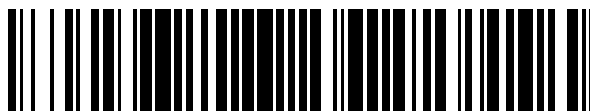


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 525**

51 Int. Cl.:

C07H 3/06 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C12N 5/04 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

A61K 39/106 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03766087 .5**

96 Fecha de presentación: **30.07.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1527080**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.05.2005**

54 Título: **Glucanos y glucopéptidos de Campylobacter**

30 Prioridad:
01.08.2002 US 399735 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.11.2012

73 Titular/es:
**NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA
(100.0%)
INTELLECTUAL PROPERTY SERVICES, EG-12,
BLDG. M-58, MONTREAL ROAD
OTTAWA, ONTARIO K1A 0R6, CA**

72 Inventor/es:
**YOUNG, NOEL M.;
BRISSON, JEAN-ROBERT;
KELLY, JOHN FRANCIS;
WATSON, DAVID C.;
SZYMANSKI, CHRISTINE M. y
JARRELL, HAROLD C.**

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

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).

ES 2 391 525 T3

DESCRIPCIÓN

Glucanos y glucopéptidos de *Campylobacter*.

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La invención se encuentra comprendida en el campo de las glucoproteínas y fracciones de glucano de las glucoproteínas biológicamente activas, así como vacunas, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que resultan útiles para combatir las bacterias *Campylobacter*.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 *Campylobacter* es un patógeno significativo de transmisión alimentaria en los productos de origen animal, entre ellos los productos avícolas. De esta manera, resulta deseable proporcionar estrategias para combatir los efectos perjudiciales en el ser humano. La eliminación de dichos patógenos del ganado puede servir como medio para reducir la incidencia de la infección en el ser humano y reducir la enfermedad en animales de granja que se encuentran afectados. Las proteínas glucosiladas y en particular determinadas fracciones glucano de estos compuestos representan dianas viables para estrategias inmunológicas para reducir o eliminar la presencia de estos organismos en el ganado, con el fin de reducir el riesgo de contaminación humana por la ingestión o manipulación de productos animales, así como la contaminación por diseminación fecal de las bacterias del estiércol de origen animal. Las glucoproteínas y fragmentos de las mismas, tales como fracciones glucano, también pueden proporcionar una base para vacunas y preparaciones de anticuerpos con diana en infecciones por *Campylobacter*.

- 20 También resulta deseable proporcionar herramientas de investigación de aplicación general en el estudio de la glucosilación de las proteínas. La glucosilación de las proteínas en el pasado se había considerado un fenómeno específicamente eucariótico, pero ahora está claro que es un fenómeno generalizado en los dominios tanto de arqueobacterias como de eubacterias (1,2). Se han identificado enlaces glucosídicos de los tipos N- y O- en un grupo diverso de organismos procarióticos con una preponderancia de azúcares unidos a N aparente en las arqueobacterias, mientras que las unidades de unión del tipo O predominan en las glucoproteínas identificadas hasta el momento en las eubacterias (1,2). Además, los enlaces N- y O- bacterianos se forman en un abanico más amplio de azúcares que el observado en las glucoproteínas eucarióticas.

- 25 Los presentes inventores han descubierto que determinados glucopéptidos y fracciones glucano forman una base efectiva para las vacunas y anticuerpos que actúan contra múltiples cepas de bacterias *Campylobacter*, en virtud de la presencia ubicua sobre la superficie de dichas bacterias en una forma invariante (o prácticamente invariante) en múltiples cepas y especies. Este glucano también se encuentra presente como componente de una pluralidad de glucoproteínas superficiales de *Campylobacter*, incrementando de esta manera su valor como diana inmunológica.

- 30 Recientemente se ha identificado un locus génico en el patógeno entérico *Campylobacter jejuni*, que aparentemente se encuentra implicado en la glucosilación de múltiples proteínas. Lo anterior proporciona la primera evidencia de una ruta de glucosilación generalizada de las proteínas en una bacteria Gram-negativa (3). La mutagénesis de los genes en este locus, denominada pgl (glucosilación de proteínas), resulta en la pérdida de inmunogenicidad en múltiples proteínas. Las fracciones glucano de dichas proteínas se ha demostrado también que resultan reconocidas por antisueros procedentes de voluntarios humanos infectados experimentalmente (3). La eliminación de las fracciones glucano por la mutación pgl resulta en la reducción de la adherencia e invasión *in vitro* y en la pérdida de la colonización del ratón *in vivo* (4), sugiriendo que la glucosilación de las proteínas influye sobre las propiedades de virulencia de este organismo.

- 40 Los oligosacáridos de *Campylobacter* para la utilización en la obtención de anticuerpos contra las bacterias *Campylobacter* se describen en Schwerer *et al.*, "Antibody Cross-reactivities Between Gangliosides and Lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* Serotypes Associated with Guillain-Barre Syndrome", J. Endo. Res. 2(6):395-403, diciembre de 1995.

- 45 Los presentes inventores han identificado y caracterizado modificaciones post-traduccionales de proteínas en la cepa NCTC 11168 de *C. jejuni*, la cepa para la que la secuencia genómica completa ha sido descrita por Parkhill *et al.* (6). Entre las proteínas que daban lugar a múltiples manchas en los geles 2D se encontraba PEB3, o Cj0289c, una proteína antigénica mayor de *C. jejuni* descrita por primera vez por Pei *et al.* (7). Al purificarse y analizarse mediante SDS-PAGE 1D, reveló dos bandas con una diferencia de masa de -1.500 Da, presentando ambas secuencias N-terminales correspondientes a la PEB3 auténtica. Concurrentemente con nuestras observaciones de PEB3, Linton *et al.* (8) identificaron dos glucoproteínas putativas de *C. jejuni* mediante la utilización de la lectina específica de GalNAc, aglutinina de soja, una de las cuales era PEB3, y la otra era una proteína periplásmica putativa, Cj1670c, que denominaron CgpA. Los autores también observaron algunas otras glucoproteínas putativas, basándose en su capacidad de unirse a la lectina, pero no las identificaron. Además, la unión de las proteínas a la lectina también resulta afectada por la mutagénesis de genes en el locus de pgl. Además, los presentes inventores demostraron que la mutación de un gen *pglB*, cuya homología con la subunidad STT3 de la oligosacariltransferasa

unida al extremo N de *Saccharomyces cerevisiae* sugiere una función en la biosíntesis de glucoproteínas (3,9), afecta específicamente a la glucosilación de las glucoproteínas identificadas.

Además, los carbohidratos participan en una diversidad de funciones en todos los dominios de la vida. Aunque en general se observa un grado elevado de variancia de las glucoproteínas y de sus dominios glucano en los glucanos superficiales antigénicos en cepas bacterianas y especies relacionadas, no siempre es así y estas excepciones constituyen candidatos excelentes que resultan adecuados para las estrategias basadas en anticuerpos o vacunas de eliminación de bacterias. En particular, uno de dichos carbohidratos es la fracción glucano de las glucoproteínas de *Campylobacter*. Los recientes esfuerzos de los presentes inventores para caracterizar el glucoma del importante patógeno de transmisión alimentaria *Campylobacter jejuni*, han llevado a elucidar todas las estructuras de glucano superficial, es decir, los lipooligosacáridos (LOS), los polisacáridos capsulares (CPS), los glucanos N-ligados y los glucanos O-ligados (5, 12-15).

Los presentes inventores han demostrado que el heptasacárido, que se describe en la presente memoria, es común a por lo menos varias especies de *Campylobacter* y a numerosas cepas, incluyendo especies que resultan importantes como patógenos humanos y veterinarios, y es un componente múltiples glucoproteínas, incluyendo las Cj n° 0114, n° 0200c, n° 0289c, n° 0367c y otras. Dichas fracción glucano también es fuertemente inmunogénica y de esta manera este glucano (y fragmentos y glucopéptidos relacionados) es un buen candidato para la utilización como vacuna para la inmunización activa contra múltiples cepas y especies de *Campylobacter* y como base para anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que resultan adecuados para el tratamiento dirigido de *Campylobacter* en seres humanos o en ganado.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "ganado" incluye mamíferos y aves.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

Es un objetivo de la invención proporcionar un glucano que puede existir aisladamente o unido a un oligopéptido, un aminoácido y/o un conjugado inmunogénico.

Según un aspecto, la invención proporciona un compuesto que comprende un heptasacárido de fórmula I: GalNAc-a1,4-GalNAc-a1,4-[Glc-β1,3]GalNAc-a1,4-GalNAc-a1,4-GalNAc-a1,3-Bac, en el que Bac es 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxi-D-glucopiranososa. La fórmula I también incluye fragmentos inmunológicamente activos del compuesto indicado anteriormente. La expresión "inmunológicamente activo" se refiere a que dicho fragmento puede comprender el componente activo de una vacuna contra *Campylobacter*, o pueden proporcionarse fragmentos de anticuerpo que se unen específicamente a dicho compuesto y neutralizan *Campylobacter* en un organismo en el que han sido administrados. Estos glucanos pueden proporcionarse en forma aislada o unidos a un oligopéptido o aminoácido, formando un nuevo glucopéptido. El aminoácido puede comprender asparagina, formando un glucopéptido N-ligado. Estos glucanos o glucopéptidos pueden derivarse o aislarse y purificarse a partir de una bacteria Gram-negativa. Esta fracción glucano de glucoproteína también puede proporcionar la base para preparaciones y métodos terapéuticos, tal como se comenta posteriormente.

Según todavía otro aspecto, la invención proporciona un método para detectar una fracción glucano de una glucoproteína bacteriana, comprendiendo el método someter dicha muestra a espectroscopía de resonancia magnética nuclear con giro de ángulo mágico (RMN HR-MAS). Este método permite la detección de la fracción glucano directamente de su fuente sin necesidad de purificar la proteína.

Según un aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un heptasacárido de fórmula I y un portador fisiológicamente aceptable. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas pueden comprender además un conjugado inmunogénico unido al glucano o glucopéptido o fragmento del mismo y/o un inmunoestimulador. Dichas composiciones farmacéuticas resultan útiles como vacunas para la inmunización de un ser humano o un animal frente a enfermedades provocadas por patógenos *Campylobacter*. Dichas enfermedades son, por ejemplo, infecciones gastrointestinales, los síndromes GBS de Guillain-Barré y de Miller-Fisher, la artritis y la bacteremia. Dichas vacunas pueden administrarse mediante una o más inyecciones o mediante otro método médicamente aceptable.

Según otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno que interactúa y se une específicamente a la fracción glucano de fórmula I. Dichos anticuerpos o fragmentos pueden neutralizar una o más especies de *Campylobacter* al administrarse en un receptor animal o humano. Dichos anticuerpos pueden obtenerse mediante diversos métodos conocidos, incluyendo el aislamiento a partir de suero de un animal que ha sido previamente inmunizado con un heptasacárido o un glucopéptido tal como se ha indicado anteriormente o la preparación de anticuerpos monoclonales murinos dirigidos contra dichos compuestos. Otro medio son las técnicas de ADN recombinante, por ejemplo mediante la obtención de dicho anticuerpo o fragmento

- de anticuerpo mediante la clonación de un conjunto de biblioteca de genes de anticuerpo de un solo dominio ("dAb") previamente aislados a partir de un camélido, y después expresados en una biblioteca de bacteriófago, seleccionando y después expresando en un bacteriófago una secuencia dAb que presenta una afinidad para el heptasacárido, glucopéptidos o un fragmento de los mismos. Un camélido preferente se selecciona de entre
- 5 *Camelus bactriamus*, *Camelus dromaderius*, *Lama pPaccos*, *Lama ggGlama* y *Lama vicugna*. Alternativamente, otro método podría implicar el cribado de bibliotecas de bacteriófagos de fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla (scFv) de Vicugna. La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno tal como se ha definido anteriormente, y un portador fisiológicamente aceptable. Dicha composición farmacéutica puede utilizarse como agente terapéutico en un animal o en un ser humano.
- 10 Entre los fragmentos de anticuerpo adecuados se incluyen fragmentos Fab (aunque se indica que debido a que las especies de camélido producen un tipo único de anticuerpo que no contiene cadenas ligeras, puede modificarse la terminología convencional, tal como "Fab"), incluyendo fragmentos que se preparan aisladamente mediante las técnicas anteriormente indicadas o mediante otras técnicas convencionales y no derivadas directamente de un anticuerpo completo.
- 15 Según todavía otro aspecto, la invención proporciona un método para reducir la presencia de las bacterias *Campylobacter* en el ganado. El método comprende administrar en el ganado el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno que interactúa y se une con la fracción glucano de fórmula I. Dicho anticuerpo, administrado en cantidad suficiente, neutraliza la totalidad, o sustancialmente la totalidad, de los organismos *Campylobacter* patógenos del cuerpo del animal o impide la colonización por bacterias, evitando de esta manera
- 20 que el animal infecte a seres humanos, por alimentación o manipulación de un producto animal o mediante contaminación a partir de los residuos animales. La administración puede consistir en alimentar el ganado, preferentemente aves, con pienso o agua que contiene el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. La eliminación de los patógenos o la reducción de su presencia en el ganado constituye una manera de impedir que los patógenos alcancen seres humanos, por lo tanto evitando en ellos las enfermedades causadas por dichos patógenos.
- 25 De esta manera, la invención también proporciona un método para prevenir las infecciones por *Campylobacter* causadas por patógenos *Campylobacter* en un ser humano, comprendiendo el método eliminar los patógenos del ganado mediante la administración en el mismo del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se ha definido anteriormente.
- 30 Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden añadirse a pienso animal o agua, o alternativamente pueden encontrarse presentes como resultado de una modificación genética de una planta para alimentación animal, de manera que dicha planta expresa el anticuerpo o fragmento de anticuerpo.
- Según todavía otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad causada por patógenos *Campylobacter* en un ser humano o en un animal, comprendiendo el método la administración del anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno tal como se ha definido anteriormente, en el ser humano. El anticuerpo o
- 35 su fragmento de unión a antígeno pueden utilizarse en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un animal o un ser humano para una enfermedad causada por patógenos *Campylobacter*.
- Según otro aspecto, la invención proporciona un método para prevenir la contaminación del agua subterránea por patógenos *Campylobacter*, producida como resultado de la diseminación fecal de las bacterias por parte del ganado, seguida de la entrada de la materia fecal en un suministro de agua. El método comprende la eliminación o reducción
- 40 de la presencia de los patógenos del ganado mediante la administración en el ganado del anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno tal como se ha definido anteriormente. Lo anterior también constituye un modo de evitar que los patógenos alcancen a seres humanos, evitando de esta manera que sufran las enfermedades causadas por dichos patógenos.
- 45 Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la presente invención también pueden utilizarse como herramienta diagnóstica para detectar la presencia de *Campylobacter* en seres humanos y animales, así como en muestras extraídas del medio ambiente, tales como muestras de agua o de estiércol.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 50 FIGURA 1. Purificación y análisis de PEB3. a) Cromatografía de intercambio catiónico de un extracto de glicina en una columna MonoS. Se identificaron las fracciones que contenían PEB3 mediante secuenciación N-terminal de bandas en SDS-PAGE, agrupadas tal como se ha indicado, dializadas y liofilizadas. b) Nuevo fraccionamiento del material agrupado, en una columna MonoS utilizando un gradiente menos pronunciado, de NaCl 0 a 0,2 M. El cuadro inserto muestra el análisis de SDS-PAGE de las fracciones 30 y 31, que se identificaron como fracciones que contenían PEB3 mediante secuenciación N-terminal de las bandas del SDS-PAGE.
- 55 FIGURA 2. Análisis de EM-ESI de las fracciones procedentes de la purificación mediante intercambio catiónico de

PEB3. a) EM-ESI de la fracción 31 de la figura 1, tras la diálisis y la reconstrucción del perfil de masas moleculares obtenido de dicho espectro. b) Se identificaron los picos en 25.454 y 28.376 Da como PEB3 y PEB4, respectivamente. Fue necesario el análisis adicional para identificar el tercer pico en 26.861 Da como PEB3 glucosilado. c) EM-ESI de PEB3 purificado de manera similar a partir del mutante pglB, y perfil de masas reconstruido, d) que muestra la falta de forma glucosilada de PEB3.

FIGURA 3. Análisis EM/EM del glucopéptido triptico PEB3. a) Espectro de iones producto del ión glucopéptido doblemente protonado en m/z 1.057,9. Los iones fragmentos originados de la pérdida secuencia de residuos oligosacáridos se indican en el espectro. Se muestra la secuencia peptídica en el cuadro inserto. b) Espectro de segunda generación de iones producto del ión fragmento glucopéptido en m/z 937,4. Se fragmentó el glucopéptido mediante disociación inducida por colisión frontal (voltaje en el orificio = 100 V) en el momento de entrar en el espectrómetro de masas. La observación del ión fragmento b_3+228 en m/z 605,3 confirmó que el oligosacárido se encontraba N-ligado.

FIGURA 4. Geles 2D del producto de cromatografía de afinidad de SBA. Las proteínas se separaron en 2D-PAGE en dos intervalos de pH, a) pH 4 a 7, y b) pH 6 a 11, y después se tiñeron con plata. Las identidades de las manchas, señaladas por su numeración Cj, se determinaron mediante espectrometría de masas de sus digestiones con tripsina. En la Tabla I se proporciona una lista completa de las proteínas identificadas.

FIGURA 5. Purificación de glucopéptidos a partir de una digestión con pronasa del producto de cromatografía de afinidad de SBA. a) Cromatografía de exclusión por tamaño en matriz BioGel P4 200 del digerido con pronasa. b) Nuevo fraccionamiento del material agrupado de P4 en BioGel P2 grado fino. En ambos fraccionamientos, se identificaron las fracciones que contenían glucoproteínas mediante EM y se agruparon tal como indican las columnas. c) Espectro de EM-ESI de la fracción 10 de B, anteriormente. El ión doblemente protonado (MH_2^{2+} en m/z 770,5) corresponde al heptasacárido unido en Asn. También se observaron varios iones de mayor tamaño y se deben a la adición de un segundo residuo aminoácido. Las composiciones de aminoácidos de los iones principales que contienen glucano se indican en el espectro.

FIGURA 6. Estructura y espectros de 1H del glucopéptido. a) Estructura deducida del glucopéptido. b) Espectro después de la purificación final en una columna P2 (D_2O , 35°C, EDTA deuterado 1 mM). Se señalan las resonancias del azúcar anómérico en la región 4,4 a 5,4 ppm.

FIGURA 7. Experimentos de RMN selectiva 1D con el glucopéptido. a) TOCSY 1D (g1f2, 15 Hz, 144 ms), b) TOCSY 1D (e1f1, 25 Hz, 144 ms), c) TOCSY 1D (d1, 20 Hz, 144 ms), d) TOCSY 1D (b6, 50 Hz, 66 ms), en los que * es una resonancia de péptido, e) TOCSY 1D (b1c1, 40 Hz, 151 ms), f) TOCSY 1D (a1, 25 Hz, 144 ms), g) NOESY 1D (g1f2, 15 Hz, 400 ms), h) NOESY 1D (f1, 100 Hz, 400 ms), i) NOESY 1D (e1, 10 Hz, 400 ms), j) NOESY 1D (d1, 20 Hz, 400 ms), k) NOESY 1D (b1c1, 40 Hz, 400 ms), l) NOESY 1D (a1, 40 Hz, 400 ms).

FIGURA 8. Locus pgl y caracterización del mutante pglB. a) Esquema del gen del locus general de glucosilación de proteína de *C. jejuni* NCTC 11168. Los genes que presentan homólogos a los genes en el locus pgl de *Neisseria* spp. se muestran mediante flechas grises. La mutación en pglB mostrada en la parte inferior del locus se construyó utilizando pEap26. b) a e) Análisis en gel bidimensional de *C. jejuni* de tipo salvaje y mutante de pglB isogénico. b) y d) Tinción coloidal de Coomassie de geles 2D antes de la inmunotransferencia del tipo salvaje y el mutante, respectivamente. c) y e) Inmunodetección de proteínas mediante HS: 2 sueros serotipados del tipo salvaje y el mutante, respectivamente. Las flechas indican las proteínas que mostraban diferencias de migración en el gel y/o de inmunorreactividad que se extrajeron para la identificación mediante huella de masa. Se muestran las identidades de las manchas mediante su numeración Cj. Las masas de los marcadores de peso molecular de las proteínas en kDa se muestran a la izquierda.

FIGURA 9. Detección del glucano N-ligado en los espectros de RMN de protones HR-MAS de diversas cepas de *Campylobacter*. Se muestra la estructura del glucano N-ligado en la parte superior de los espectros. a) Espectro del glucano N-ligado purificado en *C. jejuni* NCTC11168 que muestra las resonancias anómicas etiquetadas **a a g**. Los espectros de RMN HR-MAS obtenidos utilizando un filtro de CPMG 10 ms de células completas de b) *C. jejuni* NCTC11168, c) *C. jejuni* NCTC11168 kpsM-, d) *C. jejuni* HS:19 cepa serológica, e) *C. coli* HS:30 cepa serológica, y f) *C. jejuni* NCTC11168 pglB-. Las resonancias comunes en b) a e) comparado con aquellas en a) se indican mediante líneas de puntos verticales. La resonancia de HOD en 4,8 ppm se encontraba saturada y se filtró digitalmente.

FIGURA 10. Comparación entre experimentos de RMN selectiva de células de *C. jejuni* HS:19 y el glucano N-ligado purificado. Espectros de HR-MAS de *C. jejuni* HS:19 (a, c, e, g)) y espectros de RMN de glucano N-ligado purificado (b, d, f, h)). a) NOESY[a1, 90 Hz, 250 ms]. b) NOESY[a1, 40 Hz, 400 ms]. c) NOESY[b1c1, 60 Hz, 250 ms]. d) NOESY[b1c1, 40 Hz, 400 ms]. e) NOESY[d1e1f1, 90 Hz, 250 ms]. f) Suma de NOESY[d1, 20 Hz, 400 ms] y de NOESY[e1f1, 25 Hz, 400 ms]. g) TOCSY[g1f2, 72 Hz, 47 ms]. h) TOCSY[g1f2, 15 Hz, 33 ms].

FIGURA 11. Se muestra a título comparativo el espectro del glucano N-ligado purificado de *C. jejuni* NCTC11168 que muestra las resonancias anómicas etiquetadas **a a g** y las resonancias comunes indicadas mediante líneas

verticales de puntos.

FIGURA 12. RMN de alta resolución con giro de ángulo mágico con y sin cloruro de cobalto para demostrar la exposición superficial del glucano Pgl N-ligado.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los ejemplos describen el aislamiento y la identificación de la fracción glucano según la presente invención.

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES GENERALES

10 Cepas bacterianas y plásmidos: se cultivó rutinariamente *C. jejuni* NCTC 11168 sobre agar Mueller-Hinton bajo condiciones microaerofílicas (10% de CO₂, 5% de O₂, 85% de N₂) a 37°C. Se utilizó *E. coli* DH10B (Invitrogen) como la cepa huésped para los experimentos de clonación y los clones se cultivaron sobre agar Luria S-gal (Sigma) o agar MH a 37°C. En caso apropiado, se añadieron antibióticos a las concentraciones finales siguientes: canamicina 30 µg/ml y ampicilina 150 µg/ml. Se utilizó el plásmido pPCR-Script Amp (Stratagene) como el vector de clonación.

15 Preparación de extractos de glucoproteínas: Se resuspendieron células de dos placas de cultivo durante la noche, en 10 ml de caldo de Mueller-Hinton y se utilizaron para inocular 1 litro de medio de cultivo MH. Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones microaerofílicas a 37°C durante 24 horas bajo agitación a 150 rpm. Se recolectaron células bacterianas a partir de 12 litros de medio de cultivo, mediante centrifugación a 10.000xg durante 15 minutos y se congelaron inmediatamente a -75°C. Se descongelaron los pellets celulares congelados sobre hielo en tampón de HCl de glicina 0,2 M, pH 2,2 (13) y se extrajeron durante 15 minutos bajo agitación suave. Los extractos se
20 clarificaron mediante centrifugación a 10.000xg durante 15 minutos, se dializaron frente a agua pura (sistema Milli-Q, Millipore Corporation) y se liofilizaron.

25 Purificación y análisis de PEB3: la proteína PEB3 se purificó a homogeneidad mediante cromatografía de intercambio catiónico del extracto de glicina tal como se ha descrito anteriormente (7). Se utilizó una columna MonoS HR 5/5 de Pharmacia en un sistema de LC AKTA Explorer (Amersham Biosciences). Se realizó un seguimiento del eluido de la columna para la absorbancia de UV a 280 nm y se examinaron las fracciones mediante análisis de SDS-PAGE (21) en geles Mini Protean (BioRad Laboratories). Se llevó a cabo la secuenciación N-terminal de las proteínas individuales en un sistema de secuenciación de proteínas Procise modelo 491 (Applied Biosystems Inc.), tras la transferencia de geles de SDS a una membrana de PVDF ProBlot™ (Applied Biosystems Inc.) tal como describen LeGendre *et al.* (22).

30 Los perfiles de peso molecular de proteína de las fracciones seleccionadas se determinaron mediante espectrometría de masa de ionización por electropulverización utilizando un espectrómetro de masas híbrido de cuadrupolo-tiempo de vuelo de Applied Biosystems/Sciex. Las fracciones en primer lugar se dializaron extensivamente para eliminar las sales, y se ajustaron a metanol al 30% y ácido fórmico al 0,2%. La solución se infundió a un caudal de 1 µl/minuto y los espectros se captaron en el intervalo de *m/z* 600>2.000.

35 Análisis de los péptidos tripticos: las fracciones seleccionadas se digirieron durante la noche a 37°C con tripsina modificada (Promega) en bicarbonato amónico 50 mM y se analizaron mediante CL capilar-espectrometría de masas en tándem utilizando un sistema de HPLC capilar (CapLC, Waters) acoplado a un espectrómetro de masas híbrido de cuadrupolo-tiempo de vuelo Q-TOF2 (Micromass). Se inyectaron aproximadamente 250 ng de cada digerido en una columna de CL capilar C18 PepMap de 0,3x150 mm (Dionex/LC-Packings) y se resolvieron mediante elución en
40 gradiente (5% a 90% de acetonitrilo, ácido fórmico al 0,2% en 45 minutos). El espectrómetro de masas se configuró para funcionar en modo de captación EM/EM automático y los espectros se captaron en iones cargados doble, triple y cuadrúplemente.

45 Se llevó a cabo una separación a mayor escala del digerido triptico en una columna LC C₁₈ Jupiter de 4,6 mm x 250 mm (Phenomenex Inc.). A continuación, la fracción que contenía el glucopéptido se infundió a un caudal de 1 µl/minuto en la interfaz de microelectropulverización del espectrómetro de masas Q-TOF2. La fragmentación del glucopéptido previamente al análisis EM/EM se consiguió mediante disociación inducida por colisión frontal (el voltaje del orificio se incremento a 100 V desde los 40 V normales). La colisión EM/EM compensada para los iones fragmentos de carga única producidos de esta manera era de 20 a 25 V (marco de referencia de laboratorio). Para
50 los experimentos de eliminación β mediante el método de Rademaker *et al.* (23), se evaporó a sequedad aproximadamente la mitad de la fracción que contenía el glucopéptido y se disolvió en hidróxido amónico acuoso al 25%. La solución se dejó a temperatura ambiente durante la noche, se evaporó a sequedad durante un segundo tiempo y se disolvió nuevamente en agua. A continuación, la solución se examinó mediante EM en infusión, tal como se ha indicado anteriormente.

Purificación y análisis de glucoproteínas totales: las glucoproteínas de los extractos en glicina se aislaron mediante cromatografía de afinidad en SBA lectina/agarosa (Sigma-Aldrich Ltd.). El extracto de glicina liofilizado se disolvió nuevamente en PBS (NaCl 100 mM, fosfato sódico 50 mM, pH 7,5) y se pasó por una columna de SBA/agarosa previamente equilibrada en PBS. La columna se lavó con 10 volúmenes de columna de PBS y la glucoproteína unida se eluyó con GalNAc 0,1 M en PBS. Las fracciones que contenían glucoproteína se agruparon, se dializaron frente a agua Milli-Q y se liofilizaron.

Las glucoproteínas se separaron mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida homogéneos al 12,5% (21). Se llevó a cabo 2D-PAGE utilizando tiras de IEF premoldeado que contenían gradiente lineales de pH inmovilizados de pH 3 a 10, pH 4 a 7 (BioRad Laboratories) o pH 6 a 11 (Amersham Biosciences). Las proteínas se solubilizaron en tampón para muestras siguiendo las instrucciones del fabricante y se resolvieron mediante enfoque isoeléctrico sobre tiras de IEF premoldeado seguido de SDS-PAGE en geles homogéneos al 12,5%, de 20x20 cm, para la segunda dimensión. Los geles se tiñeron con tinción de azul de Coomassie G-250 coloidal Bio-Safe (BioRad Laboratories) o se tiñeron con plata (23). Para el sondeo posterior con lectinas, los geles se inmunotransfirieron sobre una membrana de PVDF a 50 V durante 1 hora en tampón de ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propano-sulfónico 10 mM, pH 11, que contenía metanol al 10%. La membrana se lavó en agua Milli-Q y se bloqueó en solución salina tamponada con Tris (NaCl 100 mM, Tris 50 mM, pH 7,5) con Tween-20 al 0,05% y tampón de bloqueo al 2% (Roche Molecular Biochemicals) durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, las membranas se incubaron adicionalmente con conjugado de SBA- fosfatasa alcalina (EY Laboratories Inc.) a una concentración de 10 µg/ml en la solución de bloqueo anteriormente indicada durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron tres veces en Tris-solución salina con Tween-20 al 0,05% y se revelaron utilizando cloruro de nitrógeno-azul tetrazolio (NBT) y fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP) en NaCl 0,1 M, Tris 0,1 M, pH 9,5, con MgCl₂ 50 mM.

Análisis de EM de manchas en gel 2D: las manchas de proteínas se recortaron y se destiñeron con una proporción 1:1 de ferricianuro potásico 30 mM y tiosulfato sódico 100 mM (24). Las manchas del gel se lavaron extensivamente con agua desionizada, se encogieron con acetonitrilo, se hincharon nuevamente con bicarbonato amónico 50 mM que contenía tripsina modificada de Promega (10 ng/µl) y se añadió suficiente bicarbonato amónico 50 mM para cubrir los trozos de gel (típicamente 30 µl). Los tubos se sellaron y se incubaron durante la noche a 37°C. Las soluciones de digerido se separaron y los trozos de gel se extrajeron con 50 µl de ácido acético al 5% y después con 50 µl de ácido acético al 5% en metanol acuoso al 50%. Los extractos se agruparon con las soluciones de digerido y se concentraron hasta aproximadamente 10 µl.

Los extractos de péptidos de las manchas de proteínas intensas se analizaron mediante EM MALDI-TOF utilizando un espectrómetro de masas MALDI-LR (Micromass). Se depositaron aproximadamente 0,5 µl de la solución de matriz de MALDI (ácido α-ciano-4-hidroxycinámico 10 mg/ml en acetonitrilo al 50%, TFA al 0,2%) sobre la placa diana y se dejaron secar. Los extractos de péptidos se desalaron utilizando ZipTips™ C₁₈ (Millipore) y se depositaron directamente sobre las manchas de matriz. La captación de los espectros de EM MALDI-TOF se llevó a cabo de manera automática. Los espectros se calibraron externamente utilizando estándares de péptidos e internamente con péptidos de autólisis con tripsina. La búsqueda de datos se llevó a cabo en modo por lotes utilizando Mascot Daemon™ (Matrix Science) y frente a la base de datos de secuencias genómicas de *C. jejuni* NCTC11168.

Los extractos de las manchas más débiles de proteínas se analizaron mediante nanoCL-EM/EM utilizando el espectrómetro de masas Q-TOF2. Las muestras completas se inyectaron en un microcartucho pre-columna C₁₈ de 0,3x5 mm (Dionex/LC-Packings). Los péptidos resultaron retenidos, mientras que la solución de muestra se lavó como residuo. A continuación, la trampa se conectó en línea con una columna Nano-Series C₁₈ de 75 µm x 150 mm (Dionex/LC-Packings) y los péptidos se separaron con un gradiente suministrado por la bomba de CapLC (15% a 75% de acetonitrilo, ácido fórmico al 0,2% en 30 minutos, caudal aproximado de 300 nl/minuto). El espectrómetro de masas se configuró para captar espectros de EM/EM en modo automático, tal como se ha indicado anteriormente. La búsqueda en base de datos se llevó a cabo tal como se describe para los análisis de EM MALDI-TOF.

Preparación de glucopéptido: se disolvieron glucoproteínas totales liofilizadas (5 mg) en 250 µl de Tris 100 mM, pH 8,0, que contenía CaCl₂ 2 mM, y se digirieron con pronasa, tal como se ha indicado anteriormente (31). El digerido se microcentrifugó a 10.000xg durante 15 minutos y se aplicó el sobrenadante en una columna (1x120 cm) de BioGel P4, malla de 200 (BioRad Laboratories). Se pasó agua por la columna y se realizó un seguimiento del eluido de la misma a partir del índice refractivo. Se cribaron las fracciones mediante ESIMS y espectrometría de masas de escaneo de iones precursores (precursores del ión oxonio HexNAc en m/z 204) en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo API 3000 (Applied Biosystems/Sciex). La fracciones que proporcionaban la signatura iónica de HexNAc se agruparon y se liofilizaron. Los glucopéptidos se purificaron adicionalmente en una columna de 1 x 120 cm de BioGel P2 grado fino, realizando un seguimiento de las fracciones y cribándolas tal como se ha indicado anteriormente.

Espectroscopía de RMN: todos los espectros se captaron utilizando un espectrómetro Varian Inova de 600 MHz utilizando el software Varian estándar. Se utilizó un gradiente de 4 mm de detección indirecta-nanosonda de RMN de

alta resolución con giro de ángulo mágico (Varian) dotada de una bobina de desacoplamiento de banda ancha. La muestra se centrifugó a 3 kHz con nitrógeno seco como gas controlador y portador. La tasa de centrifugación no estaba controlada por ordenador sino que se mantuvo constante a menos de 10 Hz del valor prefijado. Se registraron muestras en 40 µl de D₂O a 25°C y a 35°C para producir picos más agudos. El pH era desconocido debido al volumen reducido. Se añadió EDTA deuterado (CDN Isotopes Inc.) para quelar los iones metálicos y proporcionar picos más agudos para la bacilosamina y los aminoácidos. Aunque el aislado de glucopéptido de una columna P4 contenía algunas impurezas de aminoácidos y de azúcares, los espectros eran de suficiente calidad para permitir asignaciones de resonancia completas del glucopéptido en presencia de 15 mM de EDTA deuterado. Una gran cantidad del trabajo estructural de RMN se realizó con esta muestra debido al riesgo de perder la mayor parte del glucopéptido aislado debido a purificaciones adicionales. La estructura derivada se confirmó mediante experimentos de RMN adicionales con glucopéptido que había sido purificado utilizando una columna P2, liofilizado y disuelto en 40 µl de D₂O con 1 mM de EDTA deuterado. Los experimentos se llevaron a cabo con supresión de la señal de HDO en 4,78 ppm (25°C) y a 4,67 ppm (35°C). La captación y procesamiento de los experimentos bidimensionales (COSY, TOCSY, NOESY, HMQC, HMBC) se llevaron a cabo tal como se ha descrito anteriormente (32). Se fijó la referencia de ¹H con acetona externa a 2,23 ppm. Se fijó la referencia de ¹³C con la resonancia de metilo de la acetona externa a 31,07 ppm. Los desplazamientos químicos de ¹H y ¹³C en la Tabla 1 se midieron a partir de los espectros de protones y de los picos cruzados C-H en los espectros de HMQC y HMBC. Se llevaron a cabo experimentos TOCSY 1D con diversos tiempos de confinamiento de espines, de entre 30 y 151 ms, y de NOESY 1D con periodos de mezcla de entre 400 y 800 ms, se llevaron a cabo tal como se ha descrito anteriormente (25, 26). Los experimentos selectivos se describen como EXP 1D(espines seleccionados, ancho de banda de excitación selectiva, tiempo de mezcla), en donde EXP es TOCSY o NOESY.

La utilización de giro con ángulo mágico (MAS) para muestras en estado líquido en presencia de tanto RF como homogeneidades del campo magnético se ha demostrado que influye significativamente sobre el rendimiento de las secuencias de mezcla en los experimentos de TOCSY y puede degradar el rendimiento (27, 28). La utilización de secuencias de mezcla adiabática (WURST) puede eliminar dichos efectos (27, 29). Las secuencias estándares de TOCSY 2D y TOCSY 1D se modificaron de manera que se sustituyese la secuencia de mezcla MLEV-17 ó DIPSI-2 por los pulsos adiabáticos de WURST-2. La mezcla adiabática (WURS-2) presentaba una longitud de pulso de única inversión adiabática de $T_p = 1/\text{tasa de giro de MAS}$, una profundidad de modulación de 8 y una adiabaticidad de 2. Típicamente, para el pulso de WURST-2, el ancho de banda de escaneo era de 24 kHz, $T_p = 0,333$ ms (a una tasa de giro de MAS de 3.000 ± 10 Hz), $B_1(\text{max}) = 8,51$ kHz, $B_1(\text{RMS}) = 4,77$ kHz.

Análisis de CG-EM: las configuraciones enantioméricas de los componentes Glc y GalNAc del producto P2 se asignaron mediante caracterización de los glucósidos but-2-ilo en cromatografía gas/líquido-espectrometría de masas (21). Los derivados se analizaron utilizando un cromatógrafo Hewlett-Packard dotado de una columna capilar DB-17 30m (180°C a 260°C a razón de 3,5°C/minuto) y se obtuvieron los espectros en el modo de impacto de electrones con un espectrómetro de masas Saturn II de Varian.

Construcción y caracterización del mutante pglB: para la construcción del mutante pglB, los genes Cj1121c a Cj1126c se amplificaron por PCR a partir de *C. jejuni* NCTC 11168 utilizando los cebadores: Cj1121cF (5'-ACTCACTATTGCCATTAA-GATAAGC-3') y Cj1126cR (5'-AAAACCCTTATTTAGTTTTGTTTGC-3'). El producto de PCR se purificó con polimerasa Pfu y después se ligó en pPCR-Script Amp (Stratagene) siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de ligación se electroporó en células *E. coli* DH10B electrocompetentes y se realizó la selección en agar LB S-gal (Sigma-Aldrich) con ampicilina. Se insertó un casete de resistencia a la ampicilina con extremos romos procedente de pILL600 (37) en el sitio de restricción XbaI relleno procedente de pglB, generando pEAp26. La orientación del casete se determinó mediante secuenciación con el cebador ckanB (5'-CCTGGGTTTCAAGCATTAG-3'). El ADN se secuenció utilizando química de terminadores y kits de secuenciación cíclica AmpliTaq (Applied Biosystems) y se analizó en un secuenciador de ADN 373 de Applied Biosystems. El ADN plasmídico mutado se utilizó para la electroporación en *C. jejuni* NCTC 11168 (32) y los transformantes resistentes a la canamicina se caracterizaron mediante PCR para confirmar que el ADN plasmídico de entrada se había integrado mediante un suceso de doble entrecruzamiento.

Las proteínas se extrajeron de células completas de *C. jejuni* utilizando glicina 0,2 M a pH 2,2 (10) y se dializaron frente a agua. Las muestras se analizaron mediante 2D-PAGE utilizando tiras de IPG ReadyStrip de pH 3 a 10 de 11 cm (BioRad Laboratories) y geles Criterion de gradiente 8% a 16% premoldeados de 12x8 cm (BioRad Laboratories). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie coloidal, se fotografiaron y después se destiñeron parcialmente mediante lavado en agua. Las proteínas se transfirieron durante 1 hora a 207 mA a membranas de PVDF utilizando una celda de transferencia semiseca Trans-Blot SD (BioRad). Tras el bloqueo durante la noche, las membranas se sondearon con una dilución 1:500 de suero serotipado HS:2, seguido de una dilución 1:5.000 de antisuero de cabra anticonejo (Sigma-Aldrich) y se revelaron con NBT/BCIP (Roche Molecular Biochemicals).

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES PARA LA DETECCIÓN DE GLUCANOS A PARTIR DE CÉLULAS DE *CAMPYLOBACTER*

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento: se aisló *Campylobacter jejuni* NCTC11168 (HS:2) de un caso de enteritis humana (46), que posteriormente fue secuenciado por Parkill *et al.* (6). Cepas serológicas de *C. jejuni*: HS:1 (ATCC 43429), HS:2 (ATCC 43430), HS:3 (ATCC 43431), HS:4 (ATCC 43432), HS:10 (ATCC 43438), HS:19 (ATCC 43446), HS:36 (ATCC 43456) y HS:41 (ATCC 43460) fueron obtenidos de la ATCC; *C. jejuni* HS:23 fue obtenido de la Dr. Peggy Godschalk, Erasmus University Medical Center, Rotterdam; y *C. jejuni* OH4382 y OH4384 fueron obtenidos de Health Canada; y *C. coli* HS:30 (NCTC 12532) fue obtenido de NCTC. Todas las cepas de *Campylobacter* se cultivaron rutinariamente en agar de Mueller-Hinton (Difco) bajo condiciones microaerofílicas a 37°C. Se cultivaron mutantes *C. jejuni* NCTC11168 sobre agar de Mueller-Hinton con 30 µg/l de canamicina.

- 10 Construcción y caracterización de las mutaciones específicas de sitio: La construcción de los mutantes *C. jejuni* NCTC11168 kpsM (12) y pglB (13) ya ha sido descrita.

- 15 Preparación de células para la RMN HR-MAS: Se recolectó el cultivo de durante la noche de *C. jejuni* de una placa de agar (~10¹⁰ células) y se suspendió en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato 10 mM (pH 7) preparada en D₂O que contenía azida sódica al 10% (p/v). La suspensión se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente para eliminar las bacterias. Las células se peletizaron mediante centrifugación (7.500xg durante 2 minutos) y se lavaron una vez con solución salina tamponada con potasio 10 mM en D₂O. El pellet se resuspendió mediante la adición de 20 µl de D₂O y después se introdujeron 40 µl de la suspensión en el rotor para el análisis.

- 20 Espectroscopía de RMN HR-MAS: Se llevaron a cabo experimentos de HR-MAS utilizando un espectrómetro Varian Inova 600 MHz dotado de una nanosonda de RMN de Varian tal como se ha descrito anteriormente (12, 13). Se centrifugaron las muestras de 40 µl a 3 kHz y se registraron a temperatura ambiente (21°C). Los experimentos se llevaron a cabo con supresión de la señal de HOD a 4,8 ppm. Los espectros de protones de las células bacterianas se captaron con la secuencia de pulsos de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) [captura de 90-(τ-180-τ)_n] (34) para eliminar las líneas anchas derivadas de lípidos y materiales de tipo sólido. La duración total del pulso de CPMG (n*2τ) fue de 10 ms con τ fijado en (1/tasa de giro de MAS). Se llevaron a cabo experimentos TOCSY 1D con diversos tiempos de confinamiento de espines de entre 30 y 150 ms y de NOESY 1D con periodos de mezcla de entre 100 y 400 ms tal como se ha descrito anteriormente (25, 35). Para la utilización bajo condiciones de MAS, las secuencias de TOCSY se modificaron de manera que se sustituyese la secuencia de mezcla DIPSI-2 por los pulsos adiabáticos de WURST-2 (13). Los experimentos selectivos se describen como EXP[espines seleccionados, ancho de banda de excitación selectiva, tiempo de mezcla], en donde EXP es TOCSY o NOESY. Típicamente, pudieron obtenerse espectros de protones de las células bacterianas utilizando 256 a 1.024 transitorios (15 minutos a 1 hora). Para los experimentos selectivos con las resonancias de glucano N-ligado presentes como componente menor en las células bacterianas, el tiempo para cada TOCSY y NOESY variaba entre 1 y 8 horas.

EJEMPLOS

- 35 EJEMPLO 1 – Purificación y caracterización de PEB3

- Se identificó la proteína PEB3 (Cj0289c) en geles 2D de un extracto de glicina mediante huella de masa peptídica, como componente de un grupo de manchas enfocadas dentro de un intervalo de pH de entre 9 y 10 (resultados no mostrados). PEB3 se purificó del extracto mediante cromatografía de intercambio catiónico y se fraccionó nuevamente en la misma columna utilizando un gradiente más estrecho de NaCl, resultando en la aparición de PEB3 en tres fracciones (fig. 1). El análisis de SDS-PAGE mostró dos bandas, cuyas secuencias N-terminales se determinaron tras su transferencia a una membrana de PVDF. Diez ciclos de secuenciación identificaron la especie de masa inferior como PEB3, mientras que el componente más abundante, de masa más alta, también era PEB3 con una secuencia menor correspondiente a PEB4 (Cj0596).

- El espectro de masas y el perfil de masas moleculares reconstruido para la fracción nº 31 se presentan en las figuras 2a) y b). Se observaron tres picos en el perfil de masas reconstruido. Los picos en 25.454 Da y 28.376 Da corresponden bien a las masas moleculares esperadas de PEB3 (25.453 Da, Cj0289c) y de PEB4 (28.377 Da, Cj0596), respectivamente, sin péptidos de señal. Para identificar la proteína de masa 26.861 Da, se llevó a cabo un análisis de EM-CL-cap/EM del digerido con tripsina de dicha fracción. La totalidad de los péptidos identificados excepto uno pudo asignarse a PEB3 ó PEB4 de acuerdo con los datos de las secuencias N-terminales. El análisis EM/EM del ión no identificado (fig. 3a) lo identifica claramente como un glucopéptido. En este espectro puede observarse una serie de fragmentación compuesta de pérdidas secuenciales de HexNAc (203 Da) y un único Hex (162 Da). El péptido triptico fue identificado como ⁶⁸DFNVSK⁷³ procedente de PEB3. La masa residual de la porción oligosacárida de dicho polipéptido era de 1.406 Da, que se corresponde bien con la diferencia de pesos moleculares de PEB3 y el pico de la proteína desconocida que se observa en la figura 2b. Por lo tanto, aparentemente el 50% aproximadamente de la proteína PEB3 en esta fracción se encontraba modificado con un único oligosacárido compuesto de 5 HexNAcs, 1 Hex y un azúcar no habitual con una masa residual de 228 Da. Además, el espectro de EM/EM indicaba que el oligosacárido se encontraba unido al péptido mediante la fracción sacárida de 228 Da.

EJEMPLO 2 – Caracterización del enlace glucopéptido

El péptido tríptico de PEB3 al que se encontraba unido el oligosacárido contenía sitios para la unión tanto a N como a O, es decir, Asn y Ser. Por lo tanto, resultó necesario llevar a cabo experimentos adicionales para determinar la naturaleza de dicha unión. Previamente los presentes inventores han utilizado la β -eliminación para eliminar los carbohidratos unidos a O de la flagelina de *C. jejuni* 81-176 (5). Sin embargo, este procedimiento no ha conseguido eliminar el oligosacárido en este caso. Ésta fue la primera indicación para los presentes inventores de que el oligosacárido se encontraba unido a N. Esto se confirmó mediante análisis EM/EM del ión fragmento individualmente protonado en m/z 937,0 producido mediante disociación inducida por colisión frontal del glucopéptido intacto (fig. 3b). Este ión está compuesto del péptido tríptico más el sacárido poco habitual de 228 Da únicamente. Se observó un ión en m/z 605,1, que sólo pudo asignarse al ión fragmento b_3 más la fracción sacárida de 228 Da. No se observaron iones fragmentos que sugiriesen que el carbohidrato se uniese al residuo serina. Todos dichos datos sugieren fuertemente que el oligosacárido se encuentra unido al péptido en Asn70. Resulta interesante que este péptido contiene el seqüón de consenso eucariótico de unión a N, Asn-Xaa-Ser.

EJEMPLO 3 – Aislamiento e identificación de glucoproteínas

Las glucoproteínas putativas se purificaron mediante cromatografía de afinidad de SBA de los extractos de glicina con 40 gramos de peso húmedo de células. El rendimiento de glucoproteínas putativas era de 5 mg, estimado mediante absorbancia de UV a 280 nm. El eluyente de GalNAc se sometió a PAGE 1D y 2D (fig. 4) y para garantizar que las proteínas purificadas de esta manera presentaban propiedades de unión a lectina y no características de unión no específicas, también se llevó a cabo transferencia western con un conjugado de SBA/fosfatasa alcalina. Se visualizaron aproximadamente 13 especies de proteínas tras SDS-PAGE 1D, aunque este número se incrementó sustancialmente al analizar el producto mediante 2D-PAGE. Las proteínas en las bandas individuales del SDS-PAGE 1D y de las manchas del 2D-PAGE se identificaron mediante huellas de masa y búsquedas en bases de datos (Tabla I). Entre las proteínas identificadas se encontraban PEB3 (Cj0829c) y CgpA (Cj1670c), previamente identificadas por Linton *et al.* (8). El patrón vertical de manchas con pls idéntico mostrado por Cj1670c y otras proteínas probablemente indica grados variables de glucosilación, ya que el examen de las secuencias de aminoácidos teóricas, derivadas de la secuencia genómica completa de *C. jejuni* NCTC 11168 (6), revela la presencia de múltiples sitios potenciales de glucosilación N-ligada que contienen el seqüón Asn-Xaa-Ser/Thr (Tabla I). De hecho, el análisis EM/EM de los extractos de digerido en el gel que contienen Cj1670c indicaban que 3 de estos sitios de unión a N se encontraban ocupados en grados variables (se detectaron tres glucopéptidos Cj1670c mediante CapLC-EM/EM: $^7\text{TDQNITLVAPPEFQKEEVK}^{25}$, $^{77}\text{VLOVSVTIPEKNSSK}^{91}$ y $^{92}\text{QESNSTANVEIPLQVAK}^{108}$). También se observó un solo glucopéptido para Cj0114 ($^{71}\text{LSQVEENNQNIENNFTSEIQK}^{91}$) y para Cj0200c ($^{1}\text{DSLKLEGTIAQIYDNNK}^{17}$). Además, la masa y la composición del componente glucano de todos dichos glucopéptidos aparentemente son idénticas a las observadas para PEB3.

Sin embargo, determinadas proteínas identificadas del 2D-PAGE, principalmente Cj0147c, Cj0169, Cj0332c, Cj0334, Cj0638c, Cj1181c y Cj1534c no contienen ninguna de dichos seqüones específicos en sus secuencias de aminoácidos. Estas proteínas se encontraban asociadas no covalentemente con proteínas de unión a SBA o no se unían específicamente a la columna. Esta conclusión se ve apoyada por la no reacción de estas manchas de proteínas con el conjugado de SBA/fosfatasa alcalina tras el 2D-PAGE y la electrotransferencia (Tabla I).

EJEMPLO 4 – Preparación de glucopéptidos

La muestra de glucoproteínas mixtas se sometió a dos rondas de digestión con pronasa y los productos se separaron mediante filtración en gel en BioGel P4 (fig. 5a). Las fracciones que contenían carbohidratos se localizaron mediante espectrometría de masas y, tras los análisis de RMN (ver posteriormente), la muestra se purificó nuevamente en BioGel P2 (fig. 5b). La muestra purificada final estaba compuesta principalmente del oligosacárido unido a una sola Asn (fig. 5c). No se encontraron datos de ninguna variación del componente glucano. El rendimiento de glucopéptido se estimó en aproximadamente 200 μg .

EJEMPLO 5 - Preparación de heptasacárido aislado

La fracción heptasacárida identificada en el Ejemplo 4 (Fórmula I) puede obtenerse en forma aislada mediante métodos conocidos. Por ejemplo, la fracción aminoácido (Asn) puede cortarse del oligopéptido preparado en el Ejemplo 4 mediante hidrólisis enzimática o química bien conocida de la técnica. Puede indicarse que, aunque los presentes inventores no llevaron a cabo la etapa anteriormente indicada, resultaría evidente que puede llevarse a cabo dicha etapa para aislar el heptasacárido. El heptasacárido también puede obtenerse directamente de la glucoproteína sin pasar por ningún glucopéptido. Este corte también puede llevarse a cabo mediante hidrólisis enzimática o química. Por ejemplo, Patelet *et al.* (41) enseñan la utilización de hidrazina para llevar a cabo dichos cortes.

EJEMPLO 6 – Espectroscopía de RMN

Con la utilización de métodos selectivos, resultó posible utilizar la muestra de P4 impura. Se llevó a cabo la asignación de resonancias completa de la fracción sacárida utilizando esta muestra para evitar la posible pérdida de glucopéptido con purificaciones adicionales. Tras una segunda purificación con la columna P2, se perdió 25% del glucopéptido, según las mediciones de la proporción S/N de las muestras purificadas de P4 y P2. Se llevó a cabo nuevamente un experimento de HMQC con la muestra purificada de P2 para confirmar las asignaciones obtenidas utilizando la muestra purificada de P4. De los resultados de espectrometría de masas, se conoce que el glucopéptido está compuesto de 5 residuos de HexNAc, un residuo de Hex y un sacárido desconocido con una masa de 228 Da. Se determinó mediante análisis químico que la configuración absoluta de los residuos HexNAc y Hex era D. El análisis de los datos de RMN de ^1H y ^{13}C indicó la presencia de 8 protones anoméricos etiquetados en orden alfabético (fig. 6). Se llevó a cabo una serie de TOCSY 1D para las resonancias anoméricas para las asignaciones de los protones (fig. 7). Se utilizaron diferentes tiempos de mezcla para asignar los espines para cada residuo. A continuación, se utilizó HMQC y HMBC para asignar las resonancias de ^{13}C . Se proporcionan las asignaciones de RMN en la Tabla II. Se utilizaron los experimentos de NOESY 1D (fig. 7) para obtener la secuencia, tal como se muestra (fig. 6).

Se asignó que el residuo g era β -D-Glcp. Para el TOCSY 1D de g1 con un tiempo de mezcla de 144 ms (fig. 7a), se detectaron todos los espines hasta las resonancias H6 y H6', indicativos de los grandes acoplamientos $J_{\text{H,H}}$, típicos de la β -glucopiranososa. La resonancia g1 también se solapaba con f2, permitiendo la detección de las resonancias f1 a f4. El residuo g era terminal, debido a desplazamientos químicos de ^{13}C y ^1H similares para C2 a C6 a los de la β -D-glucopiranososa (36).

Se identificaron cinco residuos (a, c, d, e y f) como α -D-GalpNAc. Un valor de $J_{1,2}$ de $3,6 \pm 0,2$ Hz, el NOE H1-H2 fuerte (fig. 7) y el patrón de acoplamiento $J_{\text{H,H}}$, que incluía un pequeño acoplamiento con H4 (fig. 7), demuestran que estas unidades presentan la configuración del α -D-galactopiranosilo. Aunque las resonancias anoméricas e1 y f1 podrían excitarse selectivamente con un ancho de banda estrecho de 10 Hz, los espectros para la excitación simultánea de e1 y f1 se muestran en la fig. 7b. También se detectaron resonancias f2 a f4 para el TOCSY 1D de g1f2 (fig. 7a). Un desplazamiento químico de C2 próximo a 51 ppm es indicativo de un grupo acetamido. Las correlaciones de HMBC (C2, H4) se utilizaron para asignar las resonancias de C2 de los cinco residuos GalNAc. Se utilizó el TOCSY 1D-NOESY(H1, H4) para detectar el NOE entre H4 y H5 y de esta manera asignar las resonancias de H5 (25). Los experimentos de TOCSY 1D de las resonancias de H5 seguidamente se utilizaron para detectar las resonancias H6s (no mostradas). La integración de la muestra purificada de P2 (fig. 6b) indicó 7 grupos NAc, cinco de los cuales correspondían a los cinco residuos GalNAc. La comparación entre los desplazamientos químicos de ^{13}C de las unidades GalNAc con las de α -D-GalpNAc indica que los residuos a, c, e y f se encontraban unidos en O-4 debido a los desplazamientos a campo más bajo para C4 (37). El residuo f presentaba un punto de ramificación en O-3, establecido a partir de un desplazamiento a campo más bajo para C3. El residuo g era terminal, debido a desplazamientos químicos de ^{13}C similares para C2 a C6 a los de α -D-GalpNAc (37).

El residuo b se asignó a β -D-bacilosamina (2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxi- β -D-glucopiranososa). Para los residuos b y c, las resonancias anoméricas se solapaban parcialmente. Para el TOCSY 1D de las resonancias b1 y c1 con un tiempo de mezcla de 144 ms (fig. 7e), pudieron identificarse resonancias anchas hasta una resonancia de CH_3 (b6) en 1,14 ppm. Para el TOCSY 1D para b6 en 1,14 ppm, con un tiempo de mezcla de 66 ms (fig. 7d), pudieron observarse picos hasta b4. Se realizó una serie de TOCSY 1D con un tiempo de mezcla diferente de entre 30 y 144 ms para asignar los picos. Para el residuo b, los picos anchos no proporcionan las constantes de acoplamiento. Sin embargo, para el TOCSY 1D de b1, con un tiempo de mezcla de 144 ms, pudieron observarse resonancias hasta H6, similares al TOCSY 1D para H1 de β -Glcp (residuo g). Por lo tanto, una transferencia tan eficiente es indicativa de constantes de acoplamiento grandes, típicas de una configuración de β -glucopiranosilo. Los NOE de b1-b3 y b1-b5 observados en fig. 7k también eran típicos de la configuración anomérica β . Los desplazamientos químicos para C2 y C4 en 55 y 58 ppm eran indicativos de grupos acetamidos, de acuerdo con la presencia de 7 grupos NAc en la estructura (fig. 6a). Los desplazamientos químicos para C1 en 79 ppm y de H1 en 5,1 ppm indicaban un anomérico N-ligado similar al observado para β -GlcNAc-Asn (20). La comparación entre los desplazamientos químicos del residuo b con los de la 2,4-diamino-2,4,6-trideoxi- β -D-glucopiranososa observada en otras estructuras indicaba que Bac se encontraba unido en O-3, el único posible sitio de glucosidación (38-40).

La configuración absoluta del residuo b se obtuvo mediante NOE tal como se ha indicado anteriormente para otra estructura que contiene bacilosamina (38). Un NOE fuerte observado entre la resonancia de CH_3 en 1,14 ppm (b6) y el NAc en 1,95 ppm se debía a la estrecha proximidad del grupo CH_3 en C6 al grupo NAc- CH_3 en C4. Debido a que la resonancia de NAc en 1,95 ppm se encontraba aislada de otras resonancias de NAc, pudo excitarse selectivamente. Se observó un NOE fuerte entre esta resonancia de NAc y la resonancia H1 de α -D-GalpNAc del residuo a debido al enlace a(1-3)b, tal como se muestra posteriormente. Este NOE puede producirse únicamente en el caso de que el residuo b presente la configuración D, en la que el grupo NAc en C4 del residuo b se encuentre muy próximo (3 Å) al protón anomérico del residuo a. Este NOE no resulta posible en el caso de que el residuo b presente la configuración L, debido a que las distancias entre protones H1a/4b-NAc son superiores a 5 Å.

Se determinó la secuencia mediante experimentos de NOESY 1D (fig. 7). El fuerte NOE c1-f4 y los menores NOE

c1-f6 y c1-f6' establecieron el enlace c(1-4)f. El fuerte NOE d1-c4 y uno d1-c6' menor indica la secuencia d(1-4)c. Los e1-a4, f1-e4 y g1-f3 establecieron los enlaces e(1-4)a, f(1-4)e y g(1-3)f. El NOE a1-b3 (fig. 7I) estableció la secuencia a-b. Se muestra la estructura en la figura 6a. La secuencia concuerda con el desplazamiento de glucosidación observado para los carbonos de enlace (ver anteriormente).

5 EJEMPLO 7 – Caracterización de un mutante *pglB*

Se construyó un mutante *pglB* mediante mutagénesis por inserción de casete (fig. 8). Los extractos de glicina de las células mutantes mostraron cambios drásticos de inmunoreactividad de las proteínas en el 2D-PAGE con transferencia western con sueros serotipados HS:2 (fig. 8b,e). Se identificaron varias de las proteínas que mostraban
10 una cambio de movilidad y/o inmunoreactividad en los geles 2D mediante análisis de las huellas de masas (Tabla I). Las identificaciones de proteínas concordaban con las identificadas mediante cromatografía de afinidad con lectina SBA, proporcionando evidencia adicional de que las proteínas reactivas con la lectina GalNAc se glucosilan en la ruta de *Pgl*. No se observó el conjunto completo de proteínas reactivas con SBA en el presente experimento ya que se llevó a cabo en extractos completos de glicina y en un intervalo de pH diferente, es decir, las figs. 4 y 8 no son directamente comparables. Además, se purificó PEB3 a partir del mutante de *pglB* mediante cromatografía de intercambio iónico tal como se ha indicado anteriormente, y el análisis de espectrometría de masas mostró que la
15 proteína no presentaba glucano en absoluto (fig. 2c,d).

Para demostrar que la mutación *pglB* sólo afectaba a la glucosilación de las glucoproteínas, se llevó a cabo el análisis del lipooligosacárido y del polisacárido capsular del mutante. El PAGE-desoxicolato de los digeridos con
20 proteínasa K y la espectrometría de masas mostraron que la masa del núcleo LOS mutante era idéntico al del tipo salvaje (resultados no mostrados). Además, eran visibles repeticiones capsulares idénticas en los extractos de células del tipo salvaje y de mutante isogénico en el PAGE-desoxicolato. Para demostrar adicionalmente que la cápsula no resultaba alterada, los presentes inventores examinaron el polisacárido mediante RMN HRMAS. El espectro del mutante no resultó modificado en comparación con el del tipo salvaje (resultados no mostrados).

EJEMPLO 8 – Detección de glucanos N-ligados en células completas mediante RMN HR-MAS

En los espectros de RMN HR-MAS de las células intactas de *Campylobacter* (fig. 9), se detectó un conjunto común de resonancias de ^1H . Los presentes inventores previamente habían determinado utilizando técnicas de EM y de nano-RMN que la estructura del glucano N-ligado de *C. jejuni* NCTC11168 era un heptasacárido (13). Tal como
25 puede observarse en los espectros de HR-MAS de *C. jejuni* NCTC11168, NCTC11168 kpsM, *C. jejuni* HS:19 y *C. coli* HS:30, se observaron resonancias anoméricas que se correspondían con las del glucano N-ligado purificado, sugiriendo que este glucano era común a todos (fig. 9). En los espectros de NCTC11168 (fig. 9b), las resonancias correspondientes al glucano N-ligado eran menos intensas que las resonancias de los CPS y algunas de las resonancias anoméricas se solapaban. Sin embargo, podían distinguirse claramente al eliminar las resonancias capsulares en el mutante kpsM de NCTC11168 (fig. 9c). La asignación de las resonancias del glucano común al
30 glucano N-ligado pudieron validarse adicionalmente mediante el examen de los espectros del mutante *pglB* de NCTC11168 en el que se había anulado la glucosilación de las proteínas (3, 13). Tal como se esperaba, no pudieron observarse resonancias del glucano N-ligado en el espectro de RMN de este mutante (fig. 9f).

La identidad del glucano común putativo se confirmó adicionalmente utilizando experimentos de TOCSY y NOESY selectivo (fig. 10). Se llevaron a cabo experimentos utilizando células de *C. jejuni* HS:19, debido a que las resonancias anoméricas del glucano N-ligado pudieron observarse claramente. Un experimento NOESY partiendo
40 de irradiación selectiva de la resonancia a1 en HS:19 estableció una correlación con una resonancia en 4,21 ppm (fig. 10a). Esta resonancia presentaba el mismo desplazamiento químico que la resonancia a2 observada en los espectros de NOESY para la resonancia a1 en el glucopéptido purificado (fig. 10b). La comparación entre los patrones de NOE para otras resonancias anoméricas de HS:19 y el glucano N-ligado purificado indica claramente una correspondencia similar entre los dos conjuntos de experimentos (fig. 10c-f). Debido a que los experimentos
45 NOE revelan correlaciones tanto dentro de residuos como entre residuos, dicha concordancia sugiere que la secuencia del glucano común es idéntica a la del glucano N-ligado purificado informado anteriormente (13). Un experimento TOCSY selectivo con irradiación de las resonancias solapantes g1 y f2 en 4,5 ppm dio lugar a picos cruzados correspondientes a las resonancias g2 y f3 (fig. 10g). La forma del multiplete y desplazamientos químicos de los mismos se correspondía con los observados en el experimento correspondiente para el glucano N-ligado purificado (fig. 10h). Otras resonancias observadas se debían a la excitación parcial de las resonancias más fuertes de los CPS. Por lo tanto, los experimentos de excitación selectiva llevados a cabo en las células bacterianas
50 establecieron la identidad *in situ* del glucano N-ligado común.

La detección del glucano N-ligado en los espectros de RMN HR-MAS de diversas especies de *Campylobacter* se muestra en la figura 11. La estructura del glucano N-ligado se muestra en la parte superior de los espectros. Se muestra a título comparativo el espectro del glucano N-ligado purificado de *C. jejuni* NCTC11168 que muestra las resonancias anoméricas etiquetadas a a g y las resonancias comunes indicadas mediante líneas verticales de
55

puntos. Se muestran los espectros de RMN HR-MAS utilizando un filtro de CPMG de 10 ms de células completas de *C. coli* HS:30 (NCTC 12532, aislado a partir de un cerdo en Bruselas), *C. coli* 423 (aislado a partir de un pollo en Alberta) y *C. fetus* spp. *venerealis* biotipo A (NCTC 10354, aislado a partir de moco vaginal de una vaca). La resonancia de HOD en 4,8 ppm se encontraba saturada y se filtró digitalmente.

La figura 12 muestra la RMN de alta resolución con giro de ángulo mágico con y sin cloruro de cobalto para demostrar la exposición superficial del glucano Pgl N-ligado. El espectro en la parte superior en cada uno es de muestras en la que se ha añadido CoCl_2 . Se habían procesado de la misma manera. Se observa que la proporción de señal a ruido (S/N) del espectro superior es muy inferior a la del espectro inferior en cada uno. Debido a que los espectros se captan eficazmente con un filtro T2, las líneas que han sido ensanchadas por el CoCl_2 presentarán una apariencia más débil. Se observa que para el mutante *kspM*, los picos próximos a 3,15 ppm muestran intensidades relativas muy diferentes al pico o picos próximos a 3 ppm. La S/N absoluta para los picos próximos a 3,15 ppm son/sin CoCl_2 es aproximadamente igual, mientras que para el pico en 3 ppm es muy diferente. Lo anterior indica que los picos en 3,15 ppm probablemente son internos y no se encuentran disponibles para el CoCl_2 . De esta manera, los residuos externos presentan una intensidad significativamente reducida. En el caso de HS:19, puede llevarse a cabo la misma observación para el pico de 3,15 ppm frente al de 3 ppm. Además, los picos de ácido aspártico en ~2,7 y en ~2,85 ppm (ver Szymanski *et al.*, JBC, 2003) desaparecen en presencia de CoCl_2 , lo que confirma que los residuos expuestos sobre la superficie externa o expuestos al medio resultan ensanchados. Debido a que las resonancias del glucano Pgl N-ligado (ver Szymanski *et al.*, JBC, 2003, y la fig. 9) desaparecen esencialmente en presencia de CoCl_2 , esto indica que también se encuentran sobre la superficie celular.

Preparación y administración de anticuerpos y vacunas

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a la fracción glucano según la invención pueden producirse mediante métodos convencionales. Por ejemplo, pueden cultivarse anticuerpos monoclonales murinos contra el glucano de Fórmula I (incluyendo los fragmentos), opcionalmente ligados a un conjugado oligopeptídico o de aminoácidos o inmunogénico. Otra estrategia es someter a selección una biblioteca preexistente de genes clonados que se han derivado de un linfocito de camélido y que son capaces de expresar fragmentos de anticuerpos dAb, con el fin de identificar y aislar genes capaces de expresar fragmentos que presentan actividad inmunogénica contra el antígeno seleccionado. El gen o genes aislados de esta manera pueden expresarse en una biblioteca de bacteriófagos que ha sido modificada para contener dicho gen. Dicho antígeno puede comprender el heptasacárido indicado anteriormente o un fragmento de dicho heptasacárido, opcionalmente unido tal como se ha indicado anteriormente a un aminoácido, oligopéptido u otro conjugado. El presente método se describe en la patente US nº 5.759.808, de Casterman *et al.* Una estrategia adicional es incorporar el gen para expresar el anticuerpo seleccionado o fragmento en el genoma de una planta adecuada que seguidamente puede servir como fuente de alimento para el ganado. Dicha planta expresaría en este caso el anticuerpo o fragmento de anticuerpo y, al ser consumida por el ganado, administraría de esta manera una dosis adecuada del anticuerpo o fragmento en el animal.

De esta manera, se conoce que existe una diversidad de métodos para generar anticuerpos o fragmentos que se unen específicamente a los glucanos de la presente invención. Dichos fragmentos de anticuerpo pueden prepararse o producirse independientemente de un anticuerpo completo.

Los anticuerpos también pueden prepararse por medios tradicionales de aislamiento de dichos anticuerpos a partir de suero de un animal en el que se han administrado dosis adecuadas del antígeno identificado en los ejemplos anteriores. Por ejemplo, dichos métodos se describen en la patente US nº 5.759.808, de Casterman *et al.* Dicha referencia describe la utilización de especies de camélido para producir un tipo único de anticuerpo que no contiene cadenas ligeras.

Pueden administrarse anticuerpos o fragmentos tales como los indicados anteriormente con un portador adecuado en seres humanos o ganado como forma de inmunización pasiva. Al administrarlos en el ganado, tal como aves, el enfoque preferente es proporcionar los anticuerpos o fragmentos con el alimento o agua de bebida, mediante la mezcla en un concentrado o mediante el suministro a un producto vegetal que se ha modificado para expresar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Los anticuerpos o fragmentos, proporcionados separadamente pueden suministrarse con portadores adecuados en forma de un concentrado para la mezcla con el alimento o bebida previamente a la utilización.

Dichos anticuerpos o fragmentos administrados en el ganado combaten la presencia de *Campylobacter* en el ganado, evitando de esta manera que el ganado extienda los patógenos a seres humanos que se alimentan o manipulan los productos animales, así como a modo de protección del agua subterránea frente a la contaminación por residuos animales, tal como se ha indicado anteriormente.

Dichos anticuerpos y fragmentos también pueden utilizarse para diagnosticar la presencia de bacterias *Campylobacter* en seres humanos o animales por medios convencionales. Asimismo, también pueden utilizarse como componente de un ensayo para determinar la presencia de *Campylobacter* en una muestra, tal como de agua,

tierra o estiércol.

El heptasacárido o fragmentos, opcionalmente unidos a un aminoácido, oligopéptido u otro conjugado adecuado, también puede combinarse con adyuvantes e inmunoestimuladores adecuados para la administración a modo de vacuna. Con dicho propósito se administra una o más dosis adecuadas de un modo convencional.

5 REFERENCIAS

1. Schäffer, C., Graninger, M., and Messner, P. (2001) *Proteomics*. 1, 248-261.
2. Moens, S. and Vanderleyden, J. (1997) *Arch. Microbiol.* 168, 169-175.
3. Szymanski, C. M., Yao, R., Ewing, C. P., Trust, T. J., and Guerry, P. (1999) *Mol. Microbiol.* 32, 1022-1030.
4. Szymanski, C. M., Burr, D. H., and Guerry, P. (2002) *Infect. Immun.* 70, 2242-2244.
- 10 5. Thibault, P., Logan, S. M., Kelly, J. F., Brisson, J. R., Ewing, C. P., Trust, T. J., and Guerry, P. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 34862-34870.
6. Parkhill, J., Wren, B. W., Mungall, K., Ketley, J. M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R. M., Feltwell, T., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A. V., Moule, S., Pallen, M. J., Penn, C. W., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rutherford, K. M., van Vliet, A. H., Whitehead, S., and Barrell, B. G. (2000) *Nature* 403, 665-668.
- 15 7. Pei, Z. H., Ellison, R. T., III, and Blaser, M. J. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 16363-16369.
8. Linton, D., Allan, E., Karlyshev, A. V., Cronshaw, A. D., and Wren, B. W. (2002) *Mol. Microbiol.* 43, 497-508.
9. Wacker, M., Nita-Lazar, M., and Aebi, M. (2001) *Int. J. Med. Microbiol.* 291 Suppl 31, 81.
10. Dell, A. and Morris, H. R. (2001) *Science* 291, 2351-2356.
11. Krinos, C. M., Coyne, M. J., Weinacht, K. G., Tzianabos, A. O., Kasper, D. L., and Comstock, L. E. (2001) *Nature*
- 20 414, 555-558.
12. St Michael, F., Szymanski, C. M., Li, J., Chan, K. H., Khieu, N. H., Larocque, S., Wakarchuk, W. W., Brisson, J. R., and Monteiro, M. A. (2002) *Eur. J. Biochem.* 269, 5119-5136.
13. Young, N. M., Brisson, J. R., Kelly, J., Watson, D. C., Tessier, L., Lanthier, P. H., Jarrell, H. C., Cadotte, N., St Michael, F., Aberg, E., and Szymanski, C. M. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 42530-42539.
- 25 14. Gilbert, M., Karwaski, M. F., Bematchez, S., Young, N. M., Taboada, E., Michniewicz, J., Cunningham, A. M., and Wakarchuk, W. W. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 327-337.
15. Gilbert, M., Brisson, J. R., Kawarski, M. F., Michniewicz, J., Cunningham, A. M., Wu, Y., Young, N. M., and Wakarchuk, W. W. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 3896-3906.
16. Karlyshev, A. V., Linton, D., Gregson, N. A., Lastovica, A. J., and Wren, B. W. (2000) *Mol. Microbiol.* 35, 529-541.
- 30 17. Penner, J. L. and Hennessy, J. N. (1980) *J. Clin. Microbiol.* 12, 732-737.
18. Bacon, D. J., Szymanski, C. M., Burr, D. H., Silver, R. P., Alm, R. A., and Guerry, P. (2001) *Mol. Microbiol.* 40, 769-777.
19. Moran, A. P., Penner, J. L., and Aspinall, G. O. (2000) in *Campylobacter* (Nachamkin, I. and Blaser, M. J., eds) pp. 241-257, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 35 20. Moran, A. P. and Prendergast, M. M. (2001) *J. Autoimmun.* 16, 241-256.
21. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
22. LeGendre, N. and Matsudaira, P. (1988) *Biotechniques* 6, 154-159.
23. Rademaker, G. J., Pergantis, S. A., Blok-Tip, L., Langridge, J. I., Kleen, A., and Thomas-Oates, J. E. (1998) *Anal. Biochem.* 257, 149-160.

24. Gharahdaghi, F., Weinberg, C. R., Meagher, D. A., Imai, B. S., and Mische, S. M. (1999) *Electrophoresis* 20, 601-605.
25. Uhrin, D. and Brisson, J. R. (2000) in *NMR in Microbiology: Theory and Applications* (Barbotin, J. N. and Portais, J. C., eds) pp. 165-210, Horizon Scientific Press, Wymondham, U.K.
- 5 26. Uhrin, D. and Barlow, P. N. (1997) *J. Magn. Reson.* 126, 148-155.
27. Kupce, E., Keifer, P. A., and Delepierre, M. (2001) *J. Magn. Reson.* 148, 115-120.
28. Piotto, M., Bourdonneau, M., Furrer, J., Bianco, A., Raya, J., and Elbayed, K. (2001) *J. Magn. Reson.* 149, 114-118.
29. Kupce, E., Schmidt, P., Rance, M., and Wagner, G. (1998) *J. Magn. Reson.* 135, 361-367.
- 10 30. Vinogradov, E. V., Holst, O., Thomas-Oates, J. E., Broady, K. W., and Brade, H. (1992) *Eur. J. Biochem.* 210, 491-498.
31. Labigne-Roussel, A., Courcoux, P., and Tompkins, L. (1988) *J. Bacteriol.* 170, 1704-1708.
32. Guerry, P., Yao, R., Alm, R. A., Burr, D. H., and Trust, T. J. (1994) *Methods Enzymol.* 235, 474-481.
- 15 33. Ahmed, I. H., Manning, G., Wassenaar, T. M., Cawthraw, S., and Newell, D. G. (2002) *Microbiology* 148, 1203-1212.
34. Meiboom, S. and Gill, D. (1958) *Rev. Sci. Instrum.* 29, 688-691.
35. Brisson, J. R., Sue, S. C., Wu, W. G., McManus, G., Nghia, P. T., and Uhrin, D. (2002) in *NMR spectroscopy of glycoconjugates* (Jimenez-Barbero, J. and Peters, T., eds) pp. 59-93, Wiley-VCH, Weinheim.
36. Jansson, P.-E., Kenne, L., and Widmalm, G. (1989) *Carbohydr. Res.* 188, 169-191.
- 20 37. Baumann, H., Tzianabos, A. O., Brisson, J. R., Kasper, D. L., and Jennings, H. J. (1992) *Biochem.* 31, 4081-4089.
38. Hermansson, K., Perry, M. B., Altman, E., Brisson, J. R., and Garcia, M. M. (1993) *Eur. J. Biochem.* 212, 801-809.
- 25 39. Molinaro, A., Evidente, A., Sate, I. N., Lanzetta, R., Lo, C. P., Mancino, A., and Parrilli, M. (2002) *Carbohydr. Res.* 337, 467-471.
40. Schäffer, C., Scherf, T., Christian, R., Kosma, P., Zayni, S., Messner, P., and Sharon, N. (2001) *Eur. J. Biochem.* 268, 857-864.
41. Patel, T., Bruce, J., Merry, A., Bigge, C., Wormald, M., Jaques, A., and Parekh, R. (1993) *Biochemistry* 32, 679-693.
- 30 Las abreviaturas utilizadas en la presente memoria son las siguientes:
Bac, bacilosamina, 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxi-D-glucopiranosas;
capLC-EM/EM, cromatografía líquida capilar-espectrometría de masas en tándem;
CE, electroforesis capilar;
CPMG, Carr-Purcell-Meiboom-Gill;
35 CPS, polisacárido capsular;
COSY, espectroscopía correlacionada;
DIPSI-2, desacoplamiento en presencia de interacciones escalares;
EM-ESI, espectrometría de masas con ionización por electropulverización;
GBS, síndrome de Guillain-Barré;
40 HMBC, correlación heteronuclear a larga distancia;
HMQC, correlación heteronuclear múltiple cuántica;
HR-MAS, de alta resolución con giro de ángulo mágico;
LOS, lipooligosacáridos;
LPS, lipopolisacárido;
45 MALDI-TOFMS, espectrometría de masas a tiempo de vuelo con desorción asistida por láser;
MAS, giro de ángulo mágico;
MLEV-17, ciclo de desacoplamiento de Malcolm Levitt;

5 EM-espectrometría de masas
EM/EM-espectrometría de masas en tándem
NOESY, espectroscopía de efecto nuclear Overhauser;
PVDF, difluoruro de polivinilideno;
SBA, aglutinina de soja;
TOCSY, espectroscopía de correlación total; y
WURST-2, truncado suave de banda ancha, tasa uniforme.

10 TABLA I

<i>Identificación de proteínas a partir de geles 2-D</i>				
Gen Cj	Nota	Número de secuencias ^a	Tinción de SBA ^b	mutante pgIB ^c
Cj0114d	probable proteína periplásmica	2S, 3T	+	+
Cj0143c	proteína periplásmica de unión a soluto para sistema de transporte ABC	1S, 1T	+	
Cj0147c	tiorredoxina (TrxA)		-	
Cj0169	superóxido dismutasa (Fe; SodB)		-	
Cj0175ce	proteína periplásmica putativa de unión a hierro del sistema de transporte ABC de incorporación del hierro	1S, 2T	+	+
Cj0200cd	probable proteína periplásmica	1T	+	+
Cj0238	probable proteína integral de membrana	5S, 1T	-	
Cj0289cd	péptido antigénico mayor (PEB3)	2S	+	+
Cj0332c	nucleósido difosfato quinasa (Ndk)		-	
Cj0334	alquilhidroperóxido reductasa (AhpC)		-	
Cj0376	probable proteína periplásmica	1S, 1T	+	
Cj0415e	subunidad oxidorreductasa putativa	3T	+	
Cj0420	probable proteína periplásmica	1T	-	+
Cj0493	factor de elongación de traducción EF-G (FusA)	1T	-	
Cj0511	probable proteínasa secretada	2S, 2T	+	+
Cj0638c	pirofosfatasa inorgánica (Ppa)		-	
Cj0694	probable proteína periplásmica	4S, 2T	+	
Cj0715	proteína periplásmica similar a transtiretina		-	+
Cj0779	tiorredoxina peroxidasa (Tpx)	1S	+	
Cj0835c	aconitato hidratasa (AcnB)	1S, 2T	+	
Cj0843ce	transglucosilasa secretada putativa	5S, 3T	+	
Cj0906c	probable proteína periplásmica	2S, 2T	+	
Cj0944c	probable proteína periplásmica	1S, 1T	+	

Cj0998c	probable proteína periplásmica	1S, 1T	+	+
Cj1018c	proteína de unión periplásmica del sistema de transporte ABC de aminoácidos de cadena ramificada	1S, 2T		+
Cj1032	probable componente de fusión de membrana de sistema de flujo de salida	2T	+	
Cj1181c	EF-T de factor de elongación de traducción (Tsf)		-	
Cj1214c	proteína hipotética	1S _		
Cj1221	chaperonina de 60 kD (Cpn60; GroEL)	1S, 2T	+	
Cj1345c	probable proteína periplásmica	5S, 2T	+	
Cj1380	probable proteína periplásmica	2T	-	
Cj1444ce	proteína periplásmica putativa del sistema de exportación de polisacáridos capsulares (KpsD)	3S, 2T	+	
Cj1496c	probable proteína periplásmica	1S, 1T	+	+
Cj1534c	probable bacterioferritina		-	
Cj1565c	proteína del flagelo paralizado (PflA)	5S, 2T	+	
Cj1643	proteína periplásmica putativa	3S, 1T		+
Cj1659	proteína periplásmica (P19)		-	
Cj1670cd	probable proteína periplásmica (CpgA)	4S, 2T	+	+

^a S, seüones Asn-Xaa-Ser; T, seüones Asn-Xaa-Thr.

^b Reactividad con SAB en transferencias western de geles 2D.

^c Proteínas con posición modificada de mancha y/o inmunorreactividad en geles 2D, en el mutante pglB. Cj1018c y Cj1643 no fueron aislados mediante cromatografía SBA.

^d Glicopéptidos observados mediante Cap-LC-EM/EM.

^e Identificados a partir de gel 1D.

TABLA II

Desplazamientos químicos (ppm) del glucopéptido de C. jejuni unido a Asn. Medidos a 600 MHz (¹H) en D₂O, 35°C con HOD en 4,67 ppm. Resonancia del metilo de acetona externa en d_H 2,23 ppm y d_C 31,07 ppm. El error de d_C es ± 0,2 ppm y de ± 0,02 ppm para d_H. Siete resonancias de NAc en d_H 2,07, 2,05, 2,04, 2,03, 2,02, 2,02 y 1,95 ppm. d_C NAc-CH₃ en 23,1-23,4 ppm. d_C NAc-CO en 175-176 ppm.

Residuo	C1	C2	C3	C4	C5	C6	
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H6'
(a) a-	98,0	50,7	68,0	77,6	72,7	62,2	
GalNAc	5,21	4,21	3,83	4,02	3,83	3,93	3,90

ES 2 391 525 T3

(b) β -Bac	79,0	54,5	76,3	58,1	75,0	17,6	
	5,11	3,91	3,91	3,80	3,59	1,14	
(c) a-GalNAc	98,3	51,6	67,9	77,5	71,8	60,9	
	5,10	4,26	4,14	4,10	4,46	3,71	3,62
(d) a-GalNAc	99,7	51,4	68,4	69,6	72,3	60,7	
	5,04	4,20	4,01	4,03	4,36	3,67	3,61
(e) a-GalNAc	99,6	51,6	67,9	77,5	72,4	60,7	
	5,00	4,25	4,12	4,09	4,35	3,67	3,61
(f) a-GalNAc	99,9	50,7	77,5	75,8	72,5	60,5	
	4,98	4,50	4,14	4,32	4,42	3,61	3,53
(g) β -Glc	106,1	74,1	76,9	71,1	77,2	62,1	
	4,51	3,28	3,46	3,35	3,39	3,89	3,68

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que comprende un heptasacárido aislado de fórmula $\text{GalNAc-}\alpha\text{1,4-GalNAc-}\alpha\text{1,4-[Glc-}\beta\text{1,3]GalNAc-}\alpha\text{1,4-GalNAc-}\alpha\text{1,3-Bac}$, en la que Bac es 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxi-D-glucopiranososa.
- 5 2. Compuesto según la reivindicación 1, unido a un aminoácido u oligopéptido.
3. Compuesto según la reivindicación 2, en el que dicho aminoácido es la asparagina.
4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3 derivado de una glucoproteína aislada y purificada a partir de una bacteria *Campylobacter*.
5. Compuesto según la reivindicación 4, en el que dicha bacteria se selecciona de entre *C. jejuni* y *C. coli*.
- 10 6. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un portador fisiológicamente aceptable.
7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, que comprende además un conjugado inmunogénico.
8. Composición farmacéutica según la reivindicación 6 ó 7, que comprende además un inmunoestimulador.
- 15 9. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, para la utilización como vacuna en un animal o en un ser humano.
10. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, que se une específicamente al compuesto según la reivindicación 1.
11. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, que se une específicamente al compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 20 12. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, que se une específicamente al compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, derivado de un gen aislado a partir de un camélido.
13. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 12, en el que dicho camélido se selecciona de entre *Camelus bactrianus*, *Camelus dromaderius*, *Lama paccos*, *Lama ggglama* y *Lama vvicugna*.
- 25 14. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, y un portador fisiológicamente aceptable.
15. Composición farmacéutica según la reivindicación 14, para la utilización como agente terapéutico en un ser humano o en un animal.
- 30 16. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, para la utilización en la preparación de una composición para administrar en el ganado para reducir la presencia de patógenos *Campylobacter* en el ganado.
17. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según la reivindicación 16, en el que dicha administración consiste de alimentar al ganado con pienso en el que se ha mezclado dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.
- 35 18. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según la reivindicación 16 ó 17, en el que dicho ganado son aves
19. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, para la utilización en la preparación de una composición para prevenir las infecciones por *Campylobacter* causadas por patógenos *Campylobacter* en un ser humano, mediante la eliminación de dichos patógenos del ganado mediante la administración de dicha composición en dicho ganado.
- 40 20. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, para la utilización en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad causada por patógenos *Campylobacter* en un ser humano o en un animal.
- 45 21. Método para prevenir la contaminación del agua subterránea por patógenos *Campylobacter*, comprendiendo el método la reducción de la presencia de dichos patógenos en el ganado mediante la aplicación del compuesto según la reivindicación 16 para la utilización según la reivindicación 16.

- 22. Alimento o bebida animal para el ganado, que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13.
- 23. Alimento o bebida según la reivindicación 22, que comprende un aditivo que comprende dicho anticuerpo o fragmento.

5

- 24. Alimento según la reivindicación 23, que comprende una planta que contiene un genoma modificado para expresar dicho anticuerpo o fragmento.
- 25. Kit diagnóstico para detectar la presencia de *Campylobacter* en animales o seres humanos, comprendiendo dicho kit el anticuerpo o fragmento de anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13.

10

- 26. Kit diagnóstico para detectar la presencia de *Campylobacter* en una muestra, comprendiendo dicho kit el anticuerpo o fragmento de anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13.
- 27. Kit según la reivindicación 26, en el que dicha muestra se selecciona de entre agua, tierra y estiércol.

Figura 1

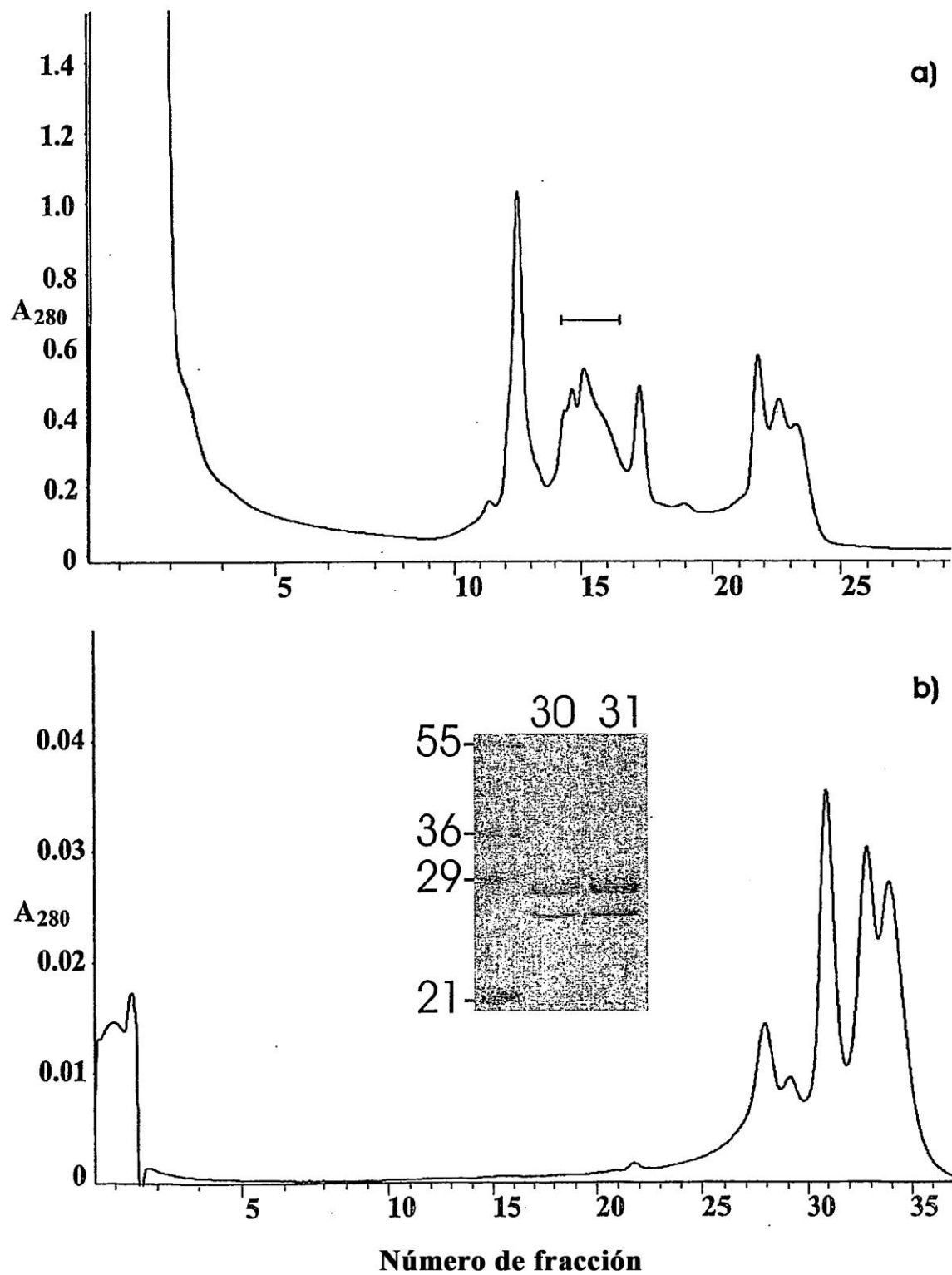


Figura 2

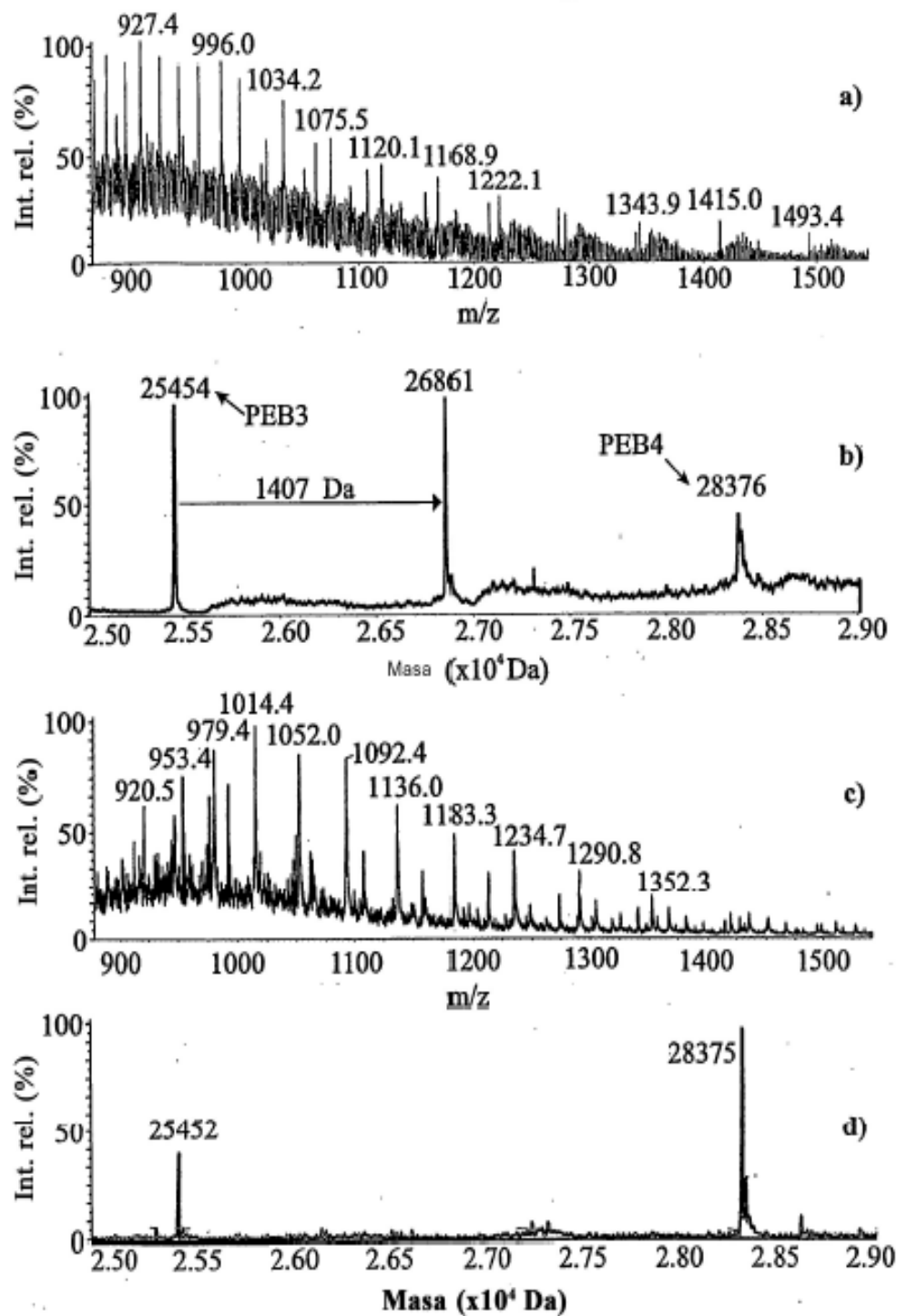
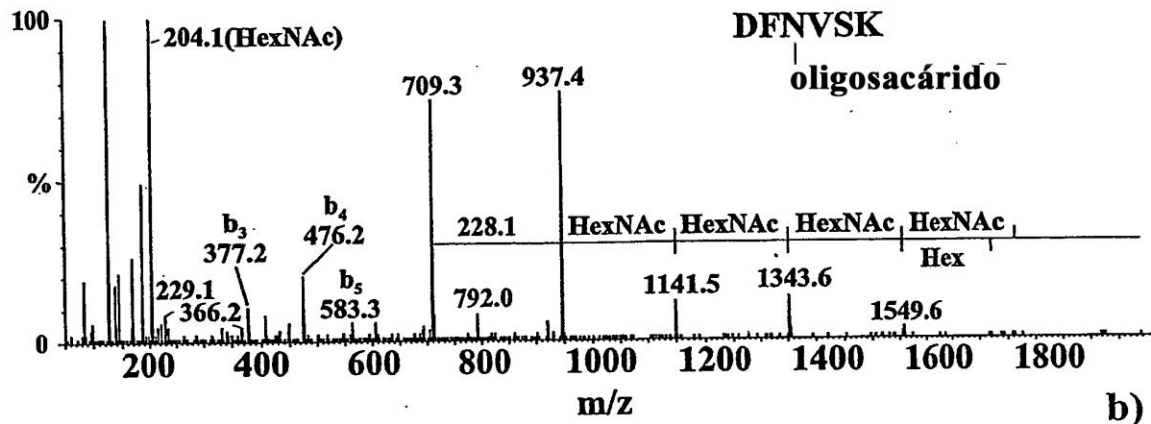


Figura 3

a)



b)

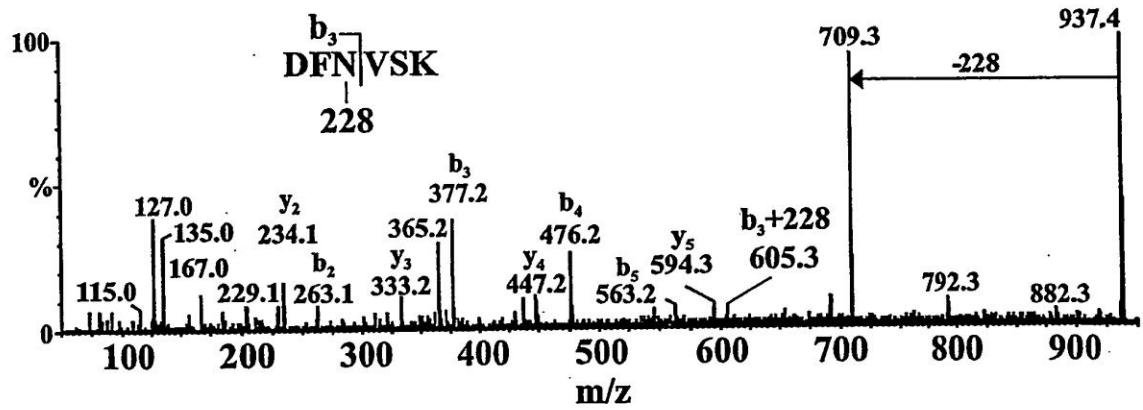


Figura 4

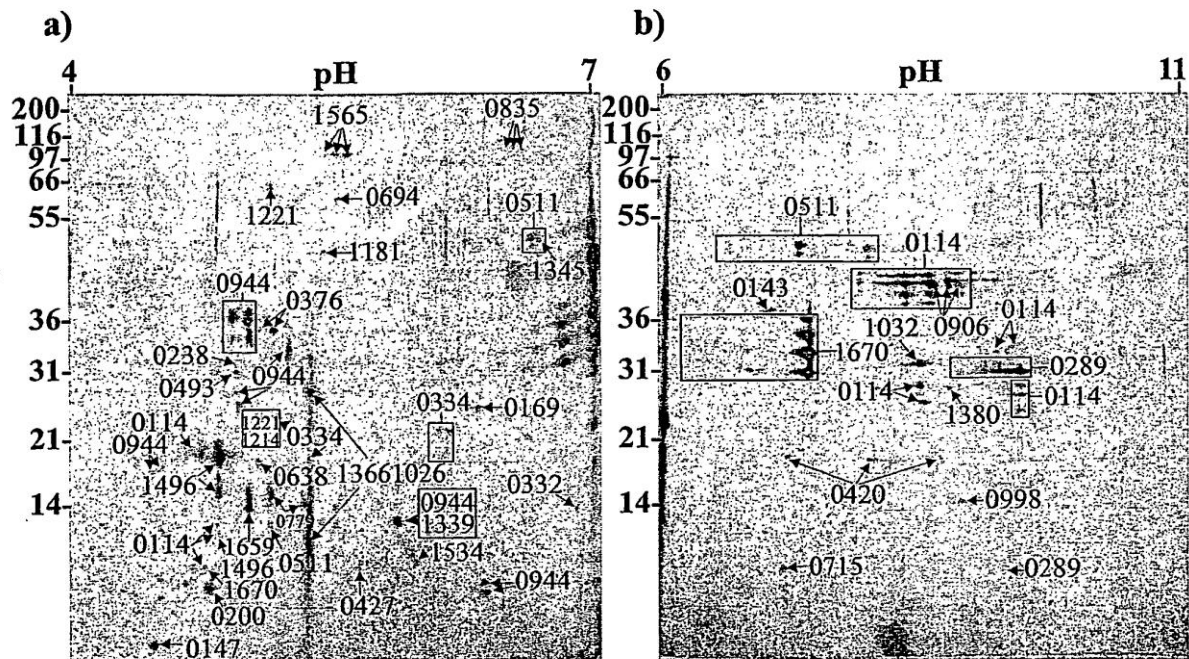


Figura 5

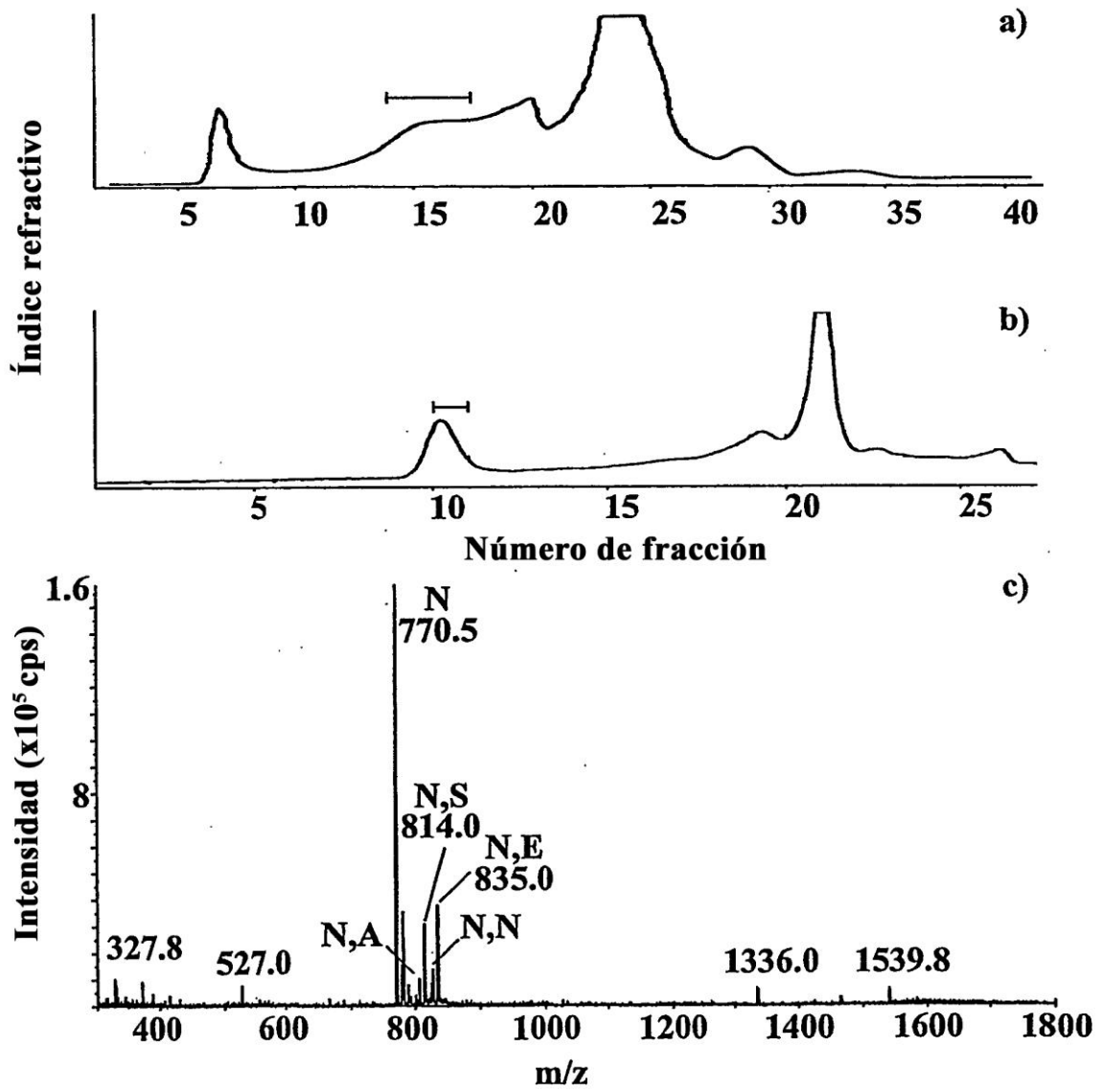


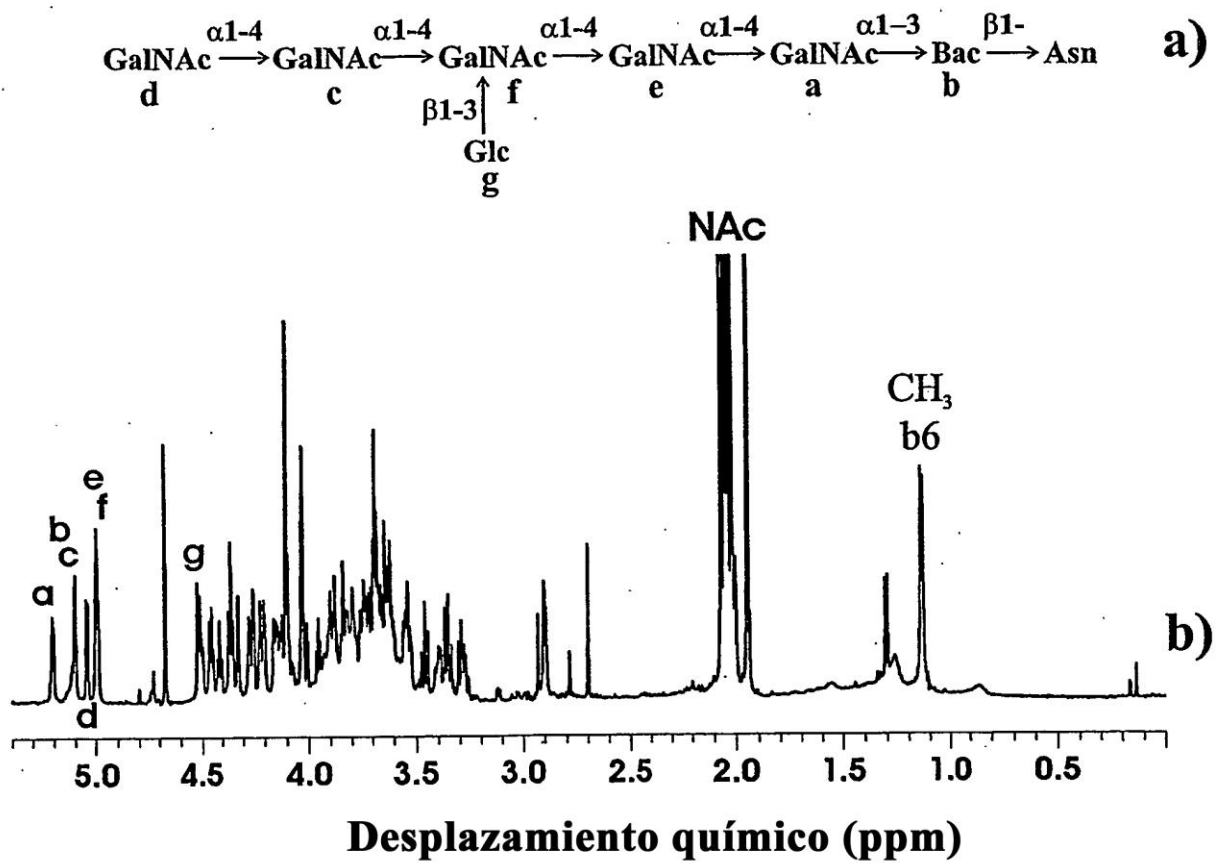
Figura 6

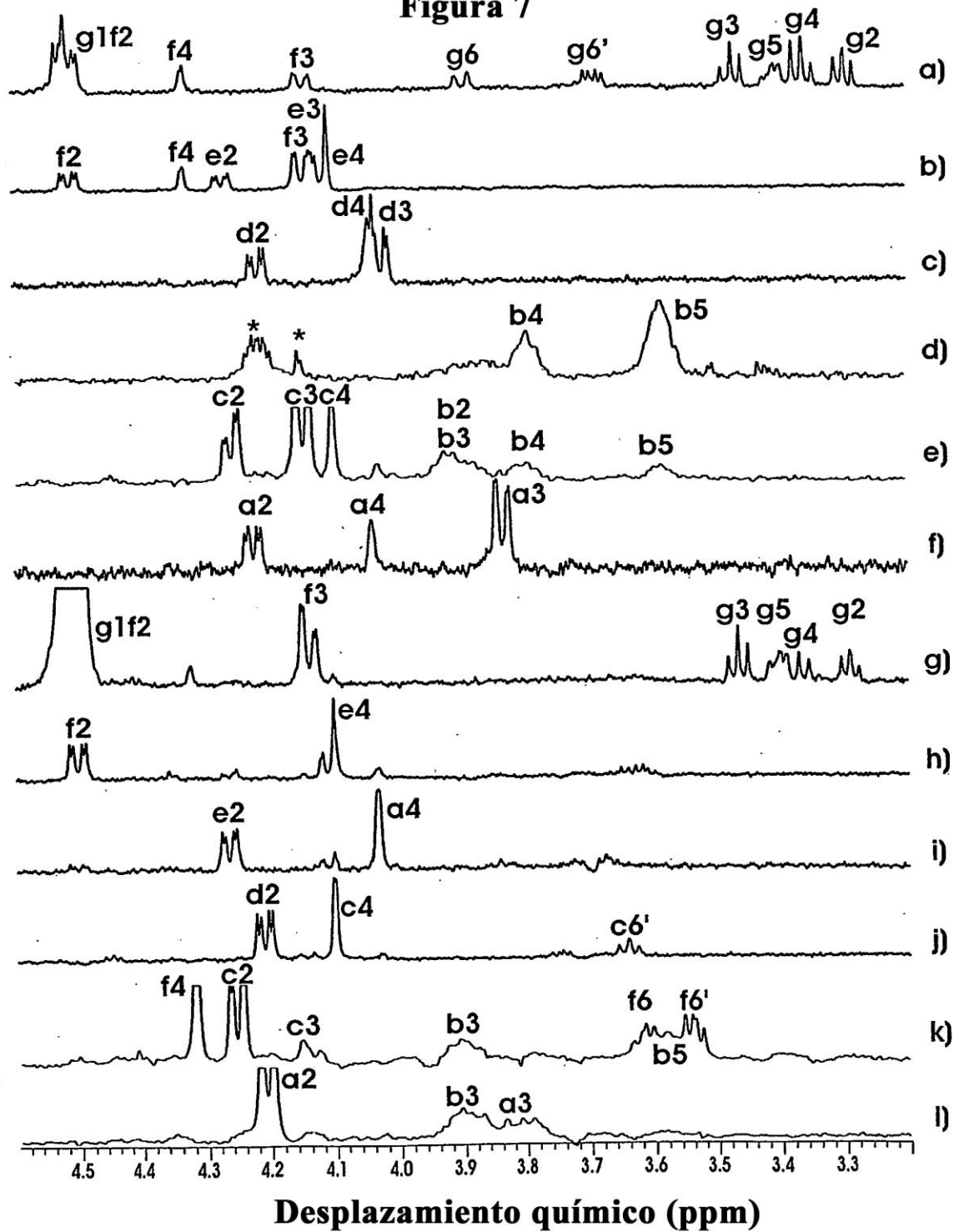
Figura 7

Figura 8

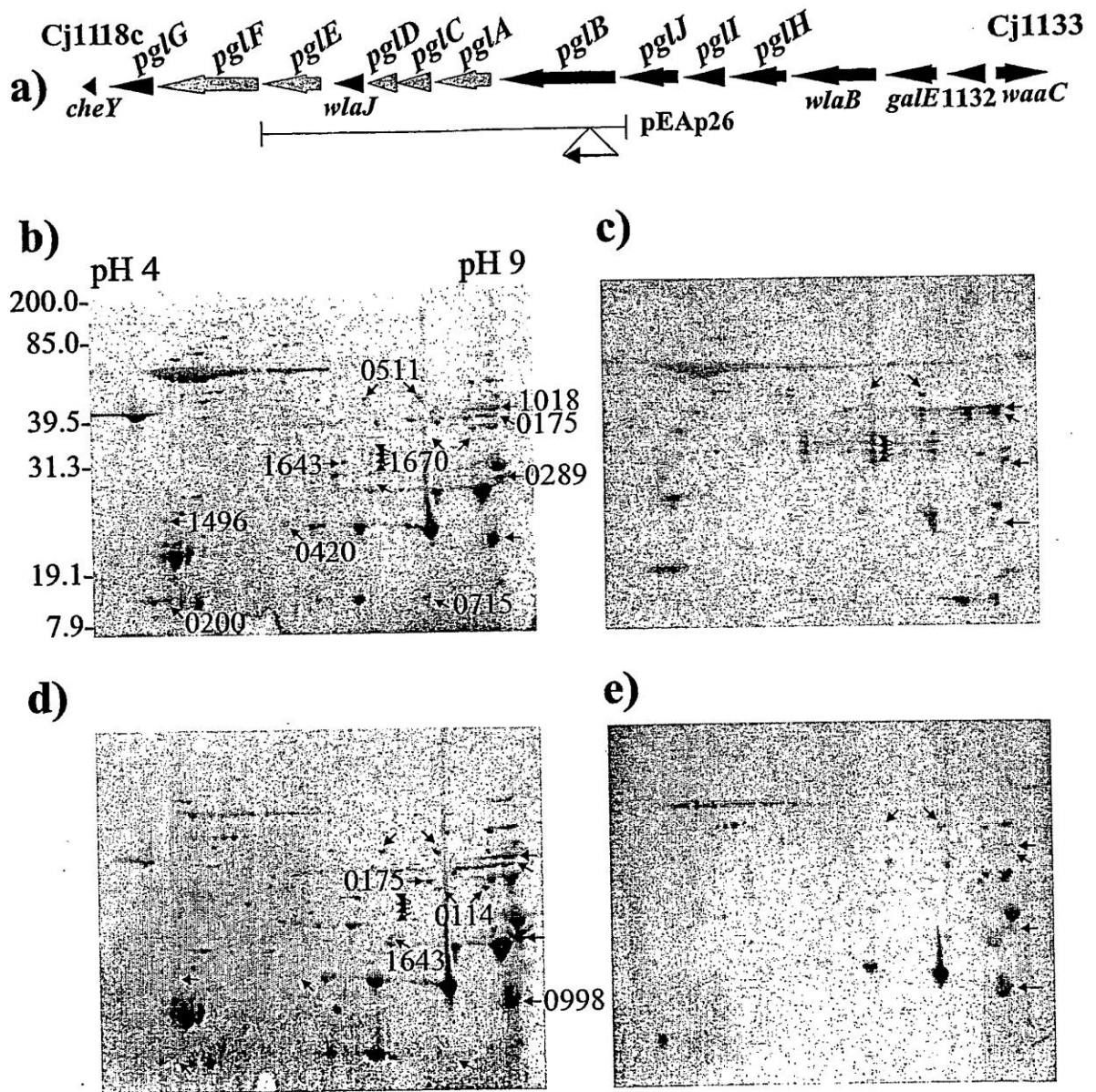


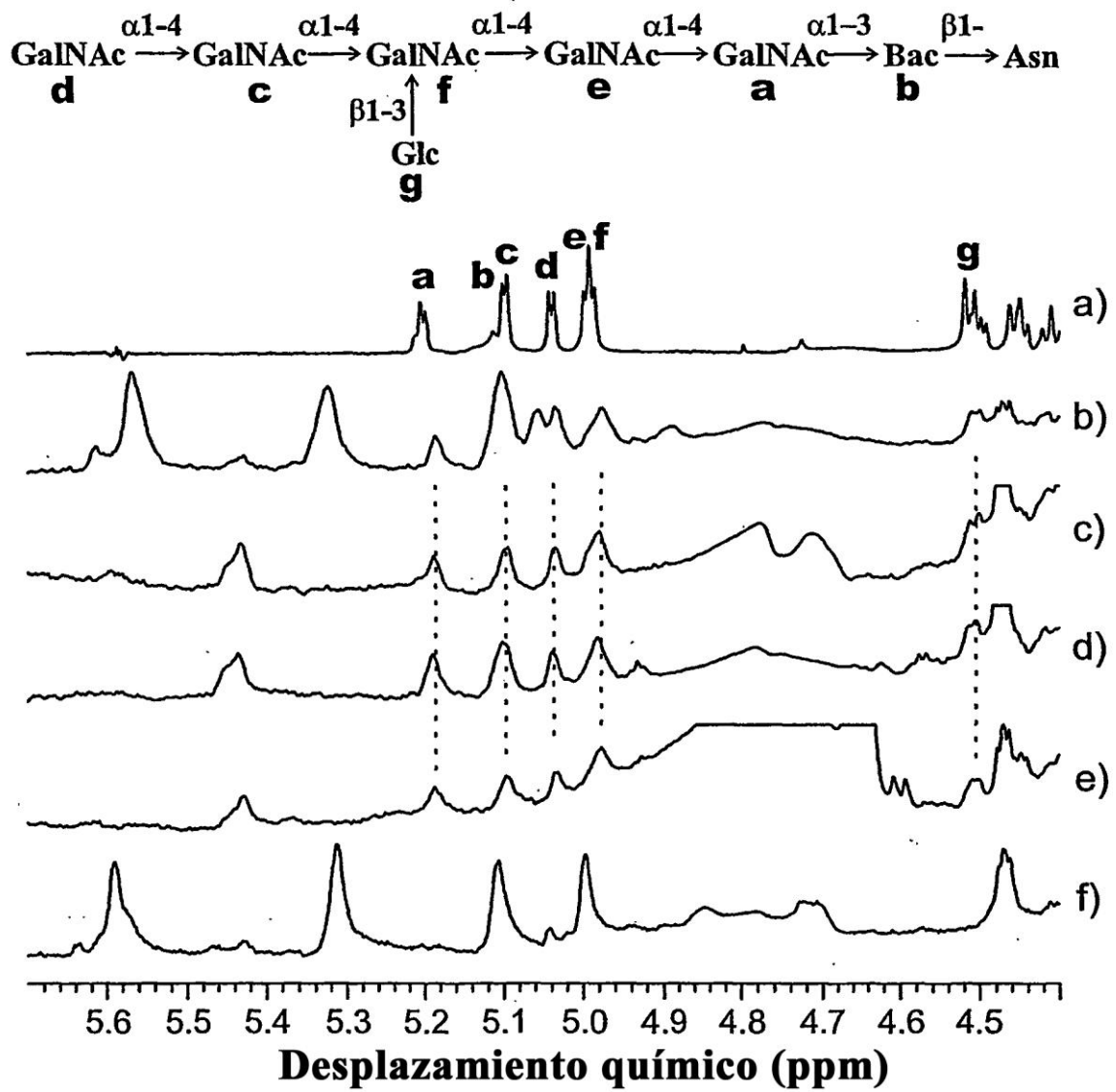
Figura 9

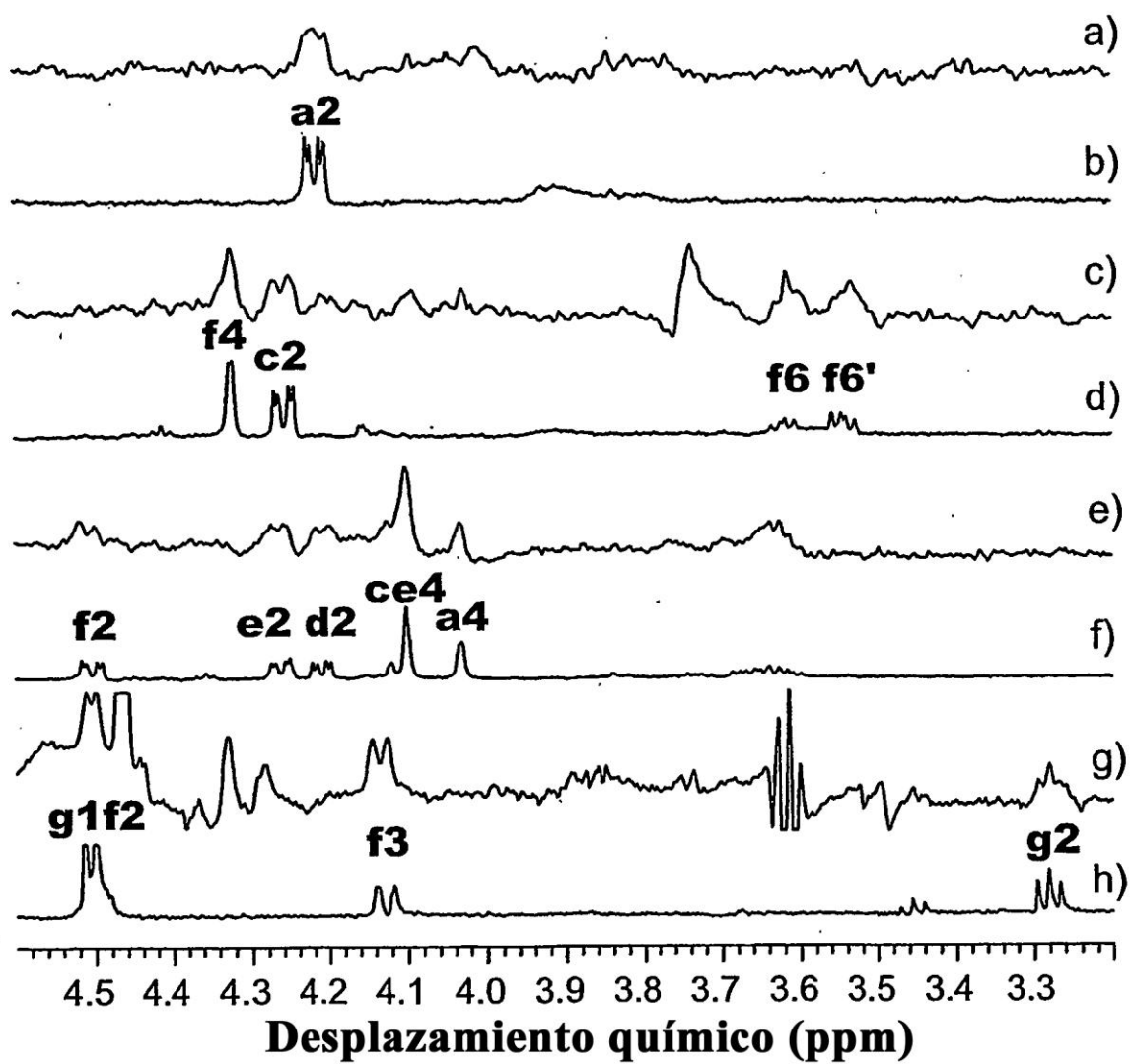
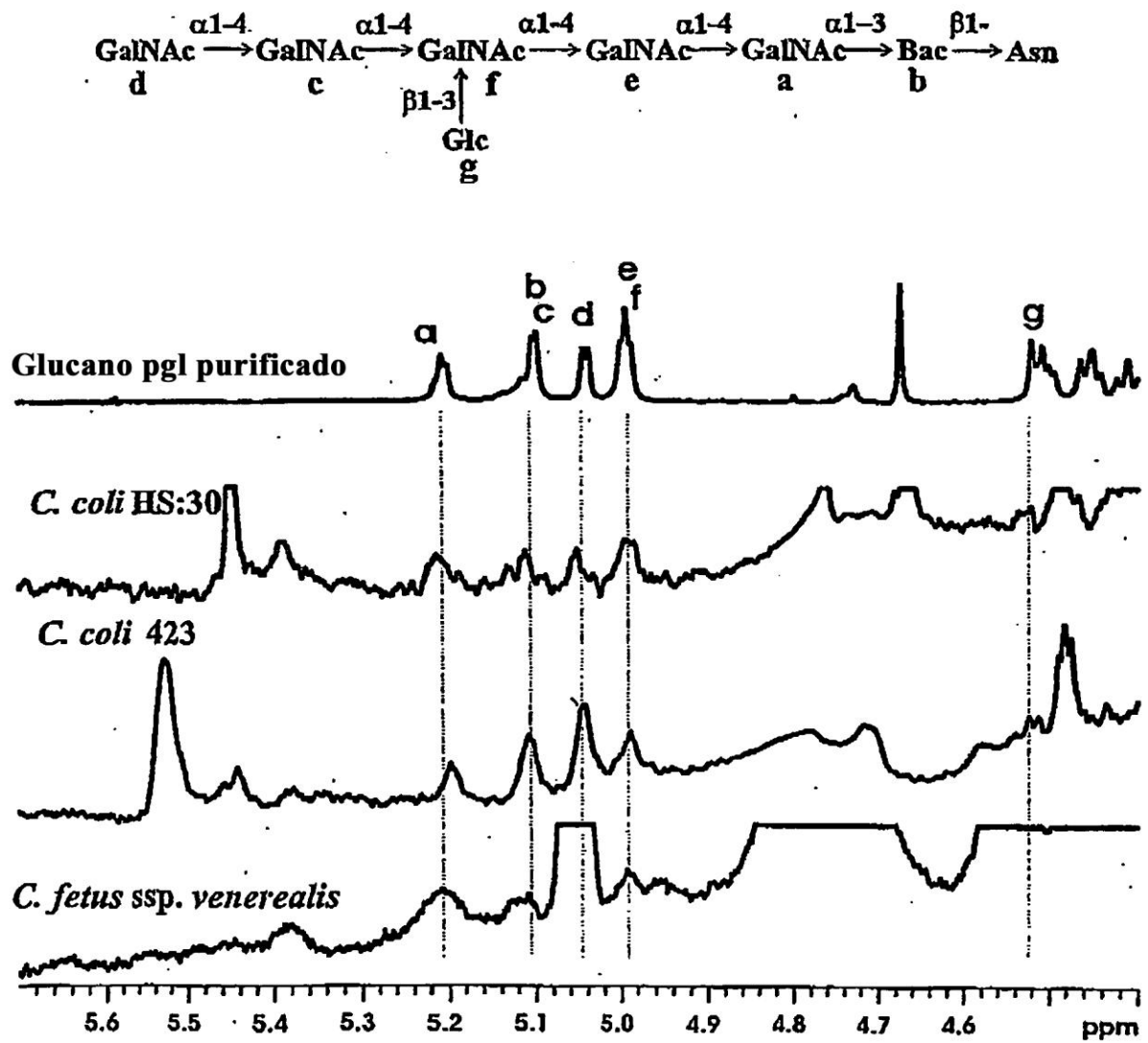
Figura 10

Figura 11



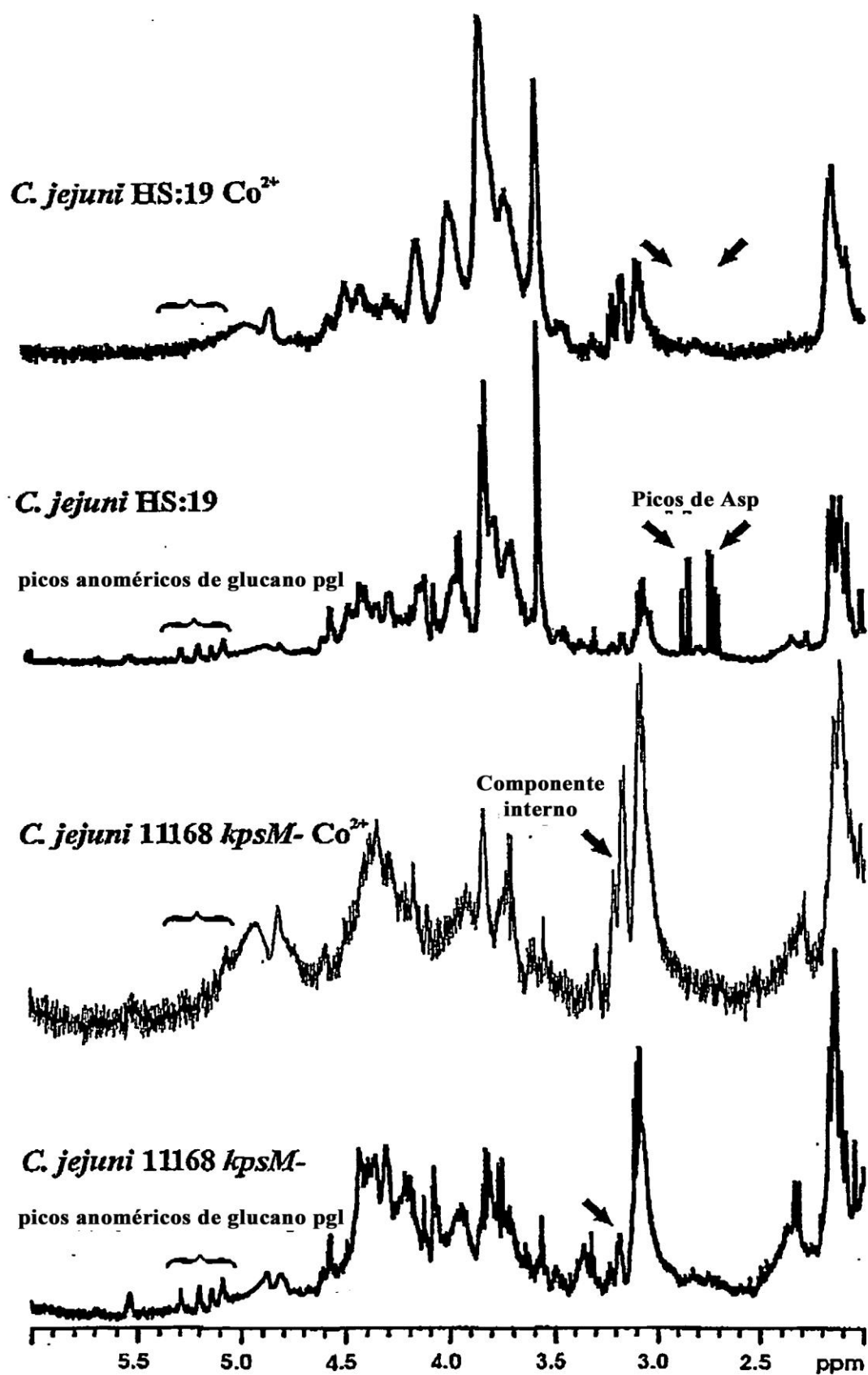


Figura 12