

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 543**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)
A61K 39/106 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
C07H 13/02 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
C07K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2011 E 11741801 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2545081**

54 Título: **Compuestos de glicano N-enlazado**

30 Prioridad:

11.02.2010 US 303411 P

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

12.05.2015

73 Titular/es:

**THE GOVERNORS OF THE UNIVERSITY OF ALBERTA (100.0%)
4000 Enterprise Square, 10230 Jasper Avenue
Edmonton, Alberta T5J 4P6, CA**

72 Inventor/es:

**SZYMANSKI, CHRISTINE y
NOTHAFT, HARALD**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 535 543 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos de glicano N-enlazado

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un compuesto de glicano *N*-enlazado de fórmula 1, que opcionalmente puede estar condensado o unido a un aminoácido, un péptido, una proteína o un lípido. La invención se refiere también a anticuerpos y a antiseros contra dicho compuesto, y a su uso para diagnosticar una infección provocada por un patógeno de *Campylobacter*. La invención se refiere también al uso del compuesto como una vacuna para tratar o prevenir una infección por un patógeno de *Campylobacter*.

Antecedentes

10 *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* son las dos especies de *Campylobacter* que se aislan con más frecuencia que provocan una infección en seres humanos. Estos organismos provocan una altas tasas de gastroenteritis en todo el mundo y, a menudo, el número de casos es mayor que para *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli* enterotoxigénica combinadas (Butzler J.P., Clinical Microbiology and Infection, 2004). Además, la infección por *C. jejuni* se ha relacionado con el desarrollo del síndrome de Guillain-Barré, la causa más común de parálisis
15 provocada por patógenos desde la erradicación de la polio (véanse los artículos: Kaida K., Glycobiology, 2009; Bereswill S. y Kist M., Current Opinion in Infectious Diseases, 2003). Otras especies de *Campylobacter* han sido reconocidas como patógenos emergentes en la gastroenteritis humana (*C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis*), han sido asociadas con la enfermedad del intestino inflamatoria en niños, con la gingivitis, la periodontitis y abortos en mujeres (*C. retus*, *C. concisus*) (Zhang L.S. *et al.*, Journal of Clinical Microbiology, 2009) y en la causa de
20 enfermedad venérea e infertilidad en ganado (en especial ganado vacuno; *C. fetus venerealis*), y abortos en ovejas (*C. fetus fetus*) (Butzler J.P., Clinical Microbiology and Infection, 2004, y las referencias citas allí).

Desde la publicación de la primera secuencia del genoma de *C. jejuni* en 2000 (Parkhill J. *et al.*, Nature, 2000), se han indicado varias otras secuencias genómicas de *Campylobacter*. A diferencia de la mayoría de las bacterias que se han descrito hasta la fecha, todas las *Campylobacter* contienen los genes *pgl* conservados necesarios para la
25 glicosilación de proteínas *N*-enlazadas (Szymanski C.M. y Wren B.W., Nature Reviews Microbiology, 2005; Nothhaft H. y Szymanski C.M., Nature Reviews Microbiology, 2010).

En eucariotas, las proteínas glicosiladas son componentes ubicuos de las matrices extracelulares y las superficies celulares. Sus restos oligosacáridos están implicados en una amplia gama de acontecimientos de reconocimiento entre células y entre células y matriz que son vitales en procesos biológicos que varían desde el reconocimiento
30 inmunológico hasta el desarrollo de cáncer. La glicosilación se ha considerado limitada a eucariotas, aunque debido a los avances en los métodos analíticos y la secuenciación genómica, cada vez existen más informes de vías de glicosilación de proteínas *O*-enlazadas y *N*-enlazadas en bacterias (Nothhaft H. y Szymanski C.M., Nature Reviews Microbiology, 2010). Desde el descubrimiento de la primera vía de glicosilación de proteínas general en bacterias (Szymanski C.M. *et al.*, Molecular Microbiology, 1999), la demostración de que los glicanos de *C. jejuni* se unen a
35 través de un *N*-enlace al unísono (Kelly J.H. *et al.*, Journal of Bacteriology, 2006; Wacker M. *et al.*, Science, 2002; Young N.M. *et al.*, Journal of Biological Chemistry, 2002) y de que la vía no solo puede transferirse funcionalmente a *Escherichia coli* (Wacker M. *et al.*, Science, 2002), sino que la enzima oligosacariltransferasa (PglB) es capaz de añadir azúcares extraños a proteínas (Feldman M. *et al.*, PNAS, 2005), se ha producido una oleada de actividad de investigación que ha dado como resultado una mayor caracterización y aprovechamiento de este sistema.

40 Se ha descrito la estructura detallada del heptasacárido exclusivo de *C. jejuni* *N*-enlazado (Young N.M. *et al.*, Journal of Biological Chemistry, 2002). Empleando métodos, tales como la RMN de giro alrededor del ángulo mágico de alta resolución (HR-MAS) (Szymanski C.M. *et al.*, Journal of Biological Chemistry, 2003), se ha demostrado que este heptasacárido está conservado, en estructura, en *C. jejuni* y *C. coli*.

Se ha descrito un intermedio en la vía de glicosilación *N*-enlazada de *C. jejuni*, concretamente un (oligo-)heptasacárido libre (fOS), un componente soluble del espacio periplásmico de *C. jejuni* (Liu X. *et al.*, Analytical
45 Chemistry, 2006). Este fOS tiene una estructura idéntica a la de los oligosacáridos *N*-enlazados añadidos a proteínas (Nothhaft H. *et al.*, PNAS, 2009). Bajo condiciones de crecimiento en laboratorio, la proporción de fOS frente a heptasacárido *N*-enlazado a proteínas es de aproximadamente 9:1. El fOS en *C. jejuni* desempeña un papel en la osmorregulación similar a los glucanos periplásmicos bacterianos, y esta vía puede manipularse alterando la
50 concentración de osmolitos del entorno (Nothhaft H. *et al.*, PNAS, 2009).

La figura 1 muestra la glicosilación de proteínas *N*-enlazadas y oligosacáridos libres en *C. jejuni*. El heptasacárido undecaprenil-pirofosfato-enlazado se ensambla en el citosol mediante la adición de azúcares activados por nucleótidos (Szymanski C.M. *et al.*, Journal of Biological Chemistry, 2003; Szymanski C.M. *et al.*, Trends
55 Microbiology, 2003). El heptasacárido completo es translocado a través de la membrana interna hacia el periplasma por el transportador ABC PglK (Alaimo C. *et al.*, EMBO Journal, 2006). El oligosacárido es transferido al grupo amino de la asparagina en la secuencia de proteína consenso D/E-X1-N-X2-S/T, en la que X1, X2 pueden ser cualquier aminoácido excepto prolina, por PglB (Kowarik M. *et al.*, EMBO Journal, 2006; Young N.M. *et al.*, Journal of Biological Chemistry, 2002). Además, pueden encontrarse grandes cantidades de heptasacárido libre (fOS) en *C.*

jejuni (Liu X. *et al.*, Analytical Chemistry, 2006); se ha determinado que la proporción de fOS a *N*-glicanos es de 9:1. GlcNAc, *N*-acetilgalactosamina; bacilosamina (Bac), 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxiglucosa; GalNAc, *N*-acetilgalactosamina; Glc, glucosa (adaptado de Szymanski C.M. *et al.*, Trends Microbiology, 2003).

Compendio

5 Los inventores han determinado las estructuras de *N*-glicanos y fOS de una serie de especies de *Campylobacter*, todas las cuales poseen glicanos *N*-enlazados y fOS. Además, los inventores han demostrado que los *N*-glicanos y fOS de *Campylobacter* pueden dividirse en dos grupos estructurales. El primer grupo produce una estructura similar a la publicada para *C. jejuni* y *C. coli* (Young N.M. *et al.*, Journal of Biological Chemistry, 2002; Szymanski C.M. *et al.*, Journal of Biological Chemistry, 2003). El segundo grupo produce una estructura de glicano exclusiva que se diferencia de la determinada para *C. jejuni* y *C. coli* y que nunca ha sido descrita. Las especies de *Campylobacter* incluidas en este grupo incluyen *Campylobacter fetus venerealis* (provoca enfermedad venérea en ganado vacuno), *Campylobacter fetus fetus* (provoca abortos en ovejas), *Campylobacter concisus* (asociado con la gingivitis y la periodontitis, y ha sido aislado a partir de heces de pacientes con gastroenteritis), *Campylobacter hyointestinalis* (al igual que *C. jejuni* y *C. coli*, está asociado con enfermedades diarreicas) y subespecies de *Campylobacter hyointestinalis*.

Se cree que *Campylobacter sputorum* y subespecies de *Campylobacter sputorum*, *Campylobacter lanienae*, *Campylobacter ureolyticus* (un patógeno entérico emergente que se ha sugerido que está implicado en la gastroenteritis, Bullman S. *et al.*, FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2010), *Campylobacter hominis*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus* (enfermedad periodontal y aborto en mujeres), *Campylobacter showae*, *Campylobacter mucosalis* y *Campylobacter curvus* pertenecen al segundo grupo.

La figura 2 ilustra un análisis filogenético de las secuencias de proteína del componente clave de esta vía, la oligosacaryltransferasa (PglB), que incluye especies de *Campylobacter* con genoma secuenciado y otros organismos relacionados, y demuestra que *Campylobacter* se divide en dos grupos. Dentro de *Campylobacter*, la rama de las especies que producen la estructura 1 está en el recuadro superior, y las cepas que producen la fórmula 1A y la fórmula 1B están en el recuadro inferior (adaptado de Nothaft H. y Szymanski C.M., Nature Reviews Microbiology, 2010).

La figura 3 ilustra la reactividad del *N*-glicano contra (A) un antisuero específico del *N*-glicano de *C. jejuni*, (B) SBA-lectina (que reconoce los restos GalNAc terminales de la estructura 1), (C) reactividad de WGA-lectina (que reconoce los restos GlcNAc terminales de fórmula 1A y 1B con reactividad cruzada con las estructuras GalNAc), y (D) análisis de fOS basado en la espectroscopía de masas que demuestra que los glicanos derivados de la vía *pgl* difieren entre las especies de *Campylobacter*.

Según un aspecto, la invención se refiere a un nuevo compuesto de glicano *N*-enlazado (denominado *N*-glicano) de fórmula 1: A-GlcNAc[GlcNAc]-GalNAc-GalNAc-QuiNAc4NAc, en la que A es GlcNAc o Glc. Este compuesto, en su forma nativa, es común a varias especies de *Campylobacter*. En su forma nativa, el compuesto es soluble en el periplasma, así como está unido a la membrana interna y a proteínas periplásmicas y, de forma más notable, a proteínas de la membrana externa de la superficie de muchas especies de *Campylobacter*, incluyendo las patógenas. En la presente invención, el compuesto de fórmula 1 se proporciona en forma aislada y/o purificada. El compuesto comprende dos hexasacáridos que se diferencian entre sí en un azúcar terminal, que comprende Glc o GlcNAc. El primero de dichos compuestos es: GlcNAc-GlcNAc[GlcNAc]-GalNAc-GalNAc-QuiNAc4NAc (en la presente, la fórmula 1A). El segundo de dichos compuestos es: Glc-GlcNAc[GlcNAc]-GalNAc-GalNAc-QuiNAc4NAc (en la presente, la fórmula 1B).

En la anterior fórmula 1, QuiNAc4NAc representa un significante alternativo del sacárido Bac, que constituye una abreviatura de bacilosamina.

En un aspecto, la invención se refiere a un compuesto aislado o purificado que comprende los compuestos de fórmula 1 conectados o enlazados a un único aminoácido, un oligopéptido, un péptido, una proteína o un lípido. En un aspecto, el oligopéptido o péptido comprenden entre 2 y 40 aminoácidos, o entre 2 y 30 aminoácidos, o entre 2 y 20 aminoácidos, o entre 2 y 10 aminoácidos.

La invención se refiere también a un método para producir un anticuerpo o un antisuero que comprende las etapas de proporcionar el compuesto de fórmula 1, inocular a un animal o a un ser humano con dicho compuesto para estimular una respuesta inmunológica contra dicho compuesto, extraer el suero de dicho animal y opcionalmente purificar dicho suero para obtener el anticuerpo o el antisuero. El anticuerpo o el antisuero resultante se une a especies de *Campylobacter* en las que el glicano descrito en la presente es nativo, que incluyen *Campylobacter fetus venerealis*, *Campylobacter fetus fetus*, *Campylobacter concisus*, *Campylobacter hyointestinalis* y subespecies de *Campylobacter hyointestinalis*, *Campylobacter sputorum* y subespecies de *Campylobacter sputorum*, *Campylobacter lanienae*, *Campylobacter ureolyticus*, *Campylobacter hominis*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter mucosalis* y *Campylobacter curvus*.

El anticuerpo o el antisuero pueden emplearse para objetivos de diagnóstico, para detectar la presencia de dichos organismos en un animal o en un ser humano.

Los compuestos de la presente invención pueden emplearse en una formulación de vacuna, con o sin un adyuvante, contra *Campylobacter fetus venerealis*, que es una causa importante del fracaso reproductivo en ganado vacuno y para el cual la actual vacuna tienen un uso limitado, o contra otras especies de *Campylobacter*, en las que el glicano de fórmula 1 es nativo a dicho organismo, que incluyen las especies listadas anteriormente. Los compuestos de la presente invención tienen usos posibles en aplicaciones de modificación de glicoproteínas, terapéuticas y diagnósticas. Por tanto, la invención se refiere a una vacuna que comprende el compuesto de fórmula 1, opcionalmente conectado o enlazado a un único aminoácido, un oligopéptido, un péptido, una proteína o un lípido. El único aminoácido puede comprender asparagina.

La invención se refiere también al uso de dicha vacuna para tratar o prevenir una infección provocada por un organismo de *Campylobacter*, en el que el compuesto de fórmula 1 comprende un glicano nativo dentro de dicho organismo, y a un método de tratamiento que comprende dicho uso, dentro de un ser humano o un animal.

Según otro aspecto, la invención se refiere a un método para mejorar la productividad y la salud de un rebaño de animales mediante la administración a dicho rebaño de la vacuna según se describió anteriormente.

Las vacunas, los anticuerpos y los antisueros descritos en la presente también pueden emplearse para la prevención, el tratamiento y el diagnóstico en seres humanos.

Descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la glicosilación de proteínas *N*-enlazadas y los oligosacáridos libres en *C. jejuni*.

La figura 2 es un diagrama que resume las estructuras de fOS y de *N*-glicanos en diversas especies de *Campylobacter*.

Las figuras 3A-3D muestran análisis de *N*-glicanos y fOS en especies de *Campylobacter* seleccionadas.

La figura 4A es el espectro de RMN de ¹H de fOS purificado a partir de *C. fetus fetus*.

La figura 4B es un solapamiento de espectros de RMN de HSQC bidimensionales para *C. fetus fetus* y *C. fetus venerealis*.

La figura 5 muestra las estructuras de fOS y *N*-glicanos de *C. jejuni*, *C. coli* y *C. upsaliensis* (estructura 1), y de la fórmula 1A y la fórmula 1B de las otras especies de *Campylobacter* descritas en la presente.

La figura 6 muestra los perfiles de elución de la fórmula 1A y la fórmula 1B, bajo las condiciones descritas en la presente, y la confirmación de la fórmula 1A y la fórmula 1B purificadas.

La figura 7 ilustra la conjugación de los compuestos de fórmula 1A y fórmula 1B purificados con BSA.

La figura 8 ilustra inmunotransferencias con antisueros generados contra cada uno de los glicoconjugados-BSA.

Las figuras 9A-F muestran los espectros de MS de glicopéptidos que comprenden compuestos de fórmula 1 como el resto glicano.

La figura 10 muestra células de *Campylobacter* que han sido marcadas con antisuero específico de la fórmula 1A y la fórmula 1B.

La figura 11 ilustra inmunotransferencias con antisueros generados contra la fórmula 1A, la fórmula 1B y la estructura 1.

Descripción detallada

La presente invención se refiere al compuesto de glicano A-GlcNAc[GlcNAc]-GalNAc-GalNAc-QuiNAc4NAc, en el que A es GlcNAc o Glc. El anterior compuesto incluye los dos compuestos de glicano GlcNAc-GlcNAc[GlcNAc]-GalNAc-GalNAc-QuiNAc4NAc (en la presente la fórmula 1A) y Glc-GlcNAc[GlcNAc]-GalNAc-GalNAc-QuiNAc4NAc (en la presente la fórmula 1B).

En las anteriores fórmulas, QuiNAc4NAc representa un significativo alternativo del sacárido Bac, que constituye una abreviatura de bacilosamina (también denominada diNAcBac). El compuesto de fórmula 1 está opcionalmente conectado o enlazado a un único aminoácido, un oligopéptido, un péptido, una proteína o un lípido.

Dicho lípido puede aislarse y purificarse de una fuente bacteriana, arqueobacteriana o eucariota, o puede sintetizarse químicamente. Dicho enlace del compuesto de glicano al lípido puede estar mediado por un fosfato, un conector de pirofosfato o un enlace glicosídico. Se han descrito ejemplos de lípidos (con diversas longitudes de cadena, grado de saturación y configuración) enlazados a *N*-glicanos (Faridmoayer *et al.*, Journal of Biological Chemistry, 2009; Chen M.M. *et al.*, Biochemistry, 2007). Los compuestos de *N*-glicanos enlazados a lípidos producidos en el hospedante nativo o en un sistema de expresión heterólogo incluyen compuestos de *N*-glicanos undecaprenil-fosfato-enlazados, tal como se muestra para el *N*-glicano de *C. jejuni* (Reid C.W. *et al.*, Analytical

Chemistry, 2008, Reid C.W. *et al.*, Analytical Chemistry, 2009) y propuesto para el *N*-glicano de *C. lari* (Schwarz F. *et al.*, Glycobiology 2011) y conjugados de *N*-glicano-lípido A (demostrado para el *N*-glicano de *C. jejuni* (van Sorge N.M. *et al.*, Cellular Microbiology, 2009).

5 Se ha determinado que el anterior compuesto está sustancialmente conservado a través de múltiples especies de *Campylobacter*.

10 Las figuras 3A-3D muestran *N*-glicanos y fOS en especies seleccionadas de *Campylobacter*. (A) Transferencia Western que emplea un antisuero que reconoce el heptasacárido *N*-enlazado de *C. jejuni* que ha reaccionado con reactividad cruzada con otras especies de *Campylobacter* (recuadros blancos) que también reaccionaron con (B) aglutinina de soja que reconoce los restos GalNAc terminales, pero que muestran poca reactividad con (C) aglutinina de germen de trigo (WGA) que reconoce los restos GlcNAc terminales presentes en la fórmula 1A y la fórmula 1B. Se destacan las especies que no reaccionan con el antisuero específico de *C. jejuni*, pero que sí reaccionan con WGA. (D) Ejemplos de la espectrometría de masas de fracciones enriquecidas en fOS o Asn-enlazadas de (1) *C. jejuni*, (2) *C. fetus venerealis*, (3) *C. concisus*, (4) *C. fetus fetus*, y (5) *C. hyointestinalis*; los resultados de todas las especies analizadas mediante espectrometría de masas se resumen en la tabla 1.

15 Tabla 1

MS-MS ² (m/z)		
Especies de <i>Campylobacter</i>	Oligosacárido libre (fOS)	Glicano <i>N</i> -enlazado
<i>C. jejuni</i>	GalNAc5-Glc-Bac (1425,0)	HexNAc5-Hex-Bac-Asn (1539,5)
<i>C. coli</i>	HexNAc5-Hex-Bac (1425,0)	N/D
<i>C. upsaliensis</i>	HexNAc5-Hex-Bac (1425,0)	N/D
<i>C. fetus fetus</i>	HexNAc5-Bac (1263,5) Formula 1A HexNAc4-Glc-Bac (1222,5) Fórmula 1B	HexNAc5-Bac-Asn (1377,5) Formula 1A-Asn(N)-enlazado Sobre un péptido: HexNAc5-Bac-Asn Formula 1A-Asn(N)-enlazado Hex-HexNAc4-Bac-Asn Formula 1B-Asn(N)-enlazado
<i>C. fetus venerealis</i>	HexNAc5-Bac (1263,5) Formula 1A HexNAc4-Hex-Bac (1222,5) Fórmula 1B	Sobre un péptido: HexNAc5-Bac-Asn Formula 1A-Asn(N)-enlazado Hex-HexNAc4-Bac-Asn Formula 1B-Asn(N)-enlazado
<i>C. concisus</i>	HexNAc5-Bac (1263,5) Formula 1A HexNAc4-Hex-Bac (1222,0) Fórmula 1B	Sobre un péptido: HexNAc5-Bac-Asn Formula 1A-Asn(N)-enlazado Hex-HexNAc4-Bac-Asn Formula 1B-Asn(N)-enlazado
<i>C. hyointestinalis</i>	HexNAc5-Bac (1263,5) Formula 1A HexNAc4-Hex-Bac (1222,0) Fórmula 1B	N/D

20 Tabla 1. Masas de las estructuras de fOS y de *N*-glicanos determinadas mediante espectroscopía de masas en cepas de *Campylobacter* seleccionadas. Los números indican la masa o masas de fórmula 1A y fórmula 1B, como el oligosacárido libre (fOS) o Asn-enlazado. Las masas se obtuvieron en el modo de ion positivo a partir de lisados de células completas de la cepa indicada. Las estructuras de la fórmula 1A y la fórmula 1B se determinaron mediante RMN, tal como se muestra en la figura 4, la tabla 3 y la figura 5. N/D, no determinado.

Ejemplo 1: Purificación de los compuestos de fórmula 1A y 1B

25 Se cultivaron *Campylobacter jejuni* 11168, *C. concisus*, *C. hyointestinalis*, *C. fetus fetus* y *C. fetus venerealis* bajo condiciones microaerobias. Las células completas obtenidas después de una centrifugación se digirieron con un gran exceso de proteinasa K a pH 8 (ajustado mediante la adición de amoniaco) a 37 °C durante 48 horas. Los productos de la digestión o los oligosacáridos libres se separaron en una columna de Sephadex G-15 (1,5 x 60 cm) y

5 cada fracción que eluye antes del pico salino se secó y se analizó mediante RMN de ^1H . Las fracciones que contenían los productos deseados se separaron mediante una cromatografía de intercambio aniónico sobre una columna Hitrap Q (tamaño 5 ml, Amersham) y los glicanos se eluyeron con un gradiente lineal de NaCl (0-1 M, 1 h) que dio como resultado el aislamiento de una mezcla de ambos compuestos de glicano (fórmula 1A y fórmula 1B). La desalación se realizó sobre Sephadex G15 antes del análisis mediante RMN.

Ejemplo 2: Análisis de espectroscopía de RMN

10 Los experimentos de RMN sobre los glicanos obtenidos en el ejemplo 1 se realizaron en un espectrómetro Varian INOVA 500 MHz (^1H) con una sonda de gradiente de 3 mm a 25 °C con acetona como referencia interna (2,225 ppm para ^1H y 31,45 ppm para ^{13}C) utilizando las secuencias de pulso patrón DQCOSY, TOCSY (tiempo de mezclado 120 ms), ROESY (tiempo de mezclado 500 ms), HSQC y HMBC (100 ms de retraso de transferencia de intervalo largo). El tiempo AQ se mantuvo a 0,8-1 sg para las correlaciones H-H y 0,25 sg para HSQC, y los incrementos de 256 se adquirieron para t1. Los resultados se muestran en la figura 4, figura 5 (espectros de RMN y estructuras) y la tabla 2, que se corresponde con los desplazamientos químicos.

15 La figura 4A es el espectro de RMN de ^1H de fOS purificado de *C. fetus fetus*. La figura 4B es un solapamiento de espectros de RMN de HSQC bidimensionales para *C. fetus fetus* y *C. fetus venerealis*, que indica que las estructuras de fOS de ambas especies son idénticas. El espectro de RMN también puede solaparse con uno obtenido para *C. concisus* (no se muestra). Los correspondientes desplazamientos químicos δ (ppm) para el oligosacárido libre purificado de *C. fetus fetus* (tal como se muestra en la figura 4A) se resumen en la tabla 2. Los desplazamientos químicos de carbono y protón se referencian a un patrón interno de acetona (δH 2,225 ppm, δC 31,07 ppm).

20 Los glicanos de *Campylobacter* que se añaden a las proteínas o que aparecen en forma libre (fOS) pueden dividirse en dos grupos estructurales. El primer grupo de especies de *Campylobacter* produce una estructura exclusiva de glicano que ha sido previamente determinada para *C. jejuni* y *C. coli*, y en la presente para *C. upsaliensis*. Las *Campylobacter* que pertenecen al segundo grupo consisten en *Campylobacter fetus venerealis* (provoca enfermedad venérea e infertilidad en ganado vacuno), *Campylobacter fetus fetus* (provoca abortos en ovejas), *Campylobacter concisus*, *Campylobacter hyointestinalis*, subespecies de *Campylobacter hyointestinalis*, *Campylobacter sputorum* y subespecies de *Campylobacter sputorum*, *Campylobacter lanienae*, *Campylobacter ureolyticus*, *Campylobacter hominis*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter mucosalis* y *Campylobacter curvus*.

30 La determinación de la estructura mediante RMN empleando oligosacáridos libres (fOS) purificados a gran escala a partir de *C. fetus fetus*, *C. fetus venerealis*, y *C. concisus* demuestra que este segundo grupo de *Campylobacter* produce una estructura diferente de la descrita originariamente para *C. jejuni* y *C. coli* (figura 4 y figura 5).

Tabla 2

Unidad, compuesto	Átomo	1	2	3	4	5	6 (6a)	6b
α -QuiNAc4NAc α -A	^1H	5,14	4,07	4,00	3,80	3,97	1,14	
	^{13}C	92,2	54,3	73,3	58,3	68,0	17,6	
α -QuiNAc4NAc β -A	^1H	4,73	3,78	3,81	3,80	3,54	1,17	
	^{13}C	95,6	57,2	75,9	58,3	72,3	17,6	
α -GalNAc B	^1H	5,21	4,23	3,83	4,05	3,89	37,0	3,75
	^{13}C	98,0	50,7	68,0	77,5	72,6	60,9	
α -GalNAc C	^1H	5,00 5,02	4,28	4,14	4,08	4,37	3,59	3,64
	^{13}C	99,4	51,4	67,7	77,6	72,3	60,5	
α -GlcNAc D	^1H	4,90	4,05	3,95	3,76	4,33	3,57	4,01
	^{13}C	99,4	54,2	80,0	69,3	71,9	65,8	
α -GlcNAc E	^1H	4,58	3,70	3,59	3,48	3,48	3,77	3,93
	^{13}C	102,5	57,0	74,6	71,1	77,0	61,8	
α -GlcNAc F	^1H	4,93	3,92	3,78	3,50	3,75	3,79	3,85

	¹³ C	98,1	54,9	72,3	71,2	73,1	61,7	
α-GalNAc C'	¹ H	5,00	4,28	4,14	4,10	4,37	3,59	3,64
	¹³ C	99,4	51,4	67,7	77,7	72,3	60,5	
α-GlcNAc D'	¹ H	4,97	4,16	3,97	3,75	4,34	3,57	4,01
	¹³ C	99,5	54,1	81,7	69,3	71,9	65,8	
β-Glc G	¹ H	4,53	3,29	3,51	3,42	3,48	3,74	3,91
	¹³ C	104,3	74,2	76,8	70,6	76,8	61,7	

Tabla 2: Desplazamientos químicos δ(ppm) para los oligosacáridos libres purificados (fórmula 1A y fórmula 1B) procedentes de *C. fetus fetus* (para el espectro mostrado en la figura 4A). Los desplazamientos químicos de carbono y protón se refieren a un patrón interno de acetona (δH 2,225 ppm, δC 31,07 ppm). Las letras mayúsculas se refieren a los restos azúcar individuales según se resume en las figuras 4A y 5.

Ejemplo 3: Preparación del glicano de los compuestos de fórmula 1 enlazado a un único aminoácido

Un digerido con Pronase E de extractos de células completas obtenido después de la lisis de células intactas, seguido de un espectrometría de masas, según se describe en Liu X. *et al.*, *AnalChem*, 2005, y en Nothhaft H. *et al.*, *Methods Mol. Biol.*, 2010, identificó el heptasacárido de *C. jejuni* (estructura 1) enlazado a un única asparagina, y la fórmula 1 enlazada a una única asparagina en *C. fetus fetus* (tabla 1).

Ejemplo 4: Expresión de los compuestos de fórmula 1

El operón de glicosilación de proteínas que codifica todos los genes necesarios para la producción y la transferencia de los compuestos de fórmula 1A y fórmula 1B puede clonarse y expresarse a partir de un plásmido o plásmidos de *E. coli*. Como alternativa, las glicosiltransferasas sobre un plásmido descrito por Wacker *et al.*, *Science*, 2002, que contiene el operón de glicosilación de proteínas (*pgl*) de *C. jejuni* puede intercambiarse por glicosiltransferasas que producen la fórmula 1A y la fórmula 1B. La expresión de los compuestos de fórmula 1A y fórmula 1B puede realizarse en un sistema heterólogo en presencia de un péptido aceptor marcado por afinidad para la glicosilación de proteínas N-enlazadas (que ya se ha demostrado para el N-glicano de *C. jejuni* y para el N-glicano de *C. lari*; Wacker *et al.*, *Science*, 2002; Schwarz *et al.*, *Glycobiology*, 2011) o como una fusión de dicha proteína con una proteína de fago (Duerr *et al.*, *Glycobiology*, 2010). La proteína/péptido/fago que contiene el glicano puede purificarse mediante una purificación con un marcador de afinidad, si es necesario en combinación con una cromatografía de afinidad con un agente que reconoce el glicano o lectina, para separar los péptidos glicosilados y no glicosilados.

Ejemplo 5: Purificación de la fórmula 1A y la fórmula 1B

El fOS de fórmula 1A y fórmula 1B purificado se separó mediante una cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica pulsada (HPAEC/PAD). La figura 6 muestra el perfil de elución de una columna analítica CarboPac® PA200 (3 x 250 mm, CarboPac PA100 equipado con una columna de guarda: 3 x 50 mm) bajo las siguientes condiciones. caudal: 0,5 ml/min; sistema eluyente, acetato de sodio 50 mM en hidróxido de sodio 100 mM; modo de detección, amperometría pulsada, forma de onda cuádruple, electrodo de Au; la temperatura ambiente de la columna se ajustó a aproximadamente 30 °C (figura 6A). Aproximadamente 0,5 nmoles de una mezcla de fórmula 1A y fórmula 1B (figura B), o de fórmula 1B y fórmula 1A después de una separación (figura 6C) empleando una columna semipreparativa PA 100 (9 x 250 mm) y un colector de fracciones (DIIONEX UltiMate 3000) bajo las mismas condiciones que las indicadas anteriormente, se analizaron mediante HPAEC/PAD. Las fracciones que contenían la fórmula 1A o la fórmula 1B se neutralizaron con cantidades equimolares de HCl 0,2 M y se conservaron a -20 °C. Los espectros obtenidos mediante espectrometría de masas de ionización de electropulverización (ESI-MS) de la fórmula 1A (figura 6D) y la fórmula 1B (figura 6E) purificadas después de la purificación se corresponden con las masas observadas de fórmula 1A y fórmula 1B según se indica en la tabla 1.

Ejemplo 6: Conjugación de la fórmula 1A y la fórmula 1B con BSA

Los compuestos de fórmula 1A y 1B purificados y neutralizados preparados en el ejemplo 5 se conjugaron con BSA mediante una aminación reductora (véase Gildersleeve J.C., *Bioconjug. Chem.*, 2008). Una mezcla de albúmina de suero bovina (BSA, 2 µl de una disolución 150 mg/ml, fracción V), borato de sodio (5,5 µl de una disolución 400 mM, pH 8,5), sulfato de sodio (3,7 µl de una disolución 3 M, 50 °C), oligosacárido (fórmula 1A o fórmula 1B) (7,0 µl de una disolución 20 mM para 15 eq.), H₂O (1,4 µl) y cianoborohidruro de sodio (2,2 µl de una disolución 3 M) se incubó en un tubo de PCR de 200 µl en un termociclador de PCR a 56 °C durante 96 h con una tapa calentada. La reacción se diluyó con H₂O hasta un volumen final de 100 µl, se trasladó a un tubo de diálisis de 500 µl (corte de peso molecular 10.000) y se dializó tres veces contra H₂O (2,5 l).

La figura 7 muestra la conjugación de la fórmula 1A y la fórmula 1B a BSA: los glicoconjugados se separaron mediante PAGE al 12,5% (A) y se controlaron mediante una transferencia Western empleando WGA-lectina disponible en el mercado conjugada con fosfatasa alcalina (B). Carril 1, 400 mg de fracción V de BSA; carril 2, 400 ng de la fórmula 1B acoplada a la fracción V de BSA; carril 3, 400 ng de la fórmula 1B acoplada a la fracción V de BSA. A la izquierda se indican los marcadores de peso molecular (PM en KDa).

Ejemplo 7: Inmunización de conejos con conjugados de fórmula 1A o fórmula 1B-BSA

Se inmunizaron conejos blancos de Nueva Zelanda con 2 mg de cada uno de los compuestos de glicoconjugado preparados en el ejemplo 6, empleando un protocolo de inmunización (protocolo aprobado por Animal Care Committee n.º 717). Después de una inyección subcutánea inicial (en 3 sitios, se inyectaron 0,5 ml en cada sitio) de 2,0 mg de antígeno empleando adyuvante completo de Freund (en una proporción 1:1 con el antígeno), se administró una dosis de refuerzo con 2,0 mg de cada uno de los conjugados de fórmula 1A-BSA y fórmula 1B-BSA mezclados con adyuvante incompleto de Freund (en una proporción 1:1 con el antígeno) por vía subcutánea (en 3 sitios, se inyectaron 0,5 ml en cada sitio) después de 4 semanas. Después de 6 semanas se preparó el suero a partir de una muestra de sangre de 5 ml de cada animal enfriando la muestra de sangre durante 60 min sobre hielo, seguido de una centrifugación durante 20 min a 10.000 x g. Los sueros individuales se analizaron para la producción de anticuerpos específicos de la fórmula 1A y la fórmula 1B mediante transferencia Western con lisados de células completas de *Campylobacter* (figura 8).

La figura 8 muestra una inmunotransferencia con un antisuero que se generó contra glicoconjugados-BSA individuales: se aplicaron 120 µg de lisados de células completas de *C. jejuni* 11168 de tipo salvaje (carril 1), *C. jejuni* 11168 *pglB* cepa mutante (carril 2), o *C. fetus fetus* (carril 3) a SDS-PAGE al 12,5%. Después de la transferencia a una membrana de PVDF, las proteínas inmovilizadas se sondaron (A) con una dilución 1:2000 de una muestra de suero obtenida a partir de un conejo que se inmunizó con el compuesto de fórmula 1B-BSA (SZR-1) y con (B) suero de un conejo inmunizado con el compuesto de fórmula 1A-BSA (SZR-3). A la izquierda se indican los marcadores de peso molecular (PM en KDa).

Ejemplo 8: Los compuestos de fórmula 1A y 1B se N-enlazan

Se cultivaron células en caldo MH bajo condiciones microaerobias, se recolectaron mediante centrifugación y se lavaron dos veces en Tris-HCl 50 mM, pH 7,2. Los sedimentos se liofilizaron y se colocaron en tubos Lobind de 1,5 ml (Eppendorf). Los sedimentos (10 mg) se resuspendieron en 1 ml de Tris-HCl enfriado en hielo (pH 7,5) en presencia de 150 unidades de benozanasa, se agitaron en vórtice para la resuspensión y se mantuvieron en hielo. Después de una sonicación (6 veces durante 30 segundos con un minuto sobre hielo entre cada una), los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 20.000 x g durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recogió en tubos LoBind (Eppendorf) y se liofilizó. El procesamiento de las muestras, el enriquecimiento en glicopéptidos y la espectrometría de masas se aplicaron como se ha descrito (Scott N.E., *et al.*, Molecular and Cellular Proteomics, 2010). Se identificó la fórmula 1A y la fórmula 1B N-enlazadas a asparaginas localizadas en polipéptidos derivados de lisados celulares proteolíticamente digeridos en *C. fetus fetus*, *C. fetus venerealis* y *C. concisus* (tabla 3).

Se aislaron e identificaron glicopéptidos de *Campylobacter fetus fetus*, *Campylobacter fetus venerealis*, y *Campylobacter concisus*, mostrándose los resultados en la tabla 3. Las porciones de glicanos de todos comprendían el compuesto de fórmula 1A o 1B.

Tabla 3: Compuestos de fórmula 1A y 1B que contienen glicopéptidos

<u>Glicopéptidos identificados de <i>Campylobacter fetus fetus</i></u>						
n.º de registro (Uniprot)	Nombre de la proteína	Secuencia del péptido	Área de la glicofórmula HexNAc4-Hex-Bac (fórmula 1B)	Área de la glicofórmula HexNAc5-Bac (fórmula 1A)	Proporción (HexNAc5-Bac (fórmula 1A)/HexNAc4-Hex-Bac (fórmula 1B))	
A0RM44_C AMFF	proteína de dominio PDZ	109NSTEMGHK118	9915111	25419948	2.563758288	
A0RN17_C AMFF	proteína de la familia del citocromo c putativa	47YAKDENVSINVK59	8804978	25437438	2.888983709	
A0RN17_C AMFF	proteína de la familia del citocromo c putativa	50DENVSINVK59	1509926	7656723	5.070925992	
A0RM98_C AMFF	proteína accesoria de citocromo c oxidasa CcoG	374VHEYYFDVNDTR386	19342158	5383759	0.278343244	
A0RP44_CA MFF	proteína homeostasis de cobre CutF	855DDNEIFYFK94	373909	1910579	5.10974328	
A0RRM2_C AMFF	proteína de la familia del canal de iones mecanosensible	47NASLGHDLDSLK58	4565871	14763004	3.233337955	
A0RP42_CA MFF	hidroxilamina oxidasa	283MSGIGDLNTHNVSVR299	14116580	44662532	3.16383515	
A0RM84_C AMFF	mureína transglicosilasa lítica soluble	155FLNDNNITSSFIPHLSSNWQFK177	310080	638344	2.058642931	
A0RN61_C AMFF	proteína no caracterizada putativa	68FGLGDDNNETTK79	3488453	20563891	5.894845366	
<u>Glicopéptidos identificados de <i>Campylobacter fetus venerealis</i></u>						
n.º de registro (GenBank)	Nombre de la proteína	Secuencia del péptido	Área de la glicofórmula HexNAc4-Hex-Bac (fórmula 1B)	Área de la glicofórmula HexNAc5-Bac (fórmula 1A)	Proporción (HexNAc5-Bac (fórmula 1A)/HexNAc4-Hex-Bac (fórmula 1B))	
ACLG01000 782.1; Cónfigo782 de <i>C. fetus</i>	proteína de dominio	109NSTEMGHK118	2200609	1611018	0.732078257	

venerealis Azul-94	PDZ								
desconocido	desconocido	DTNQTFTK	4891730	7235352	1.479098806				
desconocido	desconocido	NFHDTNK	4045072	2602866	0.643465926				
<u>Glicopéptidos identificados de <i>Campylobacter concisus</i></u>									
n.º de registro (GenBank)	Nombre de la proteína	Secuencia del péptido	Área de la glicoforma HexNAc4-Hex-Bac (fórmula 1B)	Área de la glicoforma HexNAc5-Bac (fórmula 1A)	Proporción (HexNAc5-Bac (fórmula 1A)/HexNAc4-Hex-Bac (fórmula 1B))				
desconocido	desconocido	(NF)HDTNK	4261136	16308843	3.827346276				

Lista de proteínas identificadas como *N*-enlazadas con fórmula 1A y fórmula 1B. Se determinaron las áreas de los picos individuales para la fórmula 1A y la fórmula 1B mediante espectrometría de masas de control de reacciones múltiples (MRM).

5 Las figuras 9A-F muestran los espectros de MS que demuestran que los compuestos de fórmula 1A y fórmula 1B están *N*-enlazados (al mismo péptido), como sigue:

9A) Espectro de MS (barrido de ion precursor) de péptidos enriquecidos en HILIC-LC tras una digestión triptica; (B) Cuantificación de las áreas relativas de los picos de los correspondientes iones; (C) MS/MS de la porción de carbohidrato; (D) MS/MS de la porción de péptido del ion *m/z* 968,44545; 9E) MS/MS de la porción de carbohidrato, y 9F) MS/MS de la porción de péptido del ion *m/z* 982,12069.

10 **Ejemplo 9: La fórmula 1A y 1B se presentan sobre la superficie de células de *Campylobacter***

Se cultivaron células de *C. fetus fetus*, *C. fetus venerealis*, *C. concisus*, *C. hyointestinalis*, y *C. jejuni* sobre placas MH durante 18-24 horas bajo condiciones microaerobias. Las células se recolectaron de la placa con 2 ml de caldo MH, se enfriaron sobre hielo durante 10 min, se centrifugaron durante 5 min a 6.000 x g. Las células se mantuvieron sobre hielo durante todas las demás etapas de marcaje y lavado empleando disoluciones preenfriadas (4 °C). Las células se lavaron dos veces con 2 ml de tampón de lavado (fosfato de potasio 50 mM, NaCl 100 mM). Para evitar la unión no específica, las células se bloquearon con leche desnatada al 1% en tampón de lavado durante 30 min. El anticuerpo primario (dilución 1:1.000 en tampón de lavado con leche desnatada al 0,5%) se aplicó durante 30 min. Las células se lavaron 3 veces con 2 ml de tampón de lavado. El anticuerpo secundario marcado de modo fluorescente (anti-conejo-IgG-Alexa-Fluor546, diluico 1:100 en tampón de lavado con leche desnatada al 0,5%) se aplicó durante 30 minutos y las células se lavaron 4 veces en tampón de lavado. El marcaje de la superficie celular se controló empleando un microscopio Leica DMRXA Upright equipado con una cámara digital Optronics MacroFire (LM-MFC-CD). Cada fotografía se tomó bajo idénticos ajustes del software. *C. jejuni* que produce la estructura 1 sirvió como control negativo.

25 La figura 10 muestra las imágenes de microscopía fluorescente de células completas de *C. fetus fetus*, *C. fetus venerealis*, *C. concisus*, *C. hyointestinalis*, y *C. jejuni* (control negativo) sondadas con 10 A, SZR-1 (anti-fórmula 1B) o 10B, SZR-3 (anti-fórmula 1A) como antisuero primario, y un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia.

La figura 11 muestra inmunotransferencias con el antisuero que se generó contra la fórmula 1A o la fórmula 1B y el antisuero que se dirige al *N*-glicano de *C. jejuni* (estructura 1, hR6 ha sido descrito por Schwarz *et al.*, Nature Chemical Biology, 2010). Se aplicaron 90 µg de *C. fetus fetus* (carril 1), *C. fetus venerealis* (carril 2), *C. concisus* (carril 3), *C. hyointestinalis* (carril 4) y *C. jejuni* 11168 (carril 5) a SDS-PAGE al 12,5%. Después de la transferencia a una membrana de PVDF, las proteínas inmovilizadas se sondaron (A) con una dilución 1:500 de una muestra de suero obtenida a partir de un conejo que se inmunizó con el compuesto de fórmula 1B-BSA (SZR-1), con (B) una dilución 1:500 de suero de un conejo inmunizado con el compuesto de fórmula 1A-BSA (SZR-3), o (C) con 1:5.000 de un antisuero específico contra el *N*-glicano de *C. jejuni* (hR6). A la izquierda se indican los marcadores de peso molecular (PM en KDa).

Los compuestos de glicano (fórmula 1A y fórmula 1B) pueden unirse a diversos vehículos de glicano (péptidos, lípidos). Los compuestos resultantes pueden emplearse para estimular una respuesta inmunológica contra la respectiva estructura que será protectora contra la infección con especies bacterianas que presentan la fórmula 1A y la fórmula 1B.

40 Los antisueros/anticuerpos generados pueden emplearse (por ejemplo, cuando se inmovilizan sobre una superficie) como diagnóstico para detectar, por ejemplo, *C. fetus venerealis* o *C. fetus fetus* en ganado infectado (en especial ganado vacuno infectado con *C. fetus venerealis*) o para detectar cepas de *Campylobacter* patógenas humanas (por ejemplo, *C. concisus*, *C. hyointestinalis*, *C. ureolyticus*). Dichos antisueros/anticuerpos pueden emplearse para detectar compuestos en cualquier secreción o fluido corporal. Por ejemplo, el semen de toro puede ensayarse con anticuerpos que reconozcan el glicano de fórmula 1 para detectar una infección por *Campylobacter fetus venerealis* que pueda estar presente en el animal.

Los compuestos de la presente invención pueden utilizarse para inmunizar animales, en particular, ganado, frente a *C. fetus venerealis*, *C. fetus fetus* y otras especies de *Campylobacter* en las que el glicano descrito en la presente es nativo al organismo. La inmunización puede tomar la forma de tratar o prevenir una enfermedad en animales individuales o en todo un rebaño para mejorar la productividad y la salud del rebaño.

En la medida en que la especie de *Campylobacter* en la cual el glicano de fórmula 1 es nativo al organismo, los compuestos descritos en la presente pueden utilizarse de una manera similar a lo anterior para preparar vacunas para tratar o prevenir una infección por dichos organismos dentro de seres humanos. Así mismo, puede obtenerse una función diagnóstica similar en seres humanos, empleando los anticuerpos o los antisueros generados contra dichos compuestos. De modo similar, los compuestos pueden ser dirigidos por otros productos terapéuticos, tales como bacteriófagos o sus proteínas de unión al receptor.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un compuesto aislado o purificado que comprende A-GlcNAc[GlcNAc]-GalNAc-GalNAc QuiNAc4NAc, en el que A es Glc-NAc o Glc.
- 5 2.- El compuesto de la reivindicación 1 conectado o enlazado a un único aminoácido, un oligopéptido, un péptido, una proteína o un lípido.
- 3.- El compuesto de la reivindicación 2, en el que dicho único aminoácido es asparagina.
- 4.- Una vacuna que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 5.- La vacuna de la reivindicación 4, que comprende además un adyuvante.
- 10 6.- La vacuna de las reivindicaciones 4 o 5 para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección provocada por un organismo de *Campylobacter*, en la que el compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 comprende un glicano nativo dentro de dicho organismo.
- 15 7.- La vacuna de la reivindicación 6, en la que dicho organismo es *Campylobacter fetus venerealis*, *Campylobacter fetus fetus*, *Campylobacter concisus*, *Campylobacter hyointestinalis*, subespecies de *Campylobacter hyointestinalis*, *Campylobacter sputorum*, subespecies de *Campylobacter sputorum*, *Campylobacter lanienae*, *Campylobacter ureolyticus*, *Campylobacter hominis*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter mucosalis* y *Campylobacter curvus*.
- 8.- La vacuna de la reivindicación 4 o 5 para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección provocada por un organismo de *Campylobacter*, en la que el compuesto de la reivindicación 1 es nativo a dicho organismo.
- 20 9.- La vacuna de la reivindicación 8, en la que dicho organismo es *Campylobacter fetus venerealis*, *Campylobacter fetus fetus*, *Campylobacter concisus*, *Campylobacter hyointestinalis*, subespecies de *Campylobacter hyointestinalis*, *Campylobacter sputorum*, subespecies de *Campylobacter sputorum*, *Campylobacter lanienae*, *Campylobacter ureolyticus*, *Campylobacter hominis*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter mucosalis* y *Campylobacter curvus*.
- 25 10.- La vacuna de las reivindicaciones 4 o 5 para su uso para mejorar la productividad y la salud de un rebaño de animales o la salud de un ser humano.
- 11.- Un anticuerpo o un antisuero eficaz contra un organismo de *Campylobacter*, en el que el compuesto de la reivindicación 1 es nativo a dicho organismo, y dicho anticuerpo o antisuero comprende un anticuerpo o un antisuero específico para el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 30 12.- El anticuerpo o el antisuero de la reivindicación 11, en el que dicho organismo es *Campylobacter fetus venerealis*, *Campylobacter fetus fetus*, *Campylobacter concisus*, *Campylobacter hyointestinalis*, subespecies de *Campylobacter hyointestinalis*, *Campylobacter sputorum*, subespecies de *Campylobacter sputorum*, *Campylobacter lanienae*, *Campylobacter ureolyticus*, *Campylobacter hominis*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter mucosalis* y *Campylobacter curvus*.
- 35 13.- Un método para diagnosticar la presencia de una infección en un animal o un ser humano provocada por un organismo de *Campylobacter*, en el que el compuesto de la reivindicación 1 es nativo a dicho organismo, poniendo en contacto una muestra procedente del animal o del ser humano con el anticuerpo o el antisuero de la reivindicación 11 o 12.
- 40 14.- El método de la reivindicación 13, en el que el organismo es *Campylobacter fetus venerealis*, *Campylobacter fetus fetus*, *Campylobacter concisus*, *Campylobacter hyointestinalis*, o *Campylobacter ureolyticus*.

Figura 1

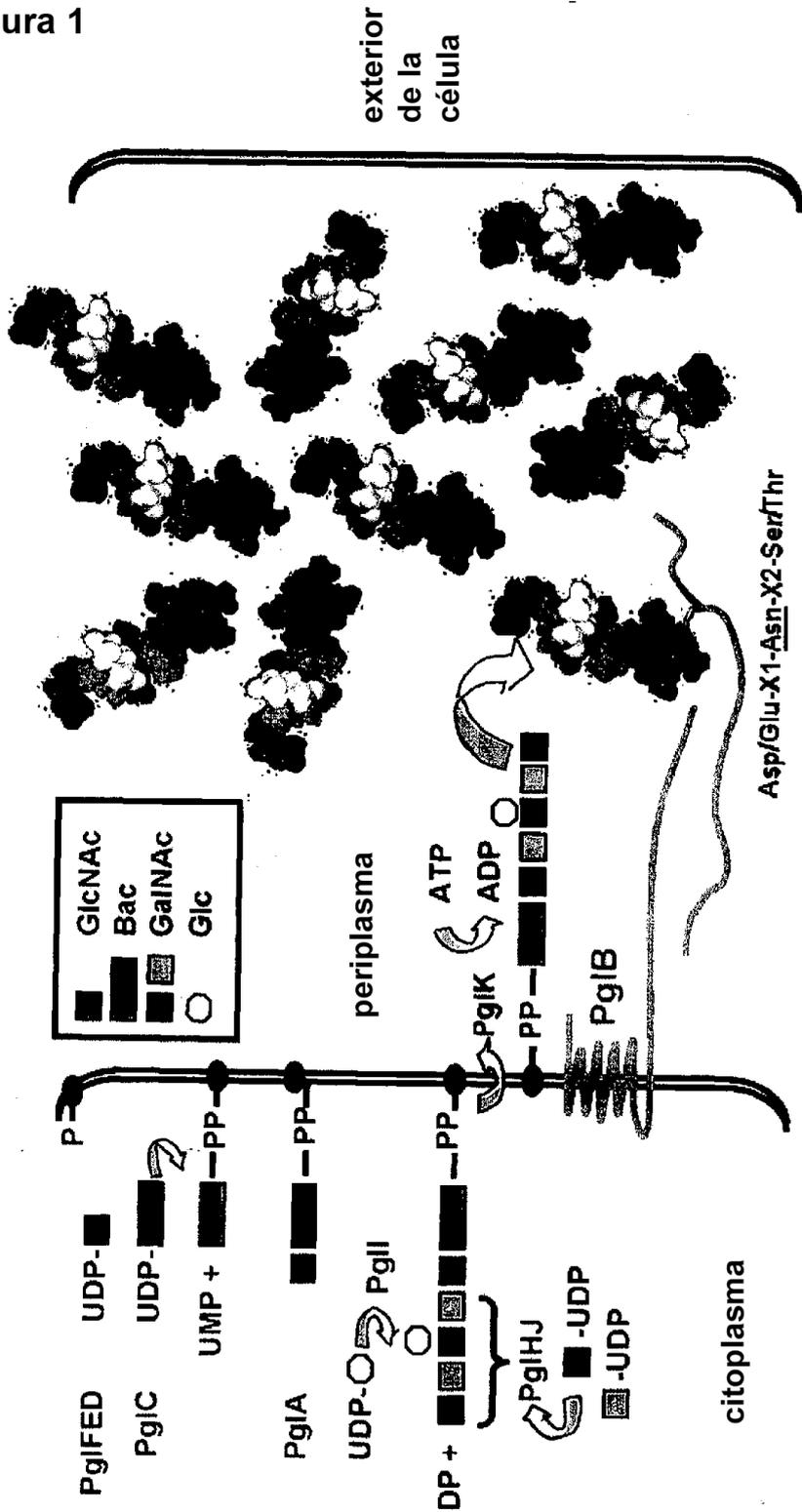


Figura 2

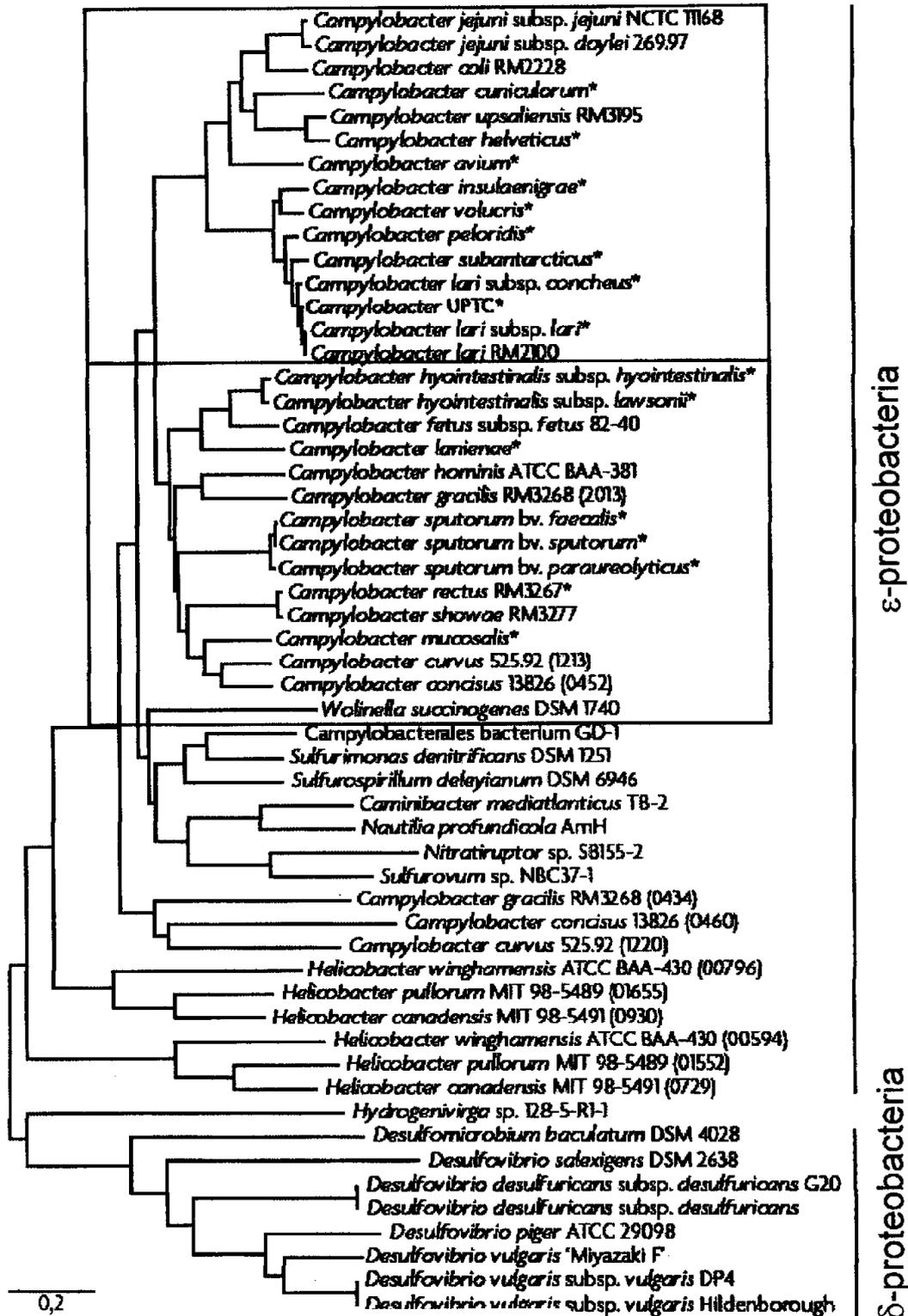


Figura 3

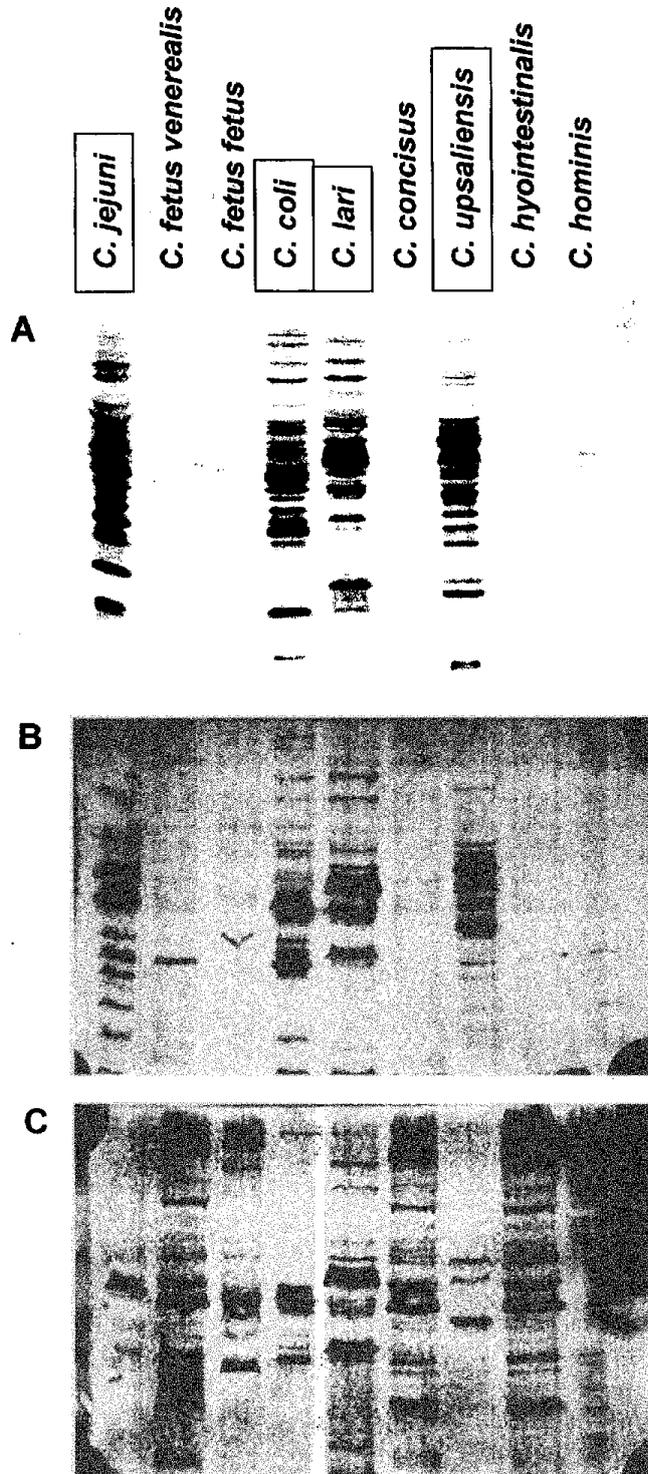


Figura 3 D(1)

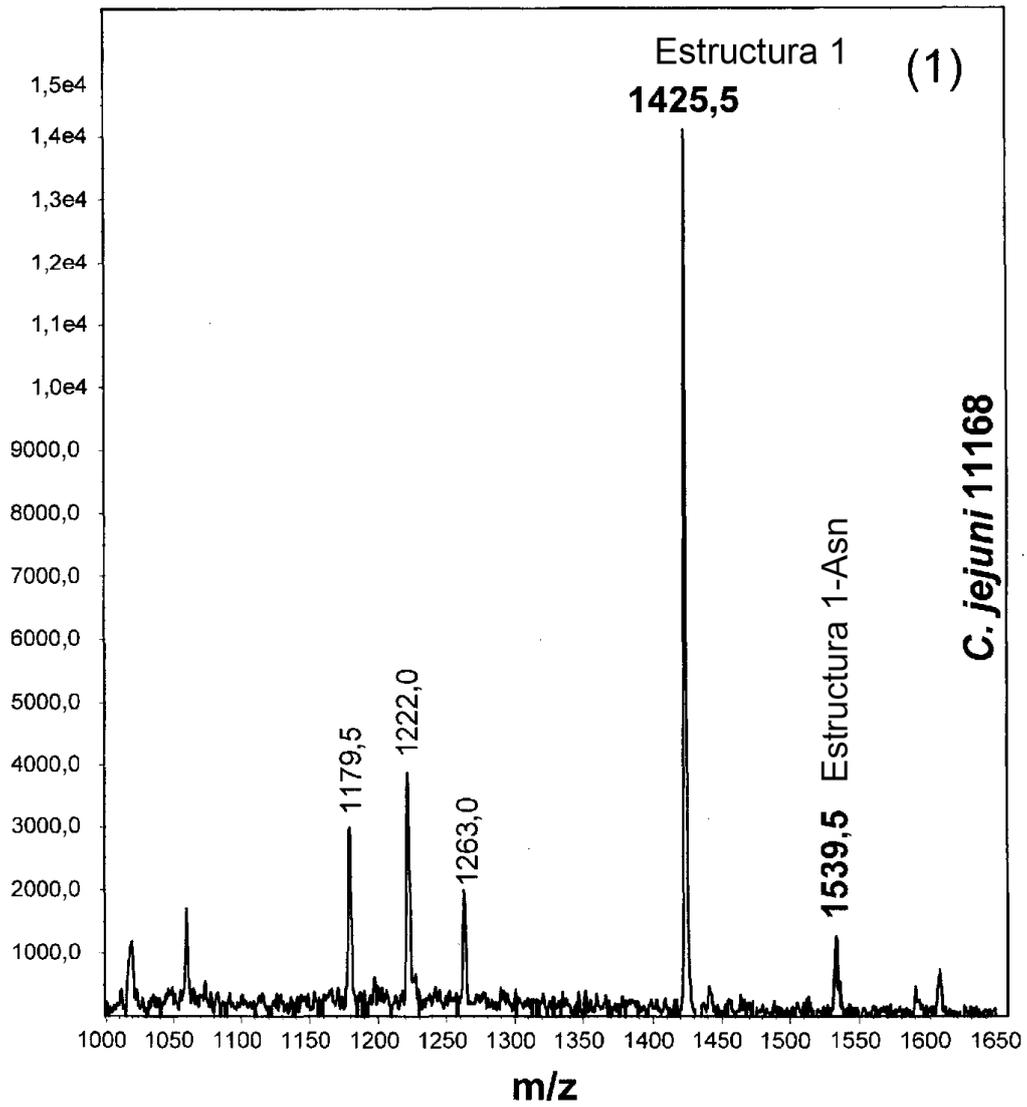


Figura 3 D(2)

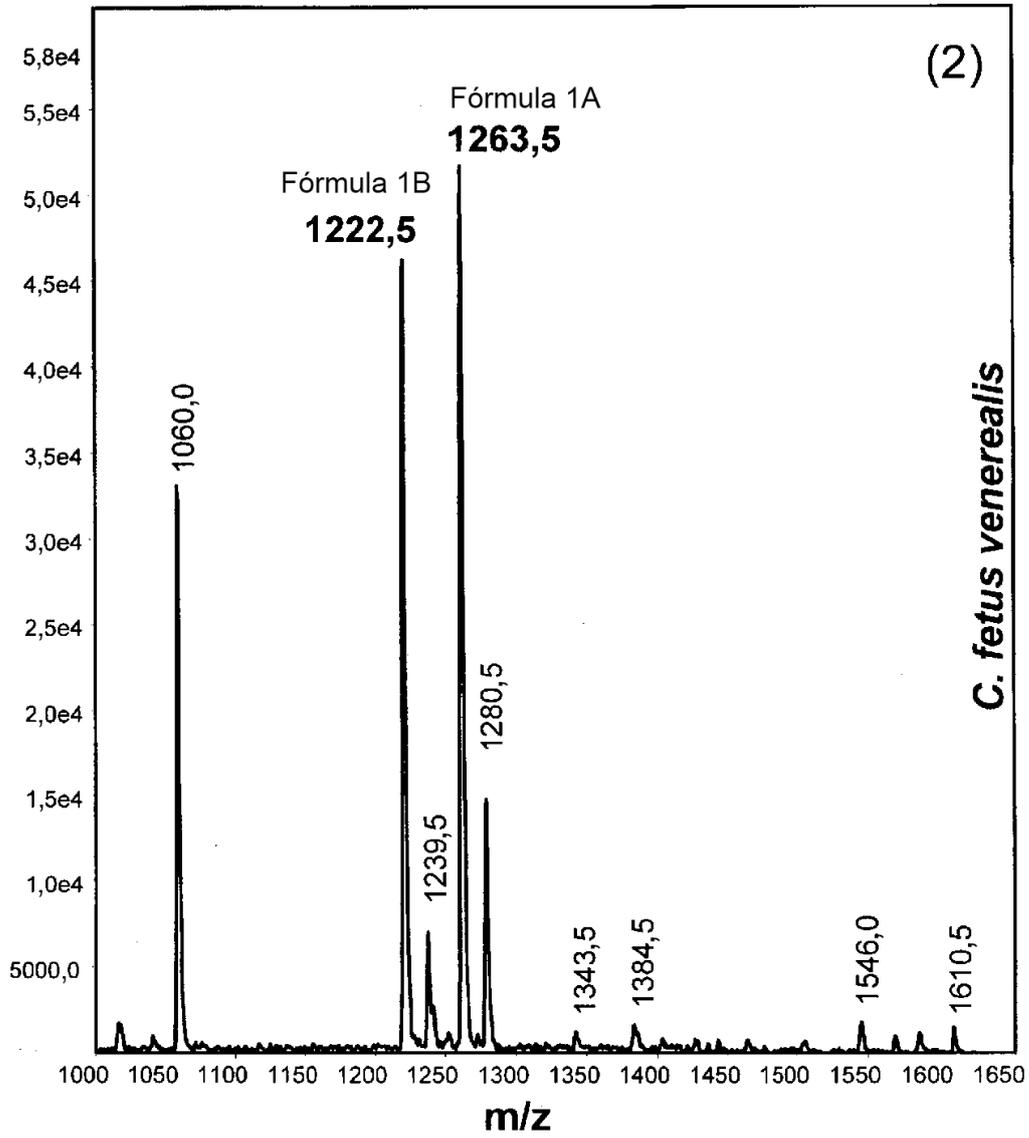


Figura 3 D(3)

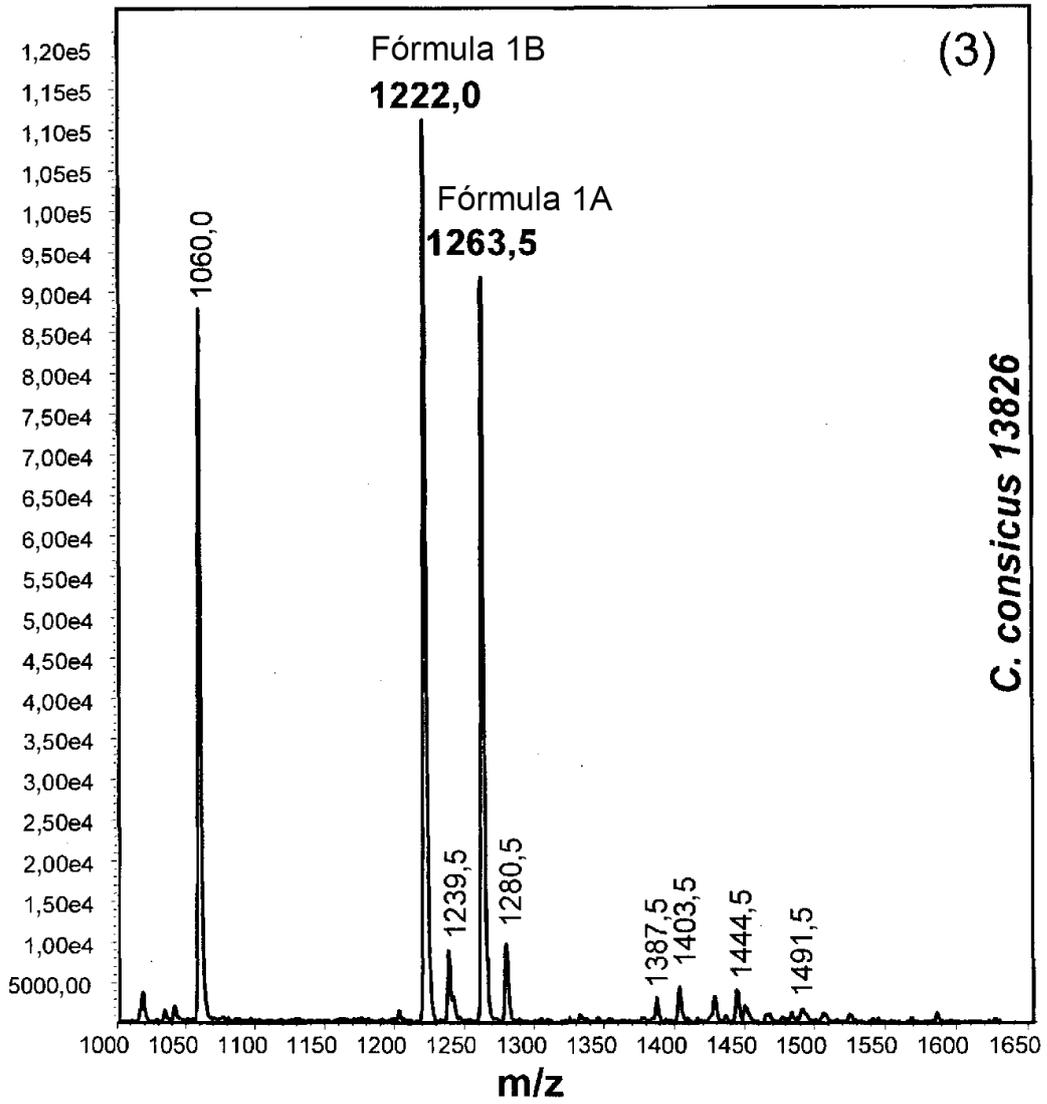


Figura 3 D(4)

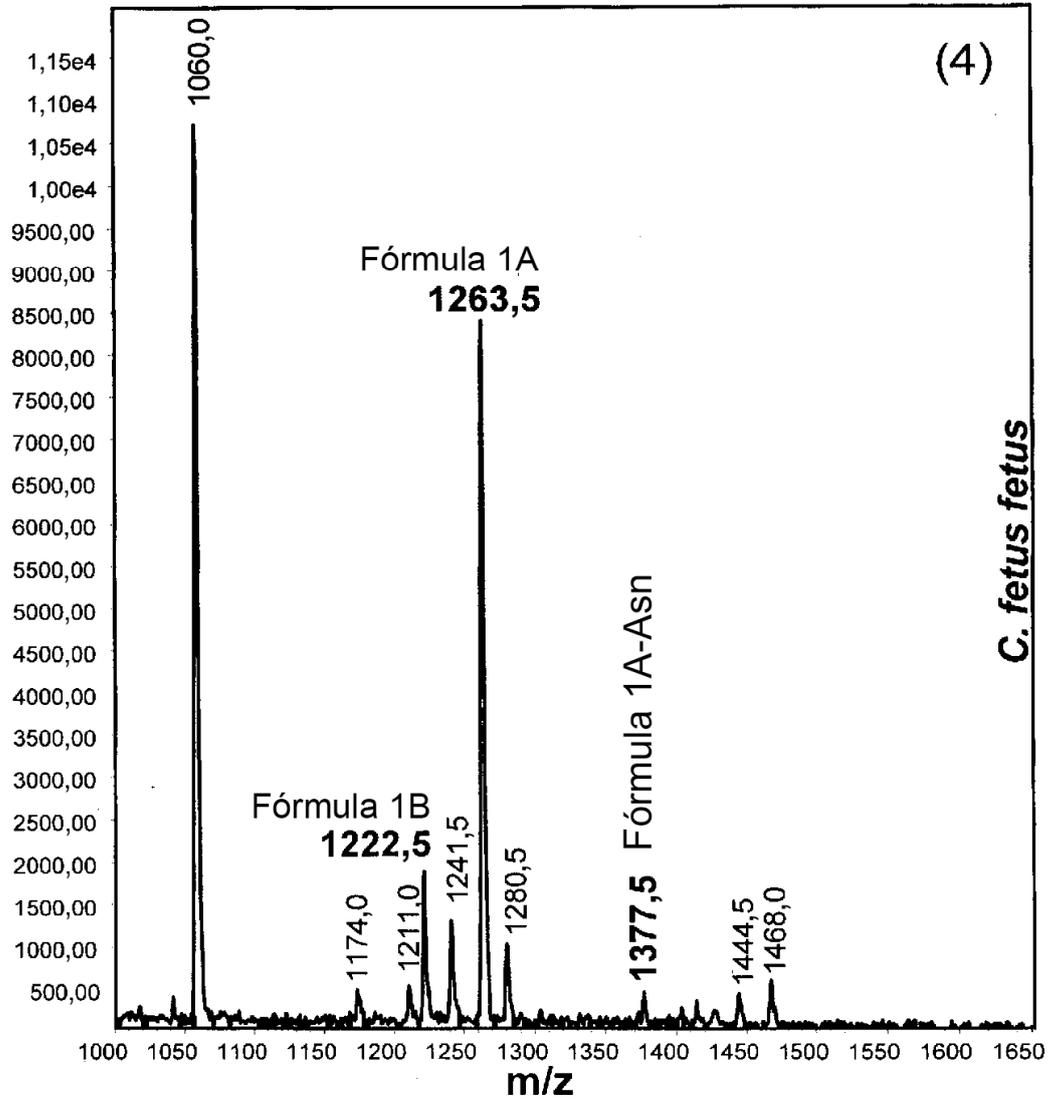


Figura 3 D(5)

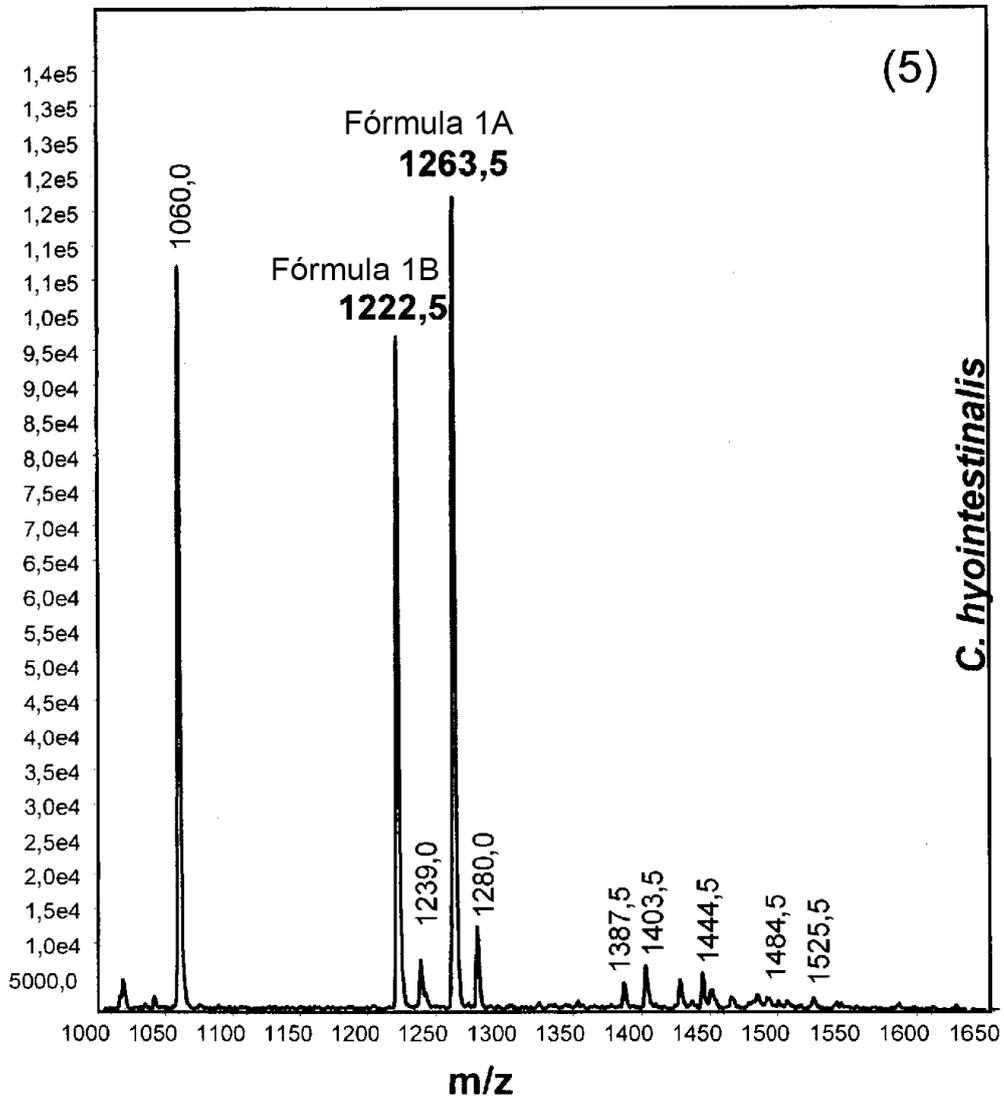


Figura 4 A)

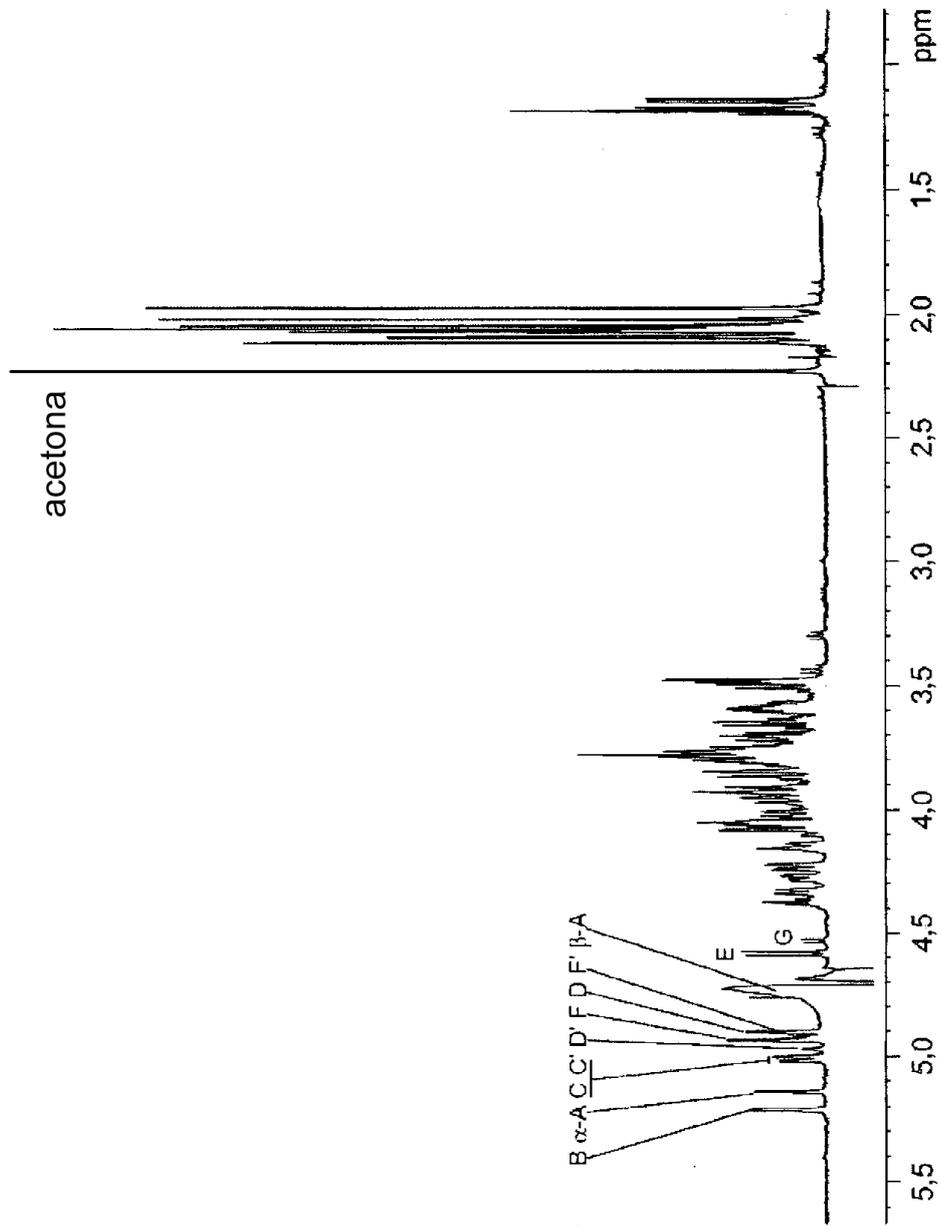


Figura 4 B)

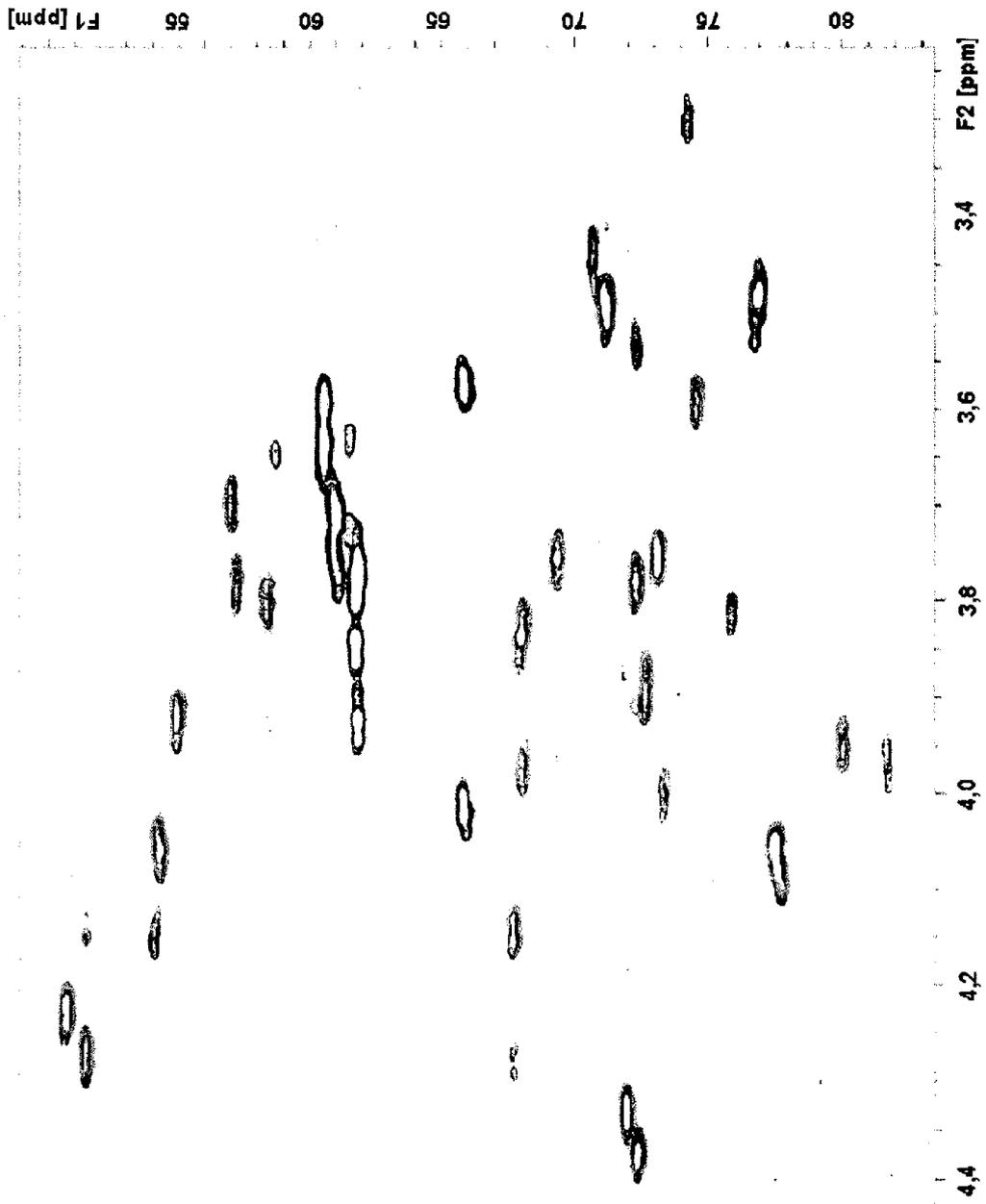


Figura 5

Estructura 1

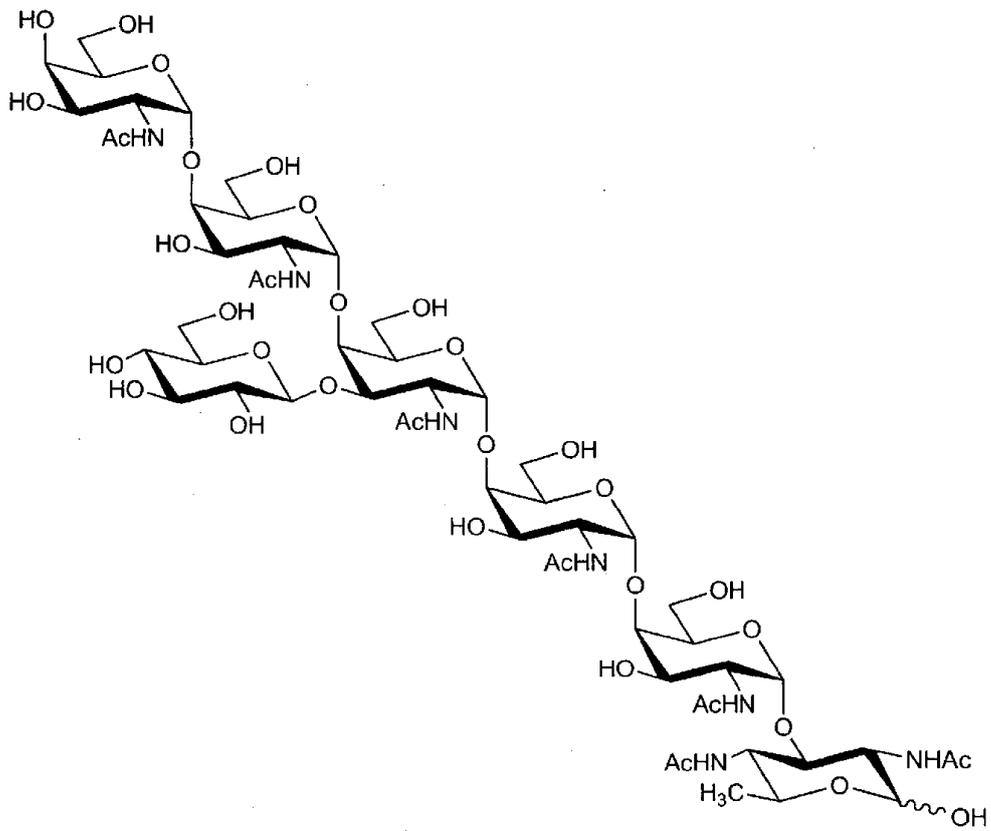
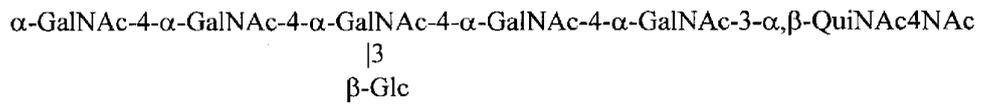
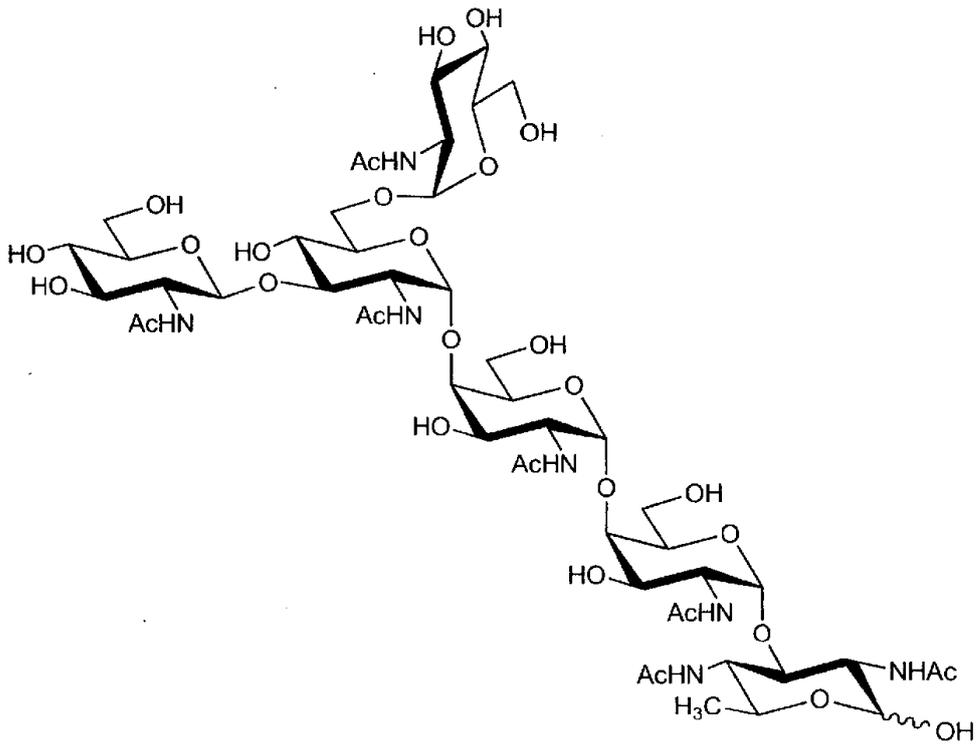
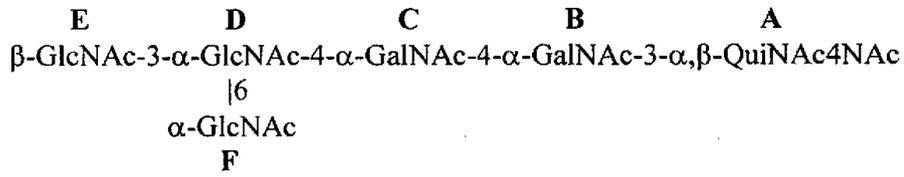


Figura 5

Fórmula 1A



Fórmula 1B

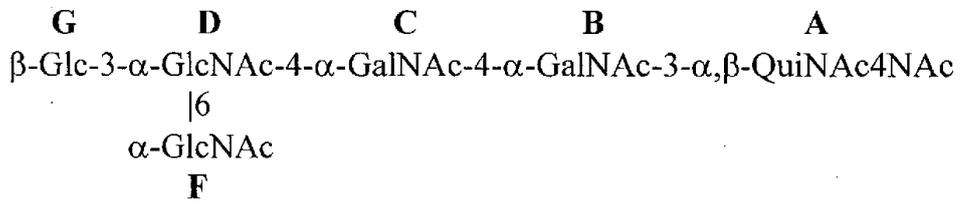


Figura 6

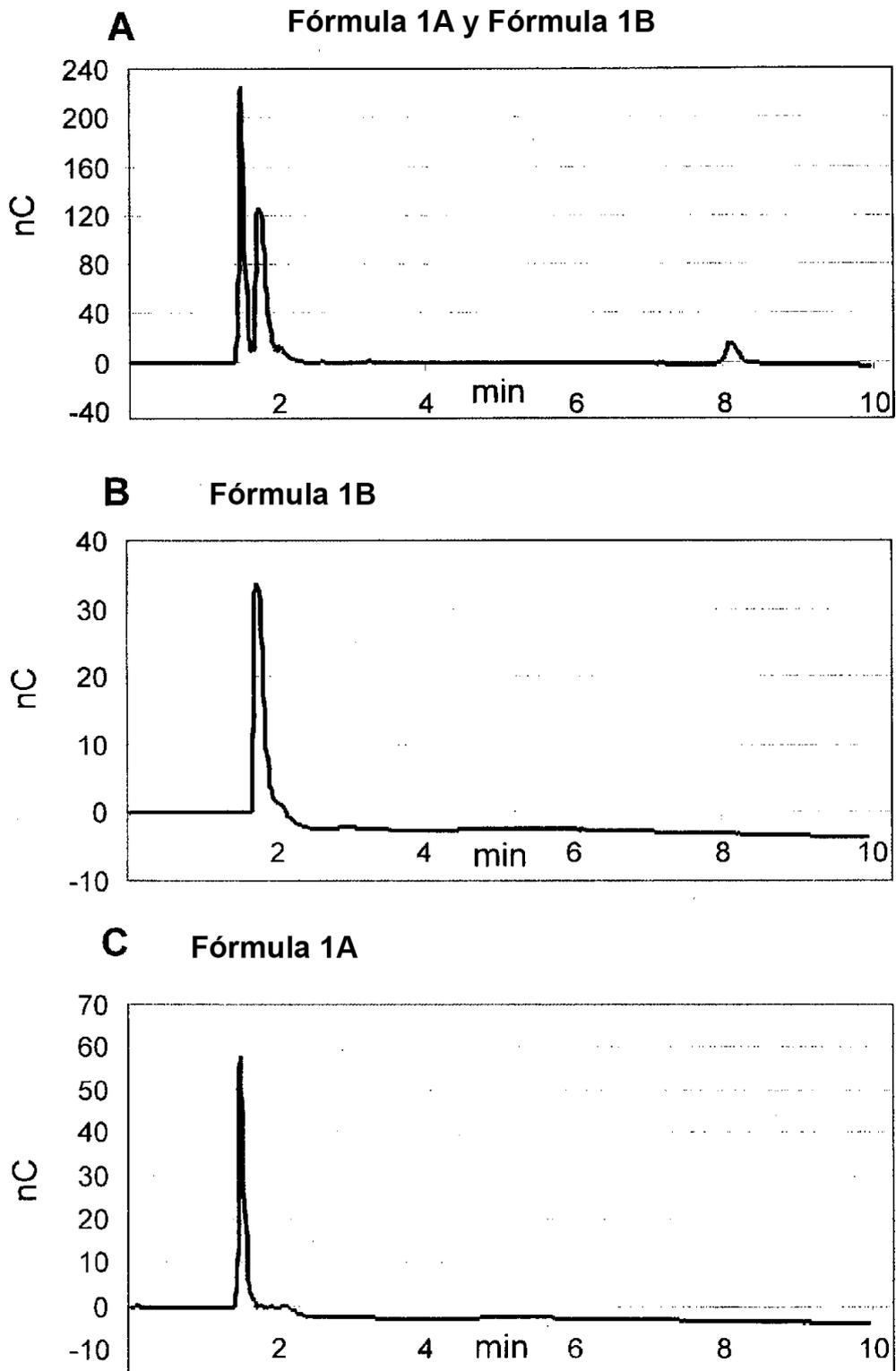


Figura 6 D

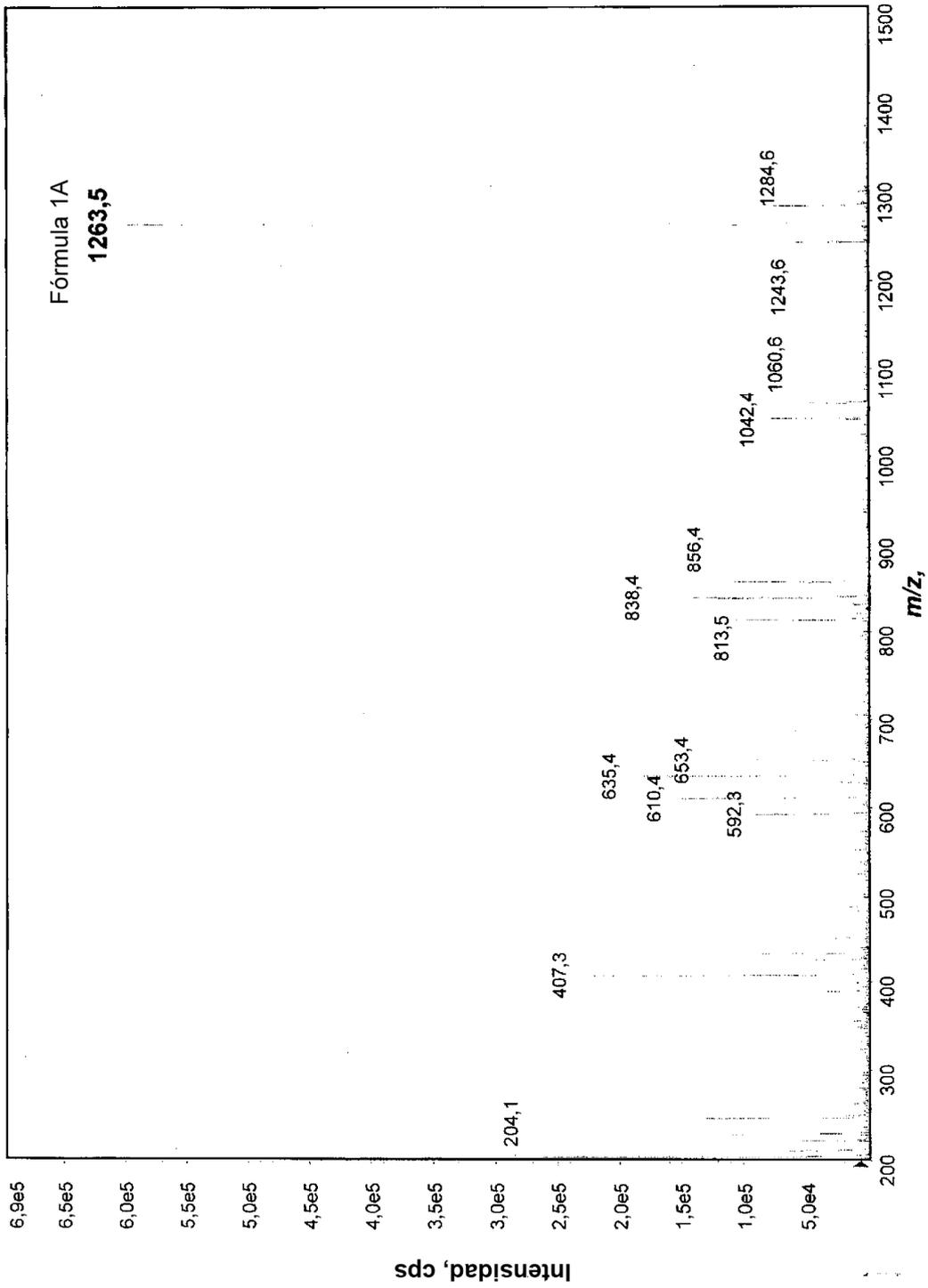


Figura 6 E

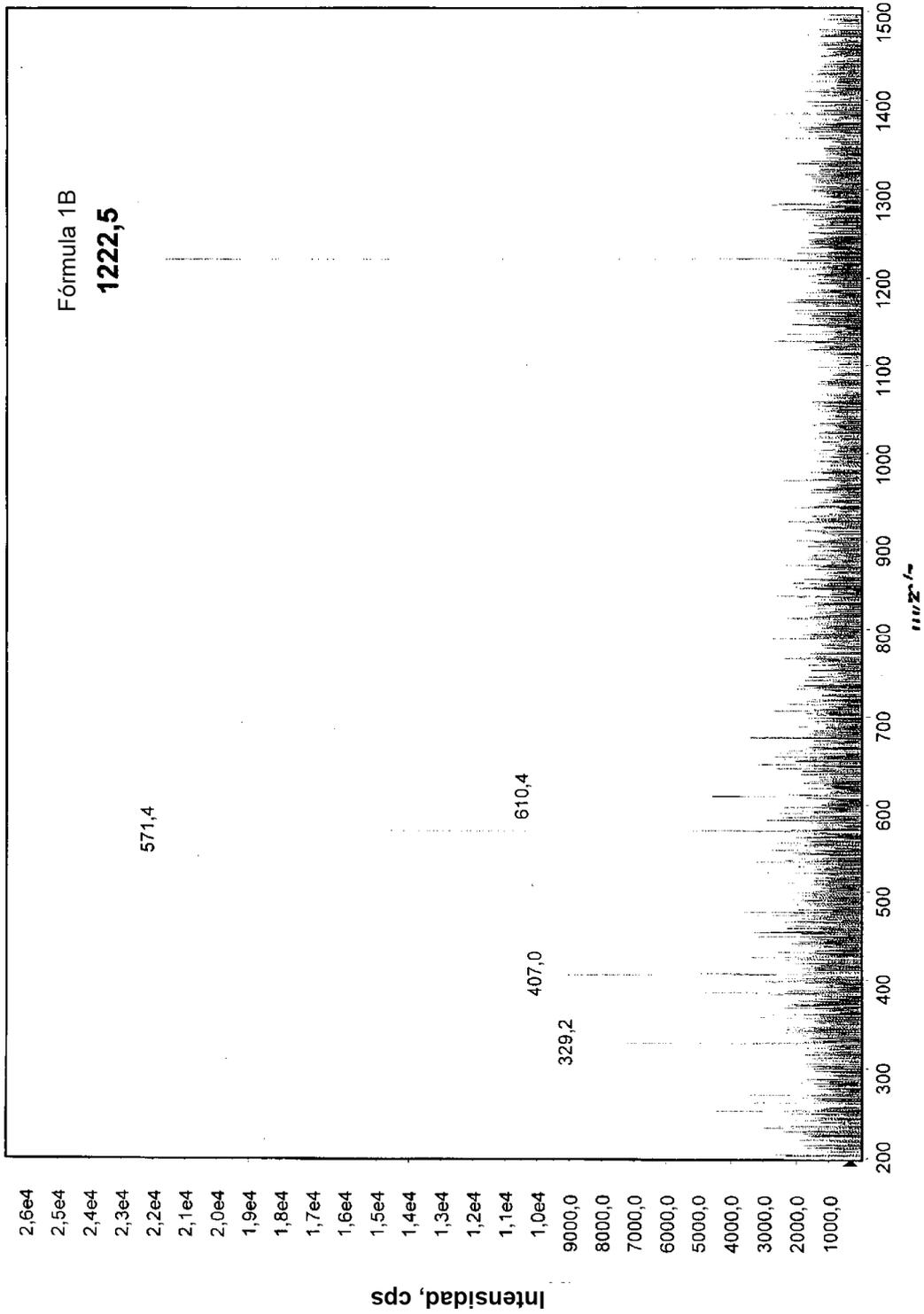


Figura 7

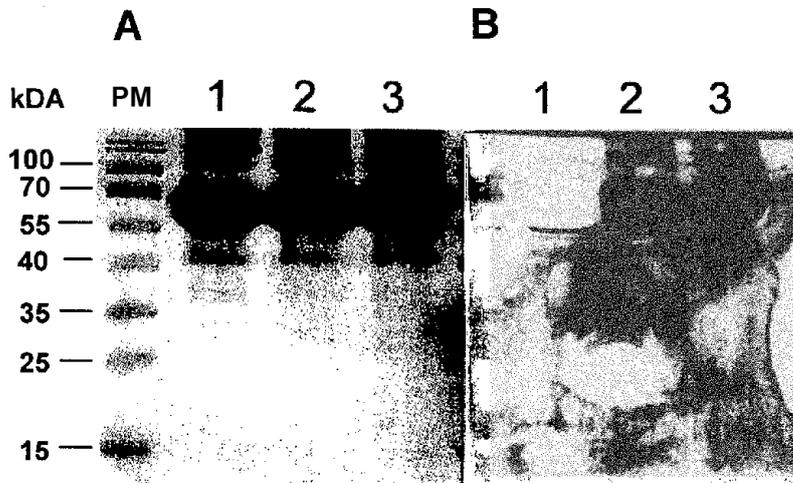


Figura 8

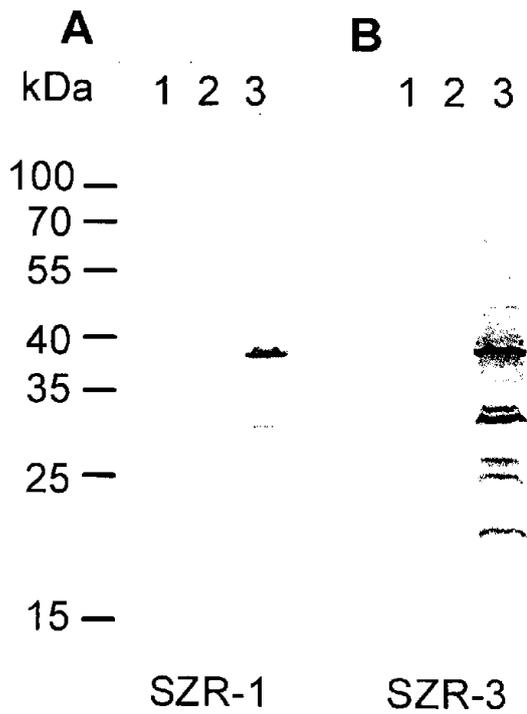


Figura 9 A

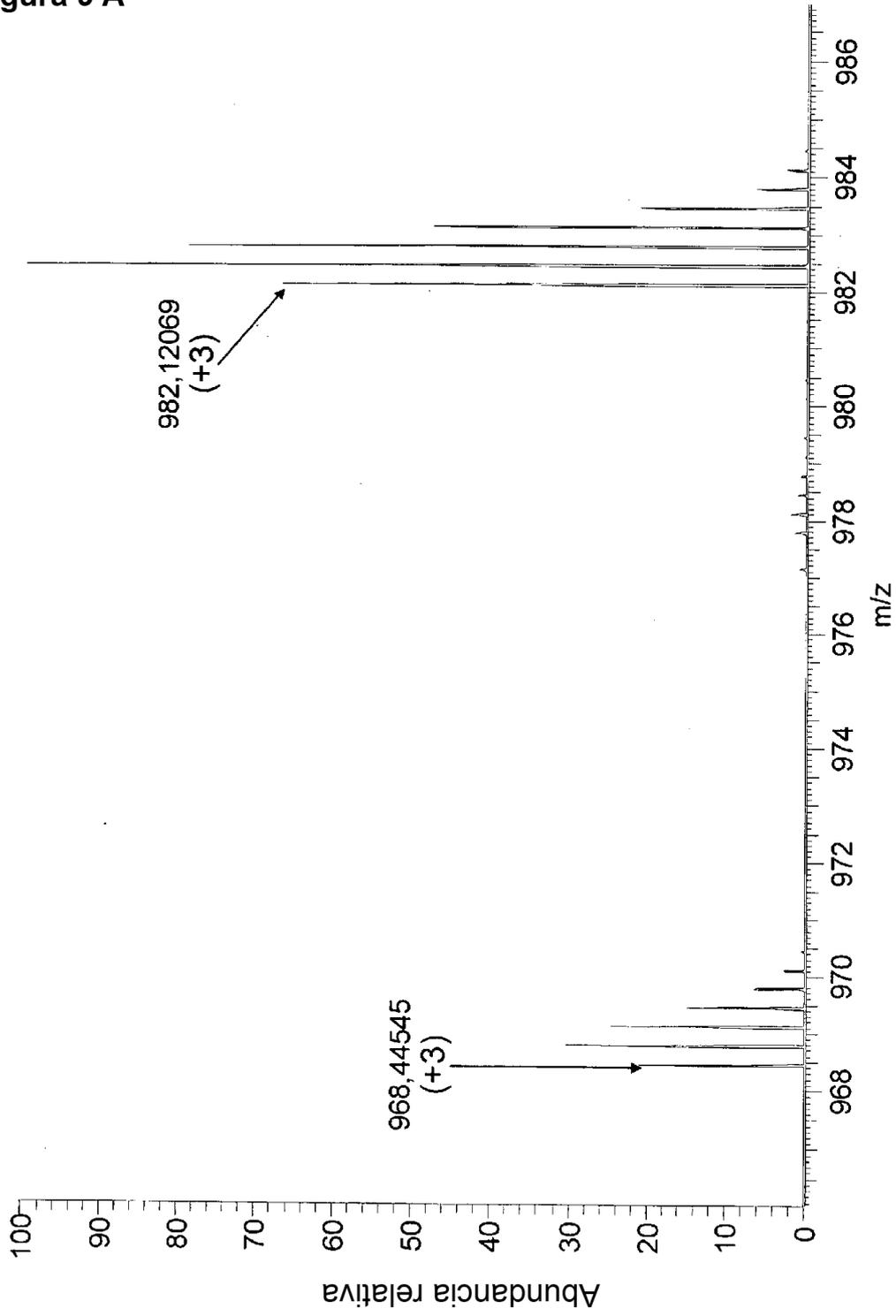


Figura 9 B

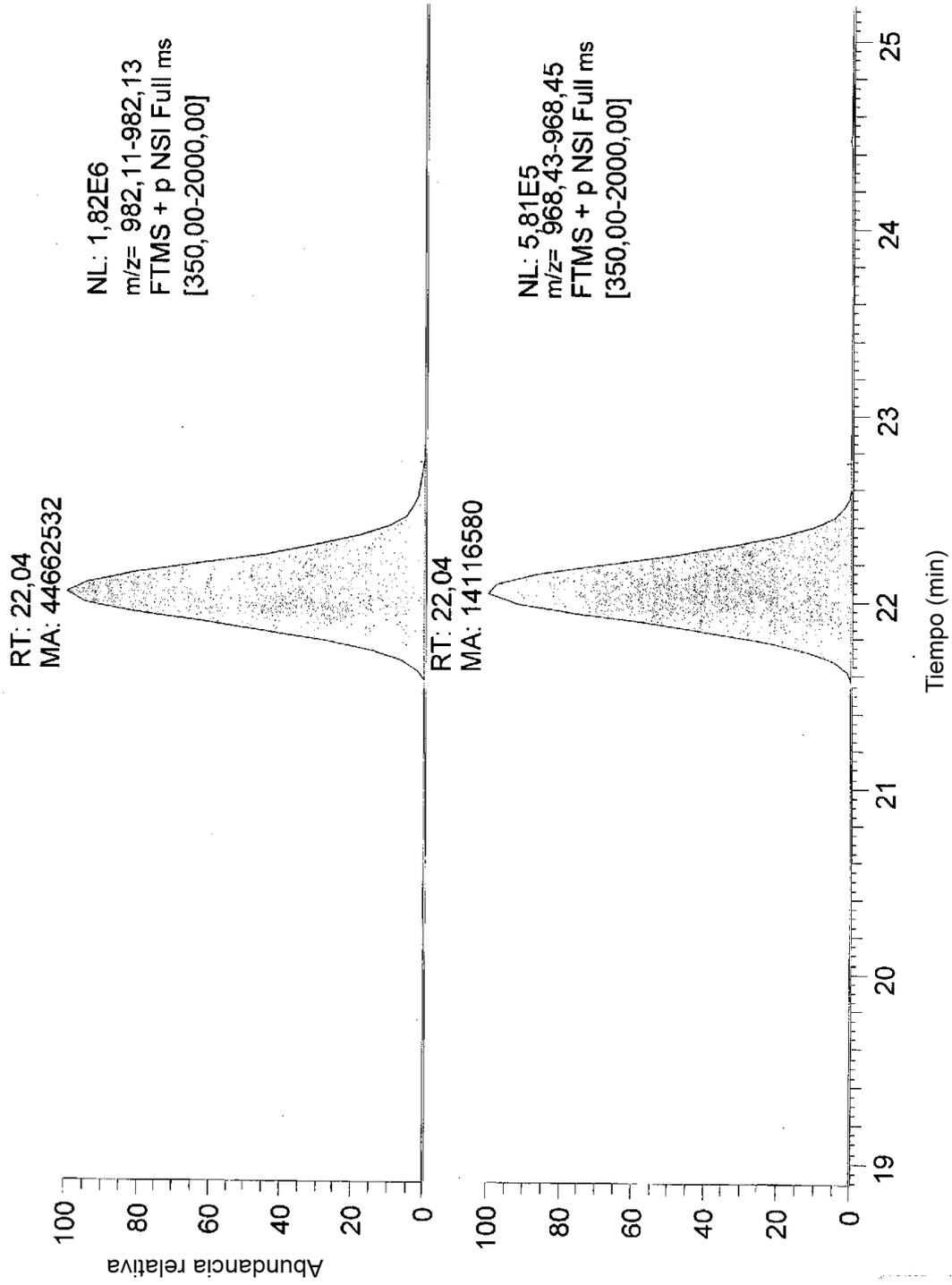


Figura 9 C

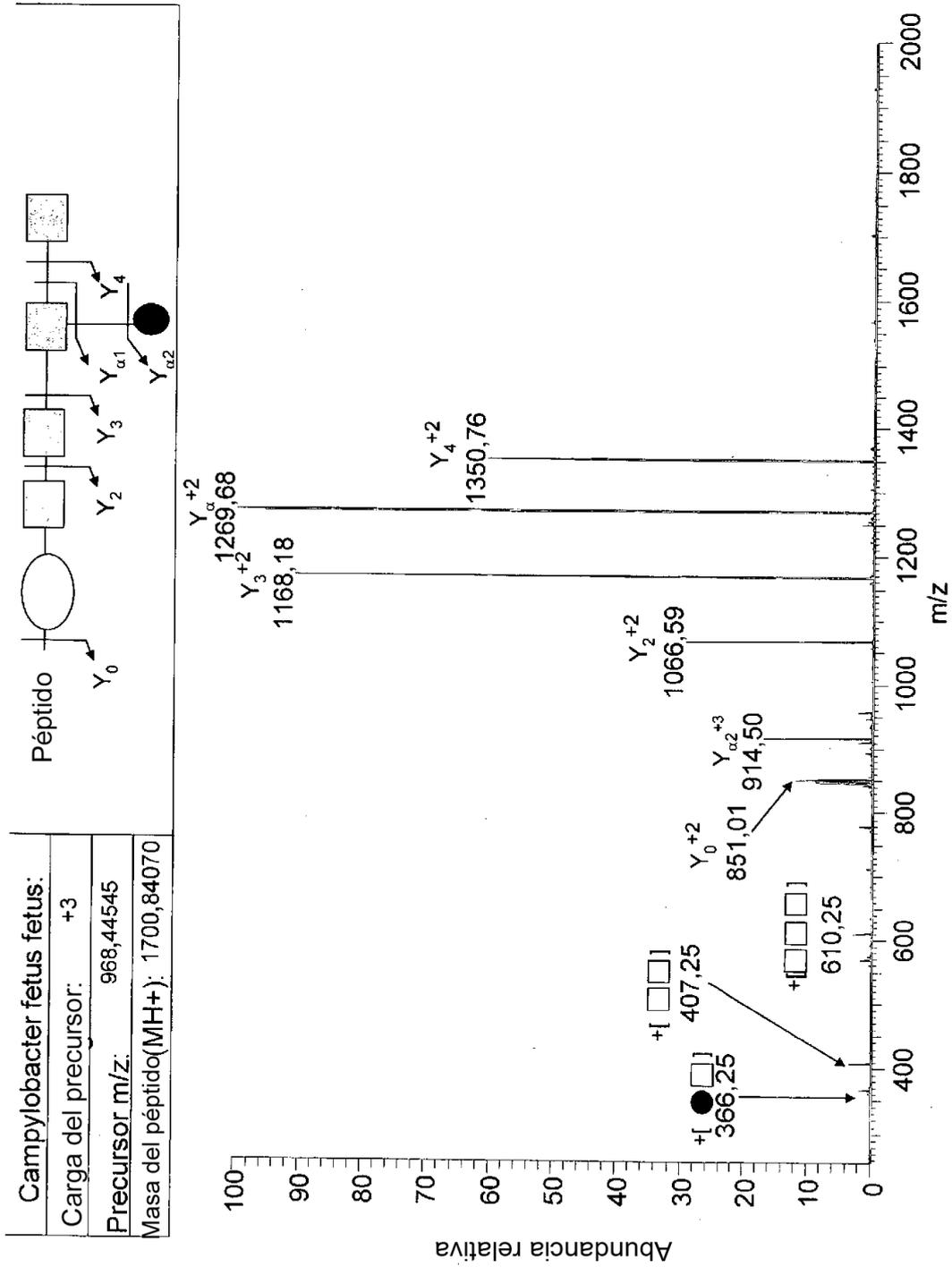


Figura 9 D

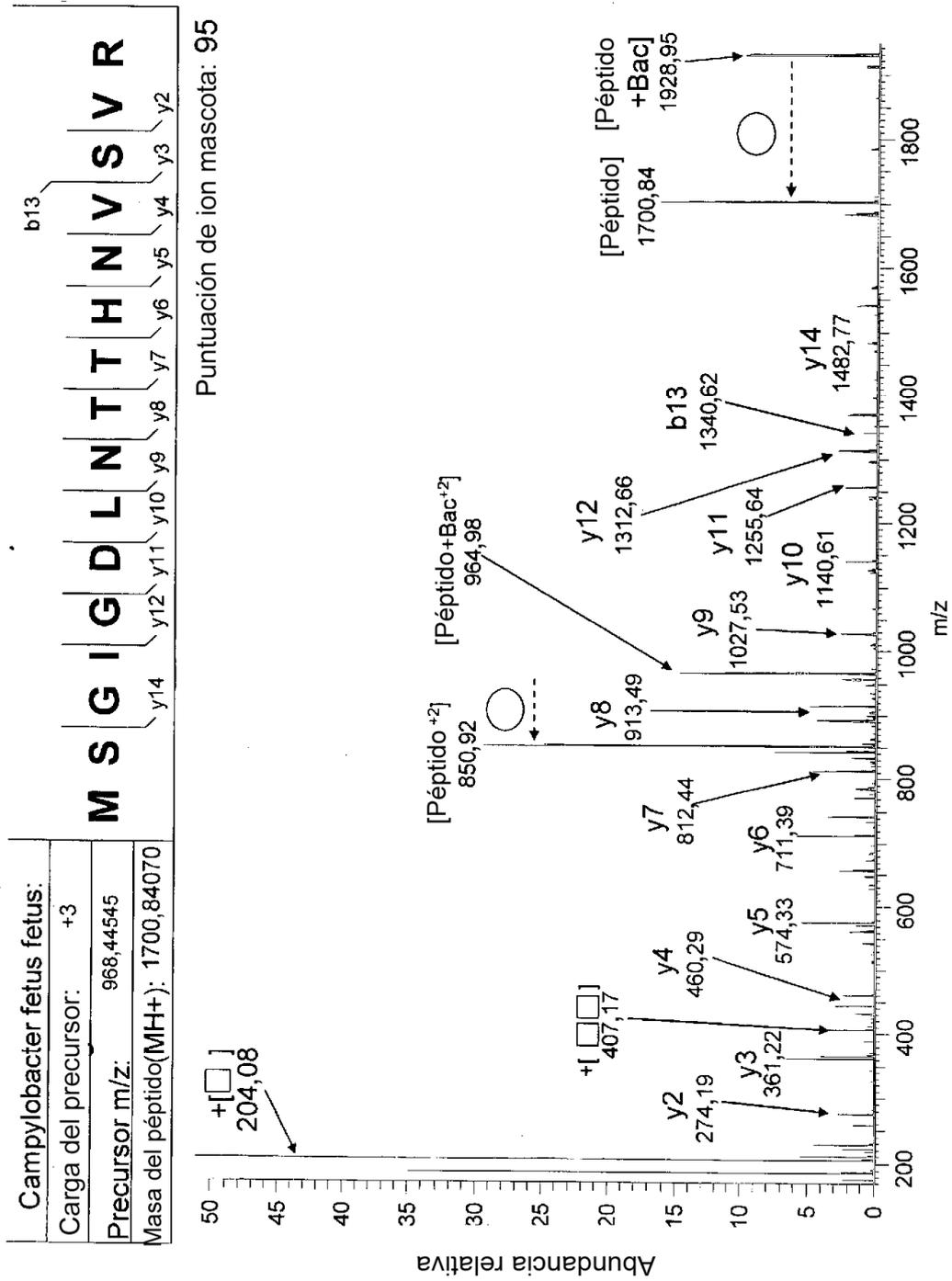


Figura 9 E

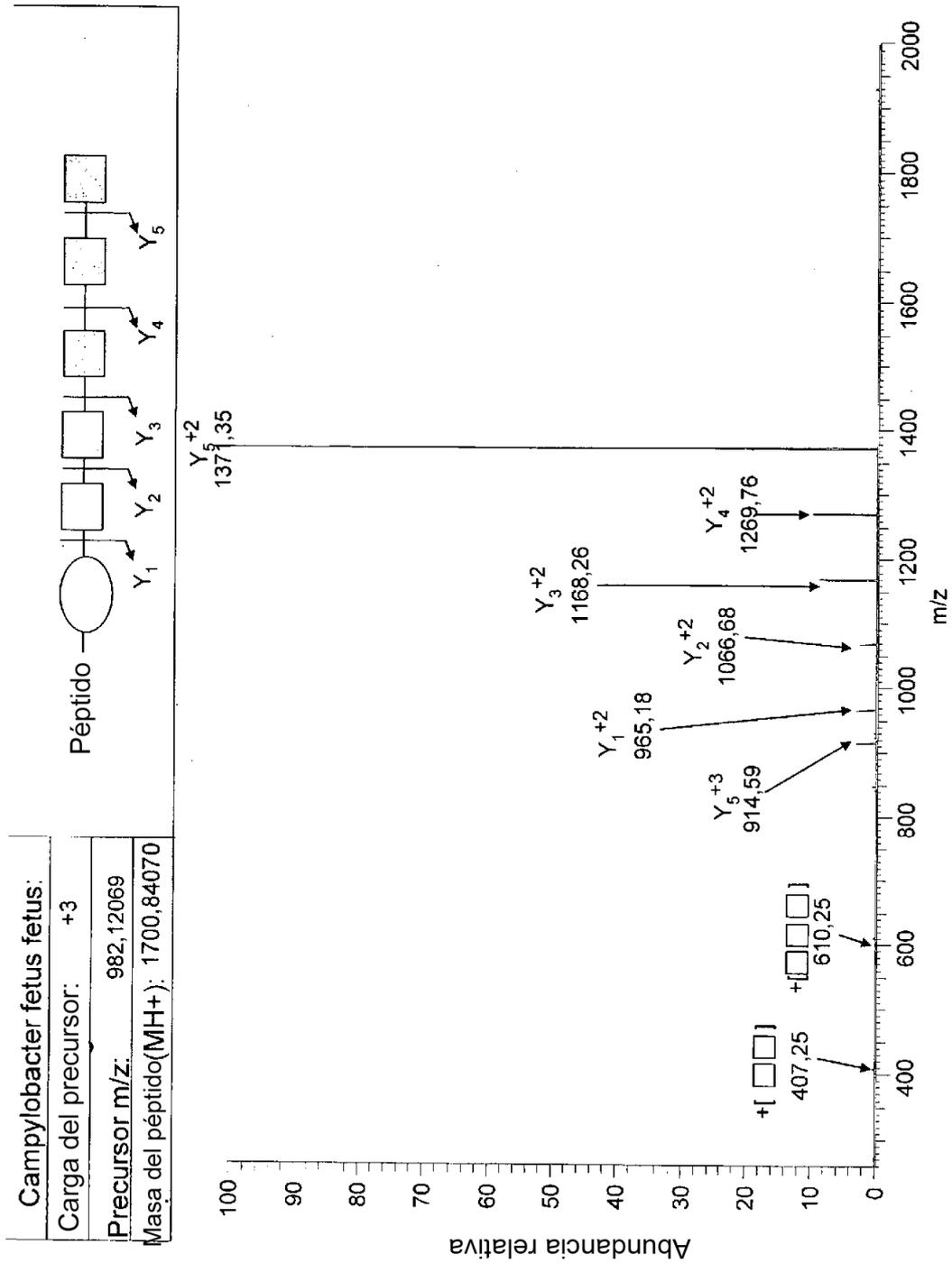


Figura 9 F

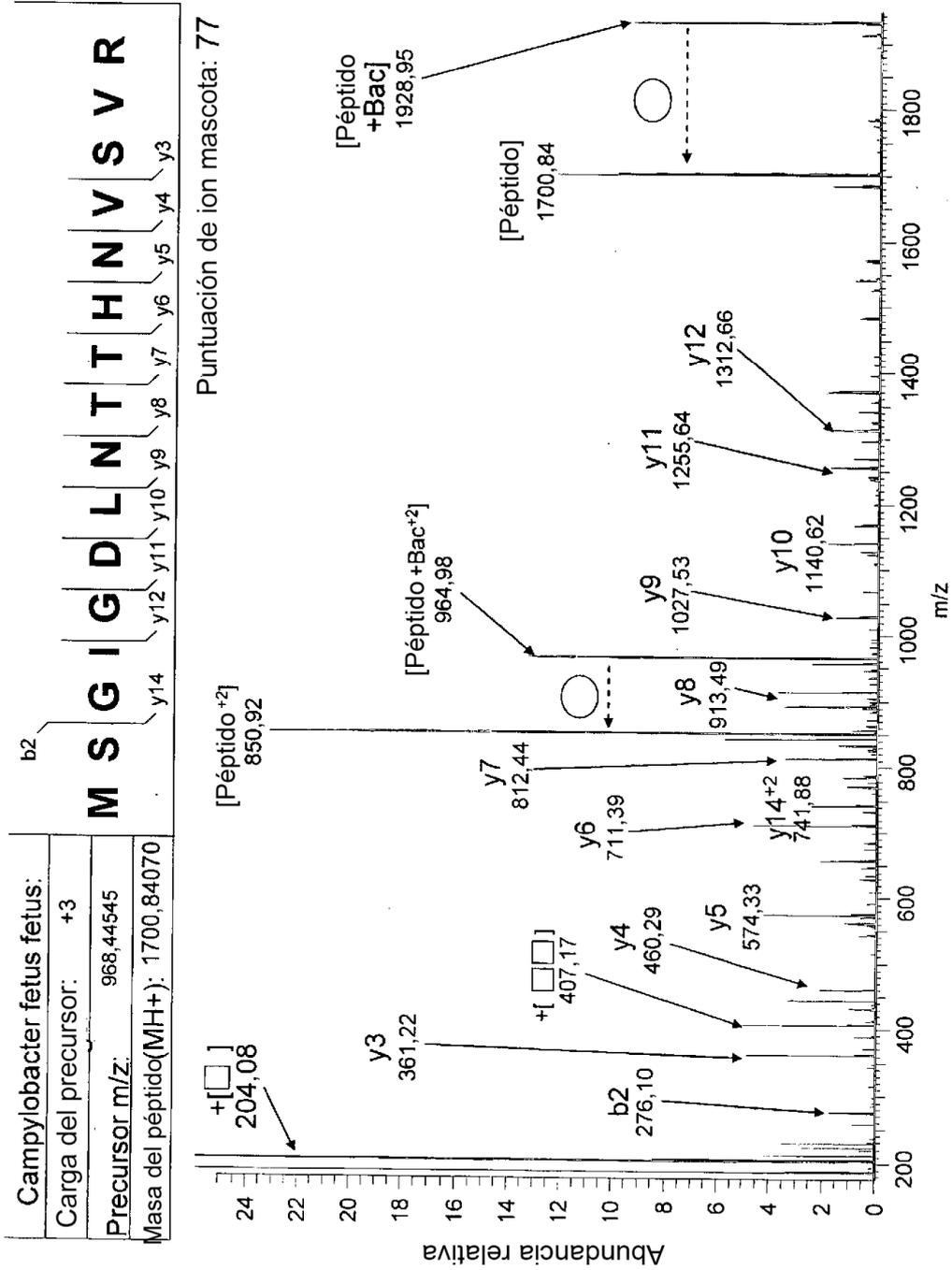


Figura 10

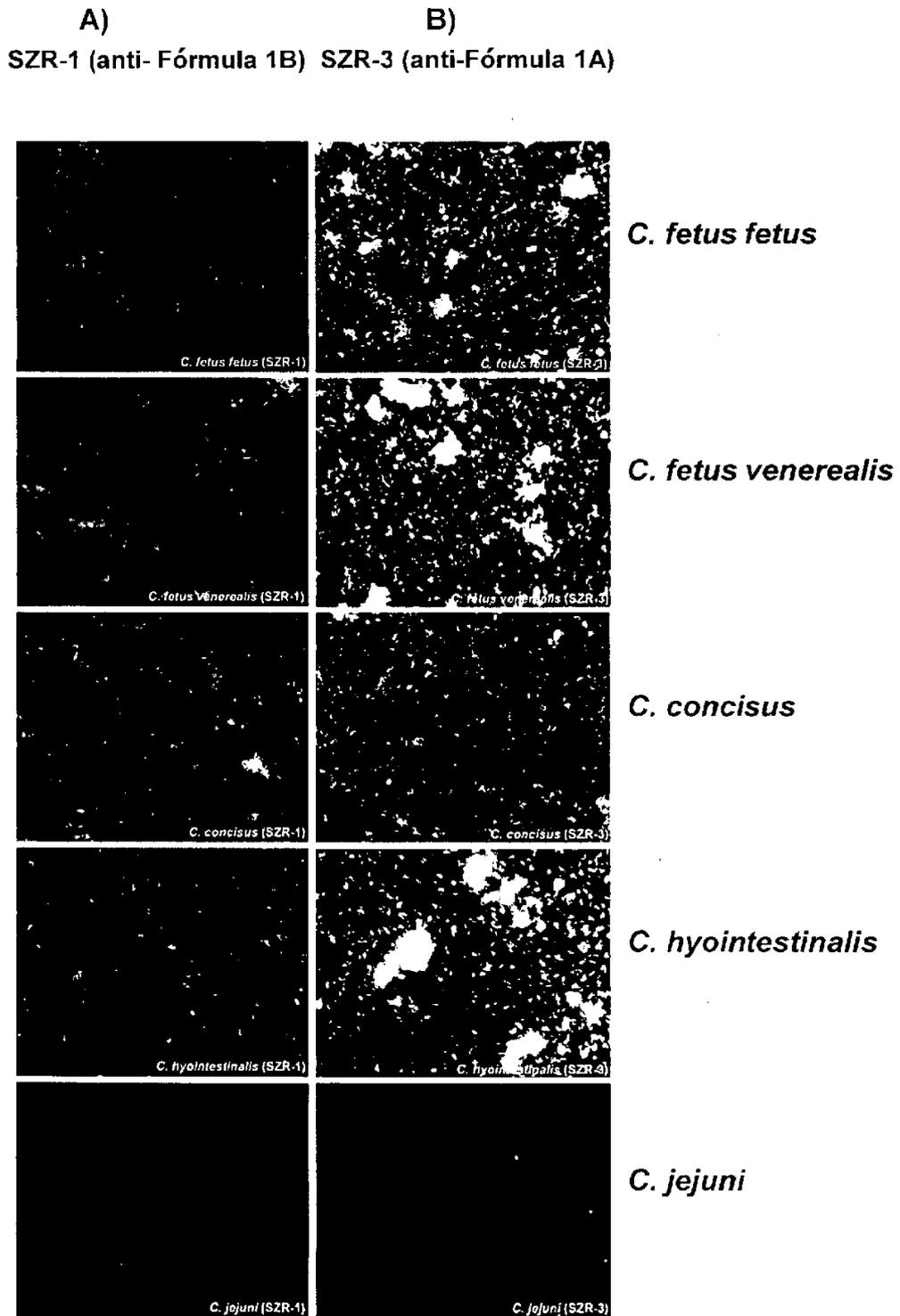


Figura 11

