHETLLEFARYSKAPVINALSELYHPTQVLGDLFTIKEWNK
 MQNGIAKVAFIGDSNNMCNSWLITAAILGFEISIAMPKNYKISPEIWEFAMKQALISGAKISLGYDKFEA
 LKDKDVVITDTPVSMGEENEKERKIKEFEGFMIDEKAMSVANKDAILLHCLPAYRGYEVSEEIFEKHADV
 IFEEARNRLYVVKALLCFLDNQRGRE

SEQ ID NO:24

ACE 941 Cj0998c

>AnrP979073 (NC_002163) supuesta proteína periplasmática [C. jejuni]
 MKKILVSVLSSCLLASALSAVSFKEDSLKISFEGYKTKDMIGTKGEFKNVEYKFSKNIKDLASYLKGAKA
 TIKPSNAFMGEGNDIITNNITKVFFPALLGDTDIKVVFQDVIAGENKGVISAKITMDKKSTIVPLTYTIK
 DNKFEAKGQLDLHTFKNGSKALKALSDVAAGHGGISWPLVDISFNADLAE

SEQ ID NO:25

ACE 961 Cj1018c

>AnrP257863 (NC_002163) proteína de unión periplasmática del sistema de transporte ABC de
 aminoácidos de cadena ramificada [C. jejuni]
 MKKSLILASILSLSLSAAEVKIGVVLPLSGATAAYGQSALEGIKLANSMQSALSNGDKVSLAIIDTKGDK
 LESSSGANRLVSQDKVIGLIGEMVTANTLQVMRAEDNKIPLIAPAATGDRLLDKKIYSSRVCFMDSFQG
 SSLAKYVFSKLNYSKSAVIVVDQSTDYSLGLAKAFEKQYKSGGQILRLRVNSGDKDFRAIVAQVKSINP
 EFIFLPLYYSEASLFARQSKLAGLNIPMGSDAGVADQTFISLAGDASEGYIFTDSFDANNPTTKLSKEFI
 SVYEKAKGTKEVPNFSAMGADAYFVMLNAMNACVENLTSKCVNEKIHQTKNYQGVSGVISIDQTNATRS
 VVVKEIKNQKQNYKDIINP

SEQ ID NO:26

ACE 962 Cj1019c

>AnrP326257 (NC_002163) proteína de unión periplasmática del sistema de transporte ABC de
 aminoácidos de cadena ramificada [C. jejuni]
 MKKLTLTLSVLTMVNCIYAKDINIGVVLPLTGTVAAYGQDVFNGLIELANKLQPKLSNGDVIKLITIDTKG
 DKLETNGVNRILIAITDKVLGIIIEATTPNTIQAIISIAEKKIPLIAPVASGDKLLDKKKYASRVCFKDSF
 QGDKFATYVSKDLGLKNAVIIIDQSNVYSLGLARAFENSFKNNGGKIIKKLVINSBGDKDFRAVVSQLKSL
 NPDFVYMPIYHPEAALIAQARQIGFDKLLVAGDGVNNQTFIDLGSSAVNGVIFTDSFDYNSPSTQLGKD
 FVAAYEKVKGTKELPAFSAMGADAYFVMLNAMNACVDNLSSECINSKIHQTKDFQAVGGVISIDESGNAI
 RSVVIKEIQNQKQNYKTIINP

SEQ ID NO:27

ACE 984 Cj1041c

>AnrP198268 (NC_002163) supuesta proteína de unión a ATP/GTP periplasmática
 [C. jejuni]
 MKKYVLSLALLGSLGASELKYQEFDFGFKSPESIFVDKNYVYVSNVGEKLEPLAKDNDGFISKLDKNGKV
 LEYKFLTHLNAPKGMMEIGKTLVVDIDVLRGFDLKTKEIFNLPIKGAIFLNDIEKLDDNTLLVSDTGT
 GLILKVDLTKQYDELLKLDAKFGGPNGLYLDKHKHKLFIAGYHPDGVSGGVVMAYDLNTKELSIKNE
 KESYDGIVPYKDGLLVSSWGNNLNGYIYNLDNVKSVKLELPLMKGPADIFIEGNILWIPKMVEGKIFKVE
 LNK

SEQ ID NO:28

ACE 1094 Cj1153

>AnrP385049 (NC_002163) supuesto citocromo C periplasmático [C. jejuni]
 MKKLLVVSALACLGVSFAADGATLFKKCAVCHGANADKVYLNKVPALKTLSSAERLQYMKYSEGRNA
 YGQGAIMKLNKGLTEEDFKAIEAHITLK

SEQ ID NO:29

ACE 1155 Cj1214c

>AnrP470247 (NC_002163) proteína hipotética Cj1214c [C. jejuni]
 MFKTIVCFALNLSLFAVGFDLKPISSELVKVDDIYGYIKSDDDIKLYSSGVVQHFNSQSIIARASVI
 DKKNGLAKLEFSVFSALKQDALPLPNVLPKVGDEVVLNFLYDRGLVIAPDEQTYNELVREFFQIYFTHID
 IFGAQLIRTATLSPKRSDFRQFCDDNAVILVVALENHAEVDCQDFNKLYEVPISKPTSVQVPFYSRIG
 GYKSNFFDFNSQEIGNYYRYDALINLPKVQ

FIG. 4

SEQ ID NO:30
ACE 1227 Cj1287c
>AnrP530915 (NC_002163) malato oxidoreductasa [C. jejuni]
MNLKEEALKYHLGGKIDIVPSKPMATSYDLSLAYSPGVAEPCLEIAKDNEAYTYTNKANLVAIVSDGSA
VLGLGNIGAQAQSKPMVEGKACLPKKFANVNAYDIEINVHSIEEIVNFCALAPTGVGINLEDAAPKCFE
IEAALQDLGIPVMHDDQHGTAIIISTAGLMNAMEISGKKFKDIKVVVSGAGAAGIASAKMYRNLGVENIIL
VDSKGVISKDRNDLTFQKLEFAVDSKEKTLKVLKGADVFLGLSAPKILDDDEMVLMAKDPVIFALANPI
PEVMPEDVARLRKDAIVGTGRSDYPNQINNVLGFPFIFRGALDVRASKITENMKVAAAKALADLAKLPVS
DAVKKAYNLSTLEFGRDYVIPKPFDERVKAASVSTAVAAAADKGVAKVKNPDEKAYFESLK

SEQ ID NO:31
ACE 1320 Cj1380
>AnrP108083 (NC_002163) supuesta proteína periplasmática [C. jejuni]
MKKLSLILVCSASLFAASNSEISDFYSKSIKAQFPNATVSVSNRQKVGNTGFESVIVSVELNGQKQENIL
PTKDSLITPDILDLKTGISYAQYEMKKFQARENFTKNAKAVAQKETMVIALGDKNKPPIVYVSDPECP
YCREHLAQIDDELKNYQVNYILTTPVHGKSAFEKSALIYKEAKKAKNDKEKIAILNKYYDANIKNYPKVSD
AELKEVFSLEYEYRSLGLSATPTIHK

SEQ ID NO:32
ACE 1431 Cj1496c
>AnrP947055 (NC_002163) supuesta proteína periplasmática [C. jejuni]
MIKKFILLVFISSVVGAEQDCEQYFEARKAQIELQTRFDEARQSLEAYKASPEALQKERLENLEKKEA
KVNATLAKIEELKLENARLVEBQKILNSINDKTQGRVKEIYSQMKDAAIADVLSQMDAEDASKIMLSLE
SRKISGVLSEKMDPKKASELTLLKLNLDNNASN

SEQ ID NO:33
ACE 1449 Cj1516
>AnrP407504 (NC_002163) supuesta oxidoreductasa periplasmática [C. jejuni]
MNRNRLKFNALTLASMGVAYANPMHDMHSMHKNHSINHDLDTSFINFAPKNLKLDPKQFPQGEILKAL
PLLKNESKEKNIFRATLEIKENHIELIKGKTLFTYTNGLVPAPKIEVFEGDKLEILVKNKLEATTIHW
HGVPVFPDQDGSHPDILAGEERIYRFEIPQDSAGTYWYHPPHYTASKQVFMGLAGAFVIKAKKDALSH
LKEKDLMIISDLRLDENAQIPNNNLNDWLNREGGEFVLINGQFKPKIKLATNERIRIYNATAARYLNLRIQ
GAKFILVGTDDGLIEKAIYKEELFLSPASRVEVLIDAPKDGNFKLESAYYDRDKMMVKEESNTLPLANIN
LKKEKLELPKNLIFKPLEEPKEFKEIIMSEDHMQMHGMMGKSENELKIALASMFILINGSYDLKRIDL
SKLVGVVEDWIVINKSHMDHPFHIGTQFELISSKLNKGKQKAEFRAFRTINVRPNEELRLKMKQDFKGL
RMVHCHILEHEDLGMGMNLEVK

SEQ ID NO:34
ACE 1469 Cj1540
>AnrP818860 (NC_002163) supuesta proteína periplasmática [C. jejuni]
MKKIIISLALALASASAAELKMATTSTDTNTGLLDALKPLYEKESGNTLKWVAVGTGAALKMGEDCNADV
LFVHSPKAEKEFKMGKPGVDRTPVMYNDPIIIADKSLASKFKGNLKESELIKNEKLTIFISRGDKSGTD
NKEKSLWKNLGGVPEKQSWYQQSGQGLASIKIAEKKGVILTDRGTIYKYANEKGNLPLVINEGDDSD
LKNFYSVIATNPKHCKNVNYTEASKFIKVVTSKTLNFIADPKLLNKLPLVIDAKTRKD

SEQ ID NO:35
ACE 1584 Cj1659
>AnrP294550 (NC_002163) proteína periplasmática p19 [C. jejuni]
MIKKVLSVVAATAVISTNLFPAGEVPIGDPKELNGMEIAAVYLQPIEMEPRGIDLAASLADIHLEADHIAL
KNNPNGFPPEGFPMYPYLTIAVELKNTDTGAIKRGTLMPMVADDGPHYGANIAMKDKKGGFGVGNLYETFY
ISNPEKQGFGRHVDDEETGVGKWPEPFPKVDYKFKYTGTTPK

SEQ ID NO:36
ACE 1569 Cj1643
>AnrP407676 (NC_002163) supuesta proteína periplasmática [C. jejuni]
MKKLIICMLFTLSFGIERPKFEDFLAGYERNKASMLNYEGMPAFALSENLLAVLKQPNKLNKYVKYDP
FLNLYLVRTDFSLIPTPMGDEEKLTRNDWVGWIDPNKPYIGHIKYLAQNIDEKDQLDFNSKIGLGTGCC
EMMGIALNNSPFGNRYLKHFMKYNDVYVGDIGVDFVRENKIYVNNVRKNPQFLINDQVISVDGLPAND
LRKLNELKILFADRGSTLYPQVLRDNDMLNISTEVFAKDLKFNLPDSKPKPKITNFTSNLGLTVNASLIV
TKIDPKSVSNAGFMVGDKILRVNNIILNFKELQNLISAGNDFSILIERKSTKLPLSNFNNELGGNANS
GGDGKFPFFIRLTK

SEQ ID NO:37
ACE 96 Cj0105
>AnrP758295 (NC_002163) subunidad alfa del sector F1 de ATP sintasa [C. jejuni]
MKPKADEISSIIKERIENFDLNEIETGKIIISVADGVAKYGLKNIMAGEMVEFENGDKGMALNEESS
VGIVILGKGBGLKEGASVKRLKLLKVPVGEALIGRVVNALGEPIDAKGVINANEYRFVEEKARGIMARK

FIG. 4

SVHEPLHTGIKAIDALVPIGRGQRELIIGDRQTGKTTVAVDTIISQRGQVICIYVAIGQKQSTVAQVVK
RLEEHEGAMEYTIIVNAGASDPAALQYLAPYTGVTMGFFRDNAKHALIVYDDLKSHAVAYREMSLILRRP
PGREAYPGDVFYLSRLLERASKLNDELGAGSLTALPIIETQAGDVSAYIPTNVISITDQIFLETDLFN
SGIRFAINVGLSVSRVGGAAQIKATKQVSGTLRLDLAQYRELQAFQFASDLDEASRQLERGQRMVELL
KQPPYSPLSVEKQVVLIFAGTKGFLDDIAVSRIKEFEDEGIYFPFIEAKHPDIFEQIRSKKALDSLEEKLA
KAINFEKANHL

SEQ ID NO:38

ACE 165 Cj0175

>AnrP50554 (NC_002163) supuesto sistema de transporte ABC de captación de hierro periplasmático

MKKIFFMFLTAVSFLGASELNIYSARHYNADFEEIKKFEEKTGKIVNHTQAKASELIKRLSLEGSNSPAD
IFITADISNLTEAKNLGLLSPVSSKYLEEFIPAHLRDKDKWEFAITKRARI IAYNKNTNIDISKMKNYED
LAKAEFGKEIVMRSATAPYSKTLIASIIANDGNKEAKAWAKGVLENLATNPKGGDRDQARQVFAGEAKFA
VMNTYYIGLLKNSKNPKDVEVGNLSGIIIFPNQDNRGTHINISGIAMTKSSKNQDAKKFMEFMLSPEIQK
ILTDSNYEFPINRDVELSQTVKDFGTGFKEDQIPVSKIAENIKEAVKIYDEVGFR

SEQ ID NO:39

ACE 257 Cj0283c

>AnrP602342 (NC_002163) proteína de quimiotaxia [C. jejuni]

MSNEKLEQILKQKQQTQAGPDVDQREDDIIQLVGFVVGDEEYAIPIILNIQEIIPYETRVPSVPDYVLG
VFNMKGVMPLIDLAQRFHLLGSSKMTPTQRYIVLRGETNGTGVGGNAGFVIDRLTEAIIHRNRIDPPPE
TLVDDKGMIVGIGKRDENILTIKVEALLKREF

SEQ ID NO:40

ACE 277 Cj0303c

>AnrP311344 (NC_002163) supuesta proteína de unión a molibdato [C. jejuni]

MKKFVVFVFGILLFVSLNAQNLSIFVASSASKAMSEVKDEFLKTHPEDKIELVFGASGKYYELLKQGREF
DLFFSADTKYAKAIYDDKNALIKPKVYVLGVLLALYSLDENLQGGVENLKEKANKITHLSIANPKVAPYG
VAAKEVLENLGLNELLDKIVLGENISVPVLHVDSKNSDIAIVAYSLVSSINHPKKGAVIIDAKYFSPLE
QSYVITKYAKDKKLAFEFNEFIGSSKAKEIFKKYGFSTP

SEQ ID NO:41

ACE 308 Cj0334

>AnrP505685 (NC_002163) alquil-hidroperóxido reductasa [C. jejuni]

MIVTKKALDFTAPAVLGNNEIVQDFNLKYNIGPKGAVVFFYPKDFTFVCPSEIIAFDKRYQEFKRGIEV
IGISGDNEFSHFANKTPVNQGGIGQVKFPLVADLTQIARNFDVLYAEAVLRGSFLDLADGTVRHAVV
NDLPLGRNIDEMLRMVDTMLFTNEHGEVCPAGWNKGDEGMKANPKGVAEYLGKNEAKL

SEQ ID NO:42

ACE 388 Cj0415

>AnrP72219 (NC_002163) supuesta subunidad de oxidorreductasa [C. jejuni]

MAEVLKKVDVTVGAGWTGGIVAAELTKAGLNVLSLGRHMQSTENFNYIHDEWRYGINYGLMQDCSKDT
VTFRHDPGLALPYRKMGSFLLGNNVGGAGVHWNGWTFRMPYDFEIQTLSKQRYGNKLGNDYTLQDWGV
TYKDMPEYIDRFECTCGVSGEPNPLAEKMGAFRSPYPQEPLENTKMLKRFESAASSNLHTYRLPASNS
KGGYTNPDDGLAPCQYACERFCEYGAASPLNTVIPKAMSTGKYTIRTVSNVTQILKDKGVTVGVK
FVDTRTMKEYIQPADIVVLTSYMFNNAKLLMVSNIQEYDPTGKGTGRLGRNYCYQMMNGTTAFDFEQFNT
FMGSGALGTTSDDFNGDNFDSKEKFLHGAMIYSVQLGTRPIQSAPLPAGAPTWGAEFKKALNYNFTRAI
TVGGQGASLPHKNNYLSLDPTYKDAFGMPLRLTYNFTDQDRALHKFITDKTAEVAKRMQGVKSIKKGAY
LKDYSVVPYQSTHNTGGTTMGADRETSSVNTYLLQHWADNLFFVVGAGNFQHNSGYNPTDVTGALAYRCAE
GILKYHKSGLSLA

SEQ ID NO:43

ACE 393 Cj0420

>AnrP490750 (NC_002163) supuesta proteína periplásmica [C. jejuni]

MKKVLLSSSLVAVSLLSTGLFAKEYTLDKAHTDVGFKIKHLQISNVKGNFKDYSAVIDFDPASAEFKKLDX₁
TIKIASVNTENQTRDNHLQDDFFKAKKYPDMTFTMKKYEKIDNEKGKMTGTLTIAGVSKDIVLDX₂EIGG
VAKGDKGKEKIGFSLNGIKRSDFKFAX₃STSTITLSDDINLNIEVEANEK

en la que x_1 es v o A, y x_2 es A o T, y x_3 es T o A

SEQ ID NO:44

ACE 711 Cj0759

>AnrP586832 (NC_002163) proteína de choque térmico dnaK [C. jejuni]

MSKIVIGIDLGTNTSCVAVYERGESKVI PNKEGKNTTPSVVAFDTKGEVLVGDSAKRQAVTNPEKTIYSIK
RIMGLMINEDAKEAKNRLPYHITERNGACAIEIAGKIYTPQEISAKVIMKLKEDAEAFLGESVTDVAIT

FIG. 4

VPAYFNDQQRKATKEAGTIAGLNVLRRIINEPTSAALAYGLDKKDEKIVVYDLGGGTFDVTVLETGDNV
 EVLATGGNAFLGGDDFDNKLIDFLANEFKDETGIDLKNVMAQLRLKEAAENAKKELSSANTEINLPFI
 TADASGPKHLVKKLTRAKFEGMIDSLVAETITKINEVVSAGLKKDEIKIVMVGSGSTRVPLVQEEVKKA
 FNKDLNKSVPDEVVAIGAAIQGAVIKGDVVDVLLDVTPLSLGIETLGGVMTKIEKGTITPTKKEQVF
 STAEDNQSAVTINVLQGEREFSRDNKSILGNFNLEGIPAPRGMPIEVTFDIDANGILTVSAKDKATGKA
 QEIKITGSSSLSEEEINNVMKDAELHKBEDKKRKEAVDARNAADSLAHQVEKLSSELGEKVAADKENIQ
 KALDDLRETLKNQNASKEEIESKMKALSEVSHKLAENMYKKDEPNTANDKKKKDDVDVAEVE

SEQ ID NO:45

ACE 723 Cj0771c

>AnrP524051 (NC_002163) supuesta proteína periplasmática [C. jejuni]

MNLFKIILACILNLSLPAQNITIGATPNPFGSLEELMKDDFKNGYELKIVEFSYILPNRALEEKEL
 DANLYQHKKPFLSEYNLKKGSNLIATTPVLIAPVGVYSKKIKNLENLKEGARVAIPNDATNESRALLEK
 AKLIELNKWTLKTPLDINKNPKKLKPIELKAAQLPRALDDVDIAIINSNFALGAGLNP SKDTIFREDKNS
 PYVNVVVRSEKGNSEKTKVIDEILRSDFKAIINEHYKDILIPAF

SEQ ID NO:46

ACE 724 Cj0772c

>AnrP579672 (NC_002163) supuesta proteína periplasmática [C. jejuni]

MKIKSLFIASILTSLNANALETITVAATPVPHAEILEQVVPDLEKQGYKLEIKEFTDYVLPNLAVDNGE
 ADANFFQHTPTYLEEFNKNKGTKLIKVAIHIIEPMVYSKKYKSLDDIKEGVKIAIPNDPTNESRALDIIA
 KKGLVKPKDKALKTPLDI IDNPKKIKFVELKPAQLPRALNDVDFAVINSNYALSANLNPADKSVFIEDKE
 SPYANILVVRVGHENDPKIKALIQALQSDKIKQFIEKYNGSVLPAPF

SEQ ID NO:47

ACE 819 Cj0872

>AnrP694298 (NC_002163) supuesta proteína disulfuro isomerasa

[C. jejuni]

MRNFCKFVLALVFYSSFALANNSFITLNPSPSSSENSVIEAFSYKCIHCYNHKKFGTLEKLREAPPNLH
 FKLYPVSMLNGEFSKEMNELFTFAQYKDBQNGKDASYSDSLSHKLADVYFVSFYLKQNRNPSNLDEFYDI
 GLKAMNVNKNNEVLNLFNTPKAKEILSEFQRANDIAKTYGTPAPVVGKYQINPSAINSMQDLEDLVKKLS
 NMK

SEQ ID NO:48

ACE 1060 Cj1118c

>AnrP515430 (NC_002163) proteína reguladora de quimiotaxia [C. jejuni]

MKLLVDDSSMTMRRIKNTLTRLGHDDVLEAHEGVEAWDLLTKNEDVKVLITDWNMPFEMNGLELVKKVRA
 EKKYEDMPIIMVTTEGGKAEVITALKAGVNNYIVKPTTPQVLKEKLEDVLGTGSGEGAAE

SEQ ID NO:49

ACE 1169 Cj1228c

>AnrP679791 (NC_002163) serina proteasa (proteasa DO) [C. jejuni]

MKKIFLSLSALFAASINFNESTATANRVNPAAGNAVLSYHDSIKDAKKSVMNISTSKTITRANRSP
 LDDEFNDPYFKQFFDFDFSQRKGNDEKVVSSLSGSGVVISKDGIVTNNHVVDDADTITVNLPGSDIEYK
 AKLIGKDPKTDLAVIKIEANNLSAITFTNSDDLMEGDVVPALGNPFGVGFVSTSGIISALNKDNIGLNQY
 ENFIQTASINPGNSGGALVDSRGLVGINSAIILSRGGGNGGIGFAIPSNMVKDIKAKLIEKGKIDRGFL
 GVTILALQGDTPKAYKNQEGALITDVQKGSADAEGLKRGDLVTKVNDKVIKSPIDLKNYITGLEIGQKI
 SLSYERDGENKQASFILKGEKENPKGVQSDLIDGLSLRNLDPRLKDRQLIPKDVNGVLVDSVKEKSKGN
 SGFQEGDIIIGVGQSEIKNLKDLEQALKQVNKKEFTKVWVYRNGFATLLVLK

SEQ ID NO:50

ACE 1510 Cj1584c

>AnrP355324 (NC_002163) supuesto péptido periplasmático del sistema de transporte ABC de péptidos [C. jejuni]

MLRWFVLLFLLFLNLEAKIPKDTLIIAVENEIARINPAYSEDHDAVINLVFSGLTRFDENMSLKPDLAKS
 WDISKGLVYDIFLRDDVLWHDGVKFSADDVKFSIEAFKNPKNNSSIYVNFEDIKSVEILNPSHVKITLF
 KPYPAFILDALSIGMLPKHLLNENLNTSSFNQNPIGTGPKYFVKWKKGEYVEFKANEHFYLDKVKTPRLI
 IKHIFDPSIASAELKNGKIDAALIDVSLNIFKNDENFGILREKSADYRALMFNLDNEFLKDLKVRQALN
 YAVDKESIVKNLLHDYAFVANHPLERSWANSKNFKIYKDPKKAEDLLVSAGPKKNKDGNFEDGKILEF
 EIWAMSNDPLRVSLAGILQSEFRKIGVSKVAKPAGSFDYSKVDSEFLIGWGSPLDPDFHTFRVFESSQD
 SALNDEGWNFGHYHDKVDIALQKARNTSNLEERKYYKDFIDALYENPPFIPLAYLDFALVYNKDLKGI
 KTRTLGHGVGFTWNVYEWK

SEQ ID NO:51

ACE 1543 Cj1617

>AnrP111949 (NC_002163) supuesta proteína de unión a hemina periplasmática del sistema de captación de hemina [C. jejuni]

FIG. 4

MKKILIIMSLFLIALNAKERLVVLDPASIELFMLKAEDQIVGIATLQHSNIYPKDQTSKLTSGVTFSNP
 SLEKIVALKPSLVILSSYSLNLEGLKNFGIKSINLKAERLEDITKNITTLGQITKKEKEALLKQEFNQ
 KFKKLSDKPLNKSAYLYSSNPLMAFNDSLIADILRLIGIKNLSQSQISRPVISAAYILKQNPDLIL
 GINAKNNLDTNALLKNTKAVKTGSIYFNKDTPILLRLSPKIIDRIQEPFKLENNNF

Fragmentos de AnrP630851 (Cj0092)

SEQ ID NO:52: TQQDINTQNEMSDASTKDITPKSIEDFFFEFPAD
 SEQ ID NO:53: GITKDGKTFYTGKSTVAVNDTDPQF
 SEQ ID NO:54: RIATSKIQNYEADNSTNAKEFDELPGDKVDQILNK
 SEQ ID NO:55: QLDKALKDLGIDTNSLSEDRKKTLLKQEFNLKMTN
 SEQ ID NO:56: TIVTQRRGEYDVGVVAVISNKTRQLAKD
 SEQ ID NO:57: AISEYLPKDTKGFLNEYGIRLVYDEN
 SEQ ID NO:58: DPSNAKKTNILEDRAKET
 SEQ ID NO:59: LSLKDERTTGDITYEII
 SEQ ID NO:60: VNDSTQEQTQNTN
 SEQ ID NO:61: TLKKWSYTSNG
 SEQ ID NO:62: YSYENLANTNEALNSKSNATKNEAKKSSSIQRS

Fragmentos de AnrP57234 (Cj0143c)

SEQ ID NO:63: IFYFTQAKNLEQEQNTSSNLVSVS
 SEQ ID NO:64: LPPNSNEHNFEFKPSTMKLEKSDIYF
 SEQ ID NO:65: LEFEKVFTDKFKQNF PKLQVINMQ
 SEQ ID NO:66: IQTHDTHESHEHEHHEHGHFDPHTWL
 SEQ ID NO:67: DTLIQKYPQENLYKENLKD
 SEQ ID NO:68: SKLEKLNRE
 SEQ ID NO:69: YFAKRYNL
 SEQ ID NO:70: GKEPKSKDLQK
 SEQ ID NO:71: LMKDKNLK
 SEQ ID NO:72: QNGFPENAAKTLAKECDAKIYK
 SEQ ID NO:73: DHLSDWENELLKTADAF

Fragmentos de AnrP490750 (Cj0420)

SEQ ID NO:74: FAKEYTLDKAHTDVGFKIKHLQI
 SEQ ID NO:75: VKGNFKDYSAVIDFDPASAEFKKLDVTI
 SEQ ID NO:76: SVNTENQTRDNHLQQDDFF
 SEQ ID NO:77: DFFKAKKYPDMTFTM
 SEQ ID NO:78: TFTMKKYEKIDNEKGKMT
 SEQ ID NO:79: GVAKGKDGKEKIGF
 SEQ ID NO:80: LNGKIKRSDFKFATS
 SEQ ID NO:81: EVEANEK

Fragmentos de AnrP684299 (Cj0715)

SEQ ID NO:82: LSATEYQLSTHV
 SEQ ID NO:83: ITSGQPAPKVVELYK
 SEQ ID NO:84: LEANQQWKVSEEPTEENGRIG
 SEQ ID NO:85: LLPYEKAENRAFG
 SEQ ID NO:86: KFFT KDYYTSHKINTF
 SEQ ID NO:87: SPFLSKDQKHVPI
 SEQ ID NO:88: FGYSTYRGS

Fragmentos de AnrP579672 (Cj0772c)

SEQ ID NO:89: ILEQVKPDLEKQGYKLEIKEFTDY
 SEQ ID NO:90: GEADANFFQHTPYLEEFNKNKG
 SEQ ID NO:91: AVYSKKYKSLDDIKE
 SEQ ID NO:92: IPNDPTNESRAL
 SEQ ID NO:93: KGLVKFKDKALKTFLDIIDNPKKIKFVELKPAQLPRALN
 SEQ ID NO:94: ANLNPAKDSVFIEDKESPYAN
 SEQ ID NO:95: GHENDPKIKALIQALQSDKIKQFIIIEKYN

Fragmentos de AnrP257863 (Cj1018c)

SEQ ID NO:96: NGDKVSLAIIIDTKGDKLESSSGANRLVSQDK
 SEQ ID NO:97: VAEDNKIPLIAPATGDRLLDKIYSSRVC
 SEQ ID NO:98: YVPSKLNYSKSAVIVVDQSTDYSLGLAKAFKQYKSNNGGQ
 SEQ ID NO:99: NSGDKDFRAIVAQVKSLSNPEFIFLPLYSEASLFARQSKLA
 SEQ ID NO:100: GYIFTDSFDANNPTTKLSKEFISVYEKAKGTKEVPNFSAMG

FIG. 4

SEQ ID NO:101: VNEKIHQTKNYQGV

SEQ ID NO:102: QTGNATRSVVVKEIKNQKQNYKDIIN

Fragmentos de AnrP108083 (Cj1380)

SEQ ID NO:103: ELNGQKQENILFTK

SEQ ID NO:104: SYAQEYEMKKFQEARENFTKNAKAVAQKETM

SEQ ID NO:105: VIALGDKNKPAI

SEQ ID NO:106: HLAQIDDELKNYQV

SEQ ID NO:107: YKEAKKAKNDKEKIAI

SEQ ID NO:108: LNKYYDANIKNYPKVSDAELKEVFSLYEKYRSL

Fragmentos de AnrP407676 (Cj1643)

SEQ ID NO:109: GIERPKFEDFLAGYERNKASMLN

SEQ ID NO:110: LKQPNAKLNKYVKYDPFL

SEQ ID NO:111: PTPMGDEEKLTRNDWVGWIDPNKPYI

SEQ ID NO:112: AQNIDEKDQLDNFNSK

SEQ ID NO:113: GNRYLKHFMKYNDVY

SEQ ID NO:114: VVRENKIYVNNVRKNPQFL

SEQ ID NO:115: PANDLRKLNEK

SEQ ID NO:116: DRGSTLYFPQVLRDNMDLN

SEQ ID NO:117: AKDLSKFNLPDSKPKPKI

SEQ ID NO:118: TKIDPKSKVSNAG

SEQ ID NO:119: LIERKSTKLPLSNFN

SEQ ID NO:120:

ACE 393, ML53 (0:19) ADN

ATGAAAAAGTTTATTGAGTTCATTGGTTGCGGTGTCTTTGTTAAGCACAGGTTTGTGCTAAAGAATATACTTTAGA
TAAAGCACATACAGATGTAGGTTTAAAAATCAAACATTTACAAATTAGCAATGTAAAAGGAAATTTCAAAGATTATTCTG
CGGTGATTGATTTTGACCTGCGAGTGCTGAATTTAAAAAGCTTGATGCAACTATAAAAAATCGCATCTGTAAATACAGAA
AATCAACAAGAGATAATCACTTACAGCAAGATGATTTTTCAAAGCAAAAAATATCCTGATATGACTTTTACAATGAA
AAAAATATGAAAAATCGATAATGAAAAAGGTAAAAATGACAGGAACCTTAACTATAGCTGGAGTTTCTAAAGATATCGTTT
TAGATACTGAAATCGGCGGTGTAGCTAAAGGCAAGATGGAAAAGAAAAATAGGCTTTTCCTTAAATGAAAAATCAAA
CGCTCTGATTTTAAATTTGCAGCAAGTACTTCAACTATTACTTTAAGTGATGATATTAATTTAAATATCGAAGTTGAAGC
GAACGAAAAA

SEQ ID NO:121: DIVLDTEIGGVAK

SEQ ID NO:122: FAASTSTITLSDDINLNIEVEANEK

SEQ ID NO:123: LDATIK

Tabla 1

ATCC nº	designaciones alternativas	fuentes	ACE83	ACE134	ACE393	ACE576	ACE724	ACE961	ACE1320	ACE1589
campylobacter jejuni										
29428	VPI H940 [CIP 103778]	deposiciones diarréicas de niños, Bélgica	X	X	X	X	X	X	X	X
33291	AS-83-79	heces humanas, Colorado	O	X	X	X	X	X	X	X
45943	LRA 094.06.89	No especificado	O	X	X	X	X	X	X	?
BAA-218	D3180	deposiciones humanas, Oklahoma	X	X	X	X	X	X	X	X
33250	A7455	sangre, Florida	X	X	X	O	X	X	X	X
BAA-375	D5810, resistente a fluoroquinolonas	heces humanas 2001, Alaska	O	X	X	X	X	X	X	?
BAA-527	H895-29, serotipo HS:19	paciente con GBS, China	X	X	X	X	X	X	X	?
BAA-530	INP21, serotipo HS:41	paciente con GBS, México	X	X	X	X	X	X	X	X
43446	CCUG 10950; Penner MK104; Karmali 104; HS:19	M.B. Skirrow, WRI, Worcester, RU 16 abril 1981 L. Penner, Toronto, Canadá <M. Karmali	X	X	X	X	X	X	X	X
700819	NCTC 11168 (cepa secuenciada); HS:2	NCTC, Londres RU 11 de enero de 1978 <M.B. Skirrow, Worcester, RU, 1977	X	X	X	X	X	X	X	X
ML1	O:2	aislado clínico, Dinamarca	X	X	X	X	X	X	X	X
ML53	O:19	aislado clínico, Dinamarca	X	X	X	X	X	X	X	X
43502	MK175; resistente a tetr	aislado clínico, Canadá	X	X	X	X	X	X	X	X
campylobacter coli										
49941	LRA 089.05.89	no especificado	O	O	O	O	O	O	X	O
X	antígeno presente									
O	antígeno ausente									
?	señal débil (expresado a menor nivel, o es diferente de modo antigénico pero todavía puede reconocerse por nuestros anticuerpos)									