

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 320**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/36 (2006.01)

C07K 14/205 (2006.01)

A61K 39/106 (2006.01)

A61K 39/112 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2010 PCT/EP2010/001884**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.09.2010 WO10108682**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2010 E 10715098 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2411503**

54 Título: **Salmonella enterica que presenta un N-glicano de C. Jejuni o derivados del mismo**

30 Prioridad:

27.03.2009 EP 09004445

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

13.12.2017

73 Titular/es:

**EIDGENÖSSISCHE TECHNISCHE HOCHSCHULE
ZÜRICH (100.0%)
ETH Transfer Rämistrasse 101
8092 Zürich, CH**

72 Inventor/es:

**ILG, KARIN;
AEBI, MARKUS;
AHUJA, UMESH;
AMBER, SABA y
SCHWARZ, FLAVIO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 646 320 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

Salmonella enterica que presenta un *N*-glicano de *C. jejuni* o derivados del mismo

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a *Salmonella enterica* que comprende al menos un operón *pgl* de *Campylobacter jejuni* o un derivado funcional del mismo y que presenta al menos un *N*-glicano de *Campylobacter jejuni* o un derivado *N*-glicano del mismo sobre su superficie celular, en el que están inactivados uno más genes de la biosíntesis de bacilosamina por mutación y/o delección parcial o completa, preferiblemente por delección parcial y/o completa de los genes *pgl*, D, E, F. Además, se refiere dirige a los usos médicos, composiciones farmacéuticas, alimentos y aditivos alimenticios preparados a partir de los mismos, así como también a los métodos para tratar y/o prevenir infecciones por *Campylobacter*, en particular aquellas provocadas por *C. jejuni*, *C. lari*, *C. coli*, *C. upsaliensis* y *C. fetus* y opcionalmente, infecciones por *Salmonella* y a los métodos para producir estas cepas de *Salmonella*.

Antecedentes relevantes de la invención

Campylobacter jejuni (*C. jejuni*) es un patógeno presente en los alimentos que provoca gastroenteritis aguda humana en los países desarrollados. Sus hospedadores regulares son el ganado, en particular ganado vacuno y pollos. La infección con *C. jejuni* también se asocia con diversas consecuencias a largo plazo, siendo la más grave de ellas las enfermedades autoinmunitarias como el síndrome de Miller-Fisher y el síndrome de Guillain-Barré. Estos están provocados por los anticuerpos de los hospedadores mamíferos contra el mimetismo de las estructuras de gangliósidos mamíferos sobre la superficie del patógeno que también atacan a los gangliósidos propios del hospedador. Este mimetismo molecular es una de las razones por las cuales actualmente no existen vacunas eficientes contra *C. jejuni* disponibles, debido a que se excluye el uso de células de *C. jejuni* atenuadas o destruidas como vacunas.

La patente de los Estados Unidos N.º 2007/065461 enseña una vacuna compuesta de al menos un polisacárido capsular (CPS) de *C. jejuni* unido opcionalmente *in vitro* a una proteína portadora. La inyección de este conjugado en ratones y simios protege contra la última estimulación intranasal con *C. jejuni*. La producción de esta vacuna requiere el aislamiento y purificación del CPS, así como también del enlace químico a la proteína portadora y etapas de purificación adicionales.

Poly et al. (*Infection and Immunity*, 75:3425-3433, 2008) describen cepas de *C. jejuni* que carecen de las estructuras de mimetismo de gangliósidos que actualmente se están probando como candidatos para vacuna.

Anteriormente se consideró que la glicosilación era específicamente un fenómeno eucariota, aunque más tarde mostró estar generalizada en los dominios tanto Archaea como Eubacteria. Los enlaces O y N se forman con una mayor gama de azúcares que los observados en glicoproteínas eucariotas. La *N*-glicosilación glucosídica de proteínas en procariontes se demostró por primera vez en *C. jejuni*. (Szymanski et al., *Molecular Microbiology* 32:1022-1030, 1999). La maquinaria de glicosilación de *C. jejuni* se ha caracterizado, e incluso se ha transferido con éxito a *E. coli*, donde se demostró la *N*-glicosilación activa de proteínas (Wacker et al., *Science*, 298:1790-1793, 2002). El locus génico de *C. jejuni* denominado *pgl* (por glicosilación de proteínas) está implicado en la glicosilación de múltiples proteínas. Su lentificación mutacional da por resultado la pérdida de inmunogenicidad en múltiples proteínas.

El sistema de glicosilación de *C. jejuni* se transfirió funcionalmente a *S. enterica* y la especificidad del sustrato de la oligosacaryltransferasa PglB bacteriana, que se basa en un grupo acetamido en el C-2 del monosacárido en el extremo reductor, lo que sugiere que las oligosacaryltransferasas eucariotas y procariontes catalizan la transferencia de oligosacáridos por un mecanismo conservado (Wacker et al., *PNAS* 103: 7088 - 7093, 2006).

La solicitud de patente de los Estados Unidos 2006/0165728 A1 identifica un heptasacárido específico y muy inmunogénico que es común para al menos diversas especies de *Campylobacter* y muchas cepas que son importantes como patógenos humanos y veterinarios. El heptasacárido tiene la siguiente fórmula (I):



en la que Bac (también denominado bacilosamina) es 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxi-D-glucopiranososa, GalNAc es *N*-acetil-galactosamina y Glc es glucosa. El resto glicano es un componente de múltiples glicoproteínas. En *C. jejuni* el *N*-glicano es importante para la interacción de *C. jejuni* con las células hospederas. Las mutaciones en la maquinaria de glicosilación conducen a una colonización disminuida de los tractos intestinales en ratones. Además, las composiciones farmacéuticas que comprenden ya sea (i) dicho heptasacárido o un conjugado del mismo o (ii) un anticuerpo dirigido contra el heptasacárido se sugieren para uso en vacunación en ganado, específicamente en aves de corral.

El documento WO20061119987 se refiere a proteínas N-glicosiladas recombinantes, que comprenden una o más secuencias consenso de aminoácidos optimizados N-glicosilados introducidos, ácidos nucleicos que codifican estas proteínas así como los vectores correspondientes y células hospedadoras. Además, el documento WO2006/1199 se refiere al uso de dichas proteínas, ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras para preparar medicamentos.

El género *Salmonella* es un miembro de la familia *Enterobacteriaceae*. El género está compuesto de bacilos gramnegativos que son anaerobios facultativos y flagelados (móviles). Poseen tres antígenos principales, el antígeno "H" o flagelar, el antígeno "O" o somático (parte del resto del LPS) y el antígeno "Vi" o capsular (denominado como "K" en otras *Enterobacteriaceae*). *Salmonella* también posee la endotoxina LPS característica de las bacterias gramnegativas. El LPS está compuesto de tres dominios: la parte del lípido A, también conocida como endotoxina, las moléculas de anclaje del LPS en la membrana externa, con sus cadenas de ácido graso. Está unida a través del núcleo interno que consiste en heptosas y KDO (ácido 3-deoxi-D-mano-octulosónico) conteniendo el núcleo externo hexosas y N-acetilhexosas. Unido a la última glucosa del núcleo externo se encuentra la región del antígeno O polimérico. Esta región está compuesta de 16 hasta >100 repeticiones de una estructura de oligosacáridos que contiene de cuatro a seis monosacáridos. La parte endotóxica del lípido A provoca fiebre y puede activar un complemento, quinina y factores de coagulación.

Durante algún tiempo las cepas de *Salmonella* han sido de interés para producir y presentar inmunógenos bacterianos. Por ejemplo, los genes que codifican las enzimas para la biosíntesis del antígeno O de *Shigella* se integraron genómicamente en una cepa de vacunación *aroA* de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium, que luego produjo un LPS híbrido (Fält et al., Microbial Pathogenesis 20:11-30, 1996). También, se clonaron los grupos necesarios para la biosíntesis del antígeno O de *Salmonella dysenteriae* en un vector de expresión estable, que luego se transfirió en la cepa para la vacunación contra la fiebre tifoidea Ty21a. La cepa resultante produce un LPS híbrido e induce inmunidad protectora contra la estimulación con *S. dysenteriae* (DE Qui Xu et al., Vaccine 25: 6167-6175, 2007).

La patente US-6.399.074 B1 divulga una vacuna de *Salmonella* atenuada viva para proteger a las aves contra la infección por microbios gramnegativos patógenos aviares. La vacuna es una cepa de *Salmonella* recombinantes que expresa el antígeno O de un microbio gramnegativo patógeno aviar tal como *E. coli* 078 que es patógeno en aves de corral. La cepa de *Salmonella* recombinante no expresa el antígeno O de *Salmonella* debido a una mutación en la polimerasa *rfl* del antígeno O (nomenclatura del nuevo gen *wzy*).

En vista de la técnica anterior, un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición para vacuna efectiva y segura, producida fácilmente a gran escala, de acción prolongada, y económica para prevenir y/o tratar las infecciones por *Campylobacter* en seres humanos y animales, en particular en el ganado, más particularmente en aves de corral.

Este objetivo se consigue al proporcionar en un primer aspecto, una *Salmonella enterica* que comprende al menos un operón *pgl* de *Campylobacter jejuni* o un derivado funcional del mismo y presenta al menos un N-glicano de *Campylobacter jejuni* o un derivado de N-glicano del mismo sobre su superficie celular, en el que están inactivados uno más genes de la biosíntesis de bacilosamina por mutación y/o delección parcial o completa, preferiblemente por delección parcial y/o completa de los genes *pgl*, *D*, *E*, *F*.

La cepa de *Salmonella* útil para la presente invención, puede ser cualquier cepa que sea o se pueda atenuar suficientemente para permitir su administración no patológica a seres humanos y/o animales en forma viva y/o muerta. Las cepas de *Salmonella* preferidas son las cepas de *Salmonella enterica* seleccionadas del grupo que consiste en las cepas de *Salmonella* Typhimurium, enteritidis, heidelberg, gallinorum, hadar, agona, kentucky, typhi e infantis, más preferiblemente las cepas de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium. *Salmonella* Typhimurium es especialmente útil para fines de vacunación debido a que la secuencia genómica está totalmente caracterizada y muchos estudios en animales confirman su uso médico seguro.

El término "operón *pgl*" en el sentido en el que se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier grupo de N-glicosilación fisiológicamente activo de los genes de *C. jejuni* con capacidad para la N-glicosilación de estructuras homologas o heterólogas producidas por la cepa de *Salmonella* de la invención. El operón *pgl* en *C. jejuni* codifica todas las enzimas necesarias para la síntesis del heptasacárido de N-glicano de *C. jejuni*, su transporte a través de la membrana interna y la transferencia a proteínas. *PglD*, *E*, *F* codifican las enzimas implicadas en la biosíntesis de bacilosamina, *PglC* transfiere la bacilosamina fosforilada al undecaprenilfosfato y *PglA*, *H* y *J* añaden los residuos GalNAc. El Glc de ramificación se une mediante *PglI*. La transferencia del heptasacárido completo se presenta a través de la acción de *PglK* y la oligosacariltransferasa *PglB* transfiere el N-glicano a la proteína.

Un derivado funcional de un operón *pgl* es un grupo de genes derivados de cualquier operón *pgl* de *C. jejuni*, que tenga delecciones, mutaciones y/o sustituciones de nucleótido(s) o genes enteros pero que todavía sea capaz de producir un oligo o polisacárido enlazable que se pueda unir a estructuras homologas o heterólogas producidas por la cepa de *Salmonella* de la invención. Uno o más operones *pgl* o derivados de los mismos se pueden integrar en el cromosoma de la cepa de *Salmonella* o se pueden introducir como parte de al menos un plásmido. Se prefiere la integración cromosómica debido a que es más estable en comparación con los vectores de plásmidos, la pérdida de

los cuales se podría presentar durante la propagación. Hay que señalar que la cepa de *Salmonella* de la invención puede comprender más de un operón *pgl* o derivado del mismo que produce uno o más *N*-glicanos o derivado(s) del mismo. De hecho, se prefiere que la cepa de la invención tenga más de un tipo de operón *pgl* que da por resultado más de una estructura de *N*-glicanos, que puede ser ventajoso para producir una respuesta inmunitaria más diversa en un ser humano o animal contra diferentes cepas de *C. jejuni*.

También hay que señalar que el nivel de expresión del *N*-glicano de *C. jejuni*, opcionalmente, se puede regular mediante el uso de diferentes promotores en la dirección 5' del operón *pgl*, incluyendo, pero sin limitarse a, promotores de genes de proteínas ribosómicas, por ejemplo, *spc* o *rpsm*, así como también promotores a partir de genes que codifican la resistencia a antibióticos similares a *bla* o similares y preferiblemente promotores potentes. Este tipo de regulación está disponible para los operones *pgl* codificados por plásmidos o integrados genómicamente. Además, la estabilidad del plásmido opcionalmente se puede mejorar mediante la inclusión de genes esenciales en el plásmido mientras que supriman estos genes en el genoma de la cepa de *Salmonella* de la invención. Las dianas preferidas abarcan por ejemplo, los genes que codifican las ARNt-transferasas similares a CysS.

La cepa de *Salmonella* de la invención es una que comprende al menos un operón *pgl* de *Campylobacter jejuni* o un derivado funcional del mismo, que presenta al menos un *N*-glicano de *Campylobacter jejuni* o un derivado *N*-glicano del mismo sobre su superficie celular, en la que están inactivados uno más genes de la biosíntesis de bacilosamina por mutación y/o deleción parcial o completa, preferiblemente por deleción parcial y/o completa de los genes D, E, F. En una realización más preferida, los genes *pglE* y *F* del operón *pgl* están completamente suprimidos y el gen *pglD* está parcialmente suprimido, por ejemplo, el marco de lectura abierto (ORF) de *pglD* termina después de los 270 pares de bases (el ORF de longitud total contiene 612 pares de bases).

En una realización preferida adicional, el gen *pglB* del operón *pgl* está inactivado, lo que significa que la oligosacariltransferasa B correspondiente no se expresa o está inactiva al menos enzimáticamente. El producto del gen *pglB* transfiere el *N*-glicano a un sitio específico aceptor de polipéptidos descrito más adelante. La inactivación de la transferasa hace que el *N*-glicano o el derivado de *N*-glicano se una exclusivamente al núcleo del lípido A aceptor del antígeno O en *Salmonella*.

En la realización más preferida, el derivado de *pgl* es uno, en el que uno o más genes para la biosíntesis de bacilosamina, *pg D, E, F* y la transferencia están inactivados y el gen *pglB* también está inactivado. Esta realización conduce al intercambio de GlcNAc para bacilosamina dando por resultado un aumento en la presentación celular, así como también en la transferencia del heptasacárido modificado al núcleo del lípido A en lugar de a los aceptores de polipéptidos.

El al menos un *N*-glicano de *C. jejuni* o un derivado del *N*-glicano del mismo puede ser cualquier *N*-glicano producido mediante cualquier operón *pgl* de *Campylobacter jejuni* o un derivado funcional del mismo. Por supuesto se prefiere que el *N*-glicano siga siendo inmunogénico, es decir, que produzca una respuesta inmunitaria específica para *C. jejuni*.

El operón *pgl* preferido, en el que los genes para la biosíntesis de bacilosamina están inactivados, preferiblemente están suprimidos parcial o totalmente, conduce a la síntesis de un derivado de *N*-glicano, es decir, el heptasacárido de la fórmula (II), que es GalNAc- α 1,4-GalNAc- α 1,4-[Glc- β -1,3]GalNAc- α 1,4-Gal-NAc- α 1,4-GalNAc- α 1,3-GlcNAc.

Sorprendentemente, el derivado de *N*-glicano de la fórmula (II) se presenta en mayores cantidades que el *N*-glicano de la fórmula (I) sobre la superficie de celular de las cepas de *Salmonella* de la presente invención y también es inmunogénico. Esto se confirma experimentalmente en la sección de ejemplo más adelante.

En una realización preferida, el *N*-glicano(s) o derivado(s) que resultan del al menos un operón *pgl* o un derivado del mismo, se pueden unir a al menos un polipéptido homólogo o heterólogo de *Salmonella* que eventualmente se transferirá a y se presentará en la superficie celular. preferiblemente, el al menos un *N*-glicano o derivado de *N*-glicano se une a un polipéptido que comprende al menos un secunón de consenso N-Z-S/T (véase Nita-Lazar M et al., Glycobiology. 2005; 15(4):361-7), preferiblemente D/E - X - N - Z - S/T (SEQ ID NO: 1), en la que X y Z pueden ser cualquier aminoácido natural, excepto Pro (véase Kowarik et al. EMBO J. 2006; 25(9):1957-66).

El polipéptido unido al *N*-glicano (derivado) puede ser cualquier tipo de polipéptido tal como un polipéptido puro (sólo aminoácidos) o un polipéptido modificado post-traducción, por ejemplo, un polipéptido unido a lípidos.

Para los polipéptidos heterólogos como vehículos del *N*-glicano(s) (derivados) se prefiere que comprendan la secuencia de señal MKKILLSVLTTFVAWLAAC (SEQ ID NO: 2) que dirige el conjugado *N*-unido hacia la membrana externa de la célula y en el que el motivo LAAC (SEQ ID NO: 3) se utiliza para la acilación de residuos de cisteína, que anclan el polipéptido en la membrana externa (véase también Kowarik et al., EMBO J. May 3;25(9):1957-66, 2006).

En la realización más preferida, el al menos un *N*-glicano o derivado del mismo que resulta de al menos un operón *pgl* o derivado del mismo está unido al núcleo del lípido A de *Salmonella* o un derivado funcionalmente equivalente del mismo. El núcleo del lípido A de *Salmonella* es una estructura de oligosacárido que consiste en hexosas, N-acetilhexosas, heptosas y KDO (ácido 3-deoxi-D-mano-octulosónico) unido a través de dos glucosaminas a seis cadenas de ácido graso que anclan la estructura en la membrana externa de la bacteria. Un derivado funcionalmente equivalente del núcleo del lípido A es uno capaz de aceptar uno o más glicanos o derivados del mismo y de presentarlos sobre la superficie celular. Se debe observar que en este caso el *N*-glicano o derivados de los mismos no está unido a N debido a que el lípido A de la estructura de *Salmonella* no es un polipéptido. El *N*-glicano está preferiblemente unido a GlcII en el núcleo del lípido A o un derivado funcional del mismo.

Preferiblemente, el al menos un *N*-glicano o derivado del mismo toma el lugar de las cadenas laterales del antígeno O en el LPS (lipopolisacárido). El núcleo del lípido A interno y externo de *Salmonella* permanece inalterado, mientras que la biosíntesis del antígeno O se anula a través de la mutación de *wbaP*. El *N*-glicano se transfiere a continuación mediante la ligasa WaaL del antígeno O y se une al residuo GlcII de la estructura de oligosacárido de núcleo externo del lípido A.

Se prefiere y para usos médicos es muy importante que la cepa de *Salmonella* de la invención no produzca efectos patógenos cuando se administre a un animal o ser humano en forma viva y/o inactivada. El experto conoce muchas formas de atenuar las especies de *Salmonella* virulentas mediante mutación. Las mutaciones preferidas para atenuar las cepas de *Salmonella* para uso en la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en *pab*, *pur*, *aro*, *aroA*, *asd*, *dap*, *nadA*, *pncB*, *galE*, *pmi*, *fur*, *rpsL*, *ompR*, *htrA*, *hemA*, *cdt*, *cya*, *crp*, *phoP*, *phoQ*, *rfc*, *poxA* y *galU*. Una o más de estas mutaciones pueden estar presentes. Se prefieren en mayor medida las mutaciones *aroA*, *cya* y/o *crp*.

Los genes para la biosíntesis del antígeno O de *Salmonella* se agrupan en el locus *rfb*, una región de ADN hipervariable del cromosoma de *Salmonella*. La inactivación parcial o total se ha asociado con la atenuación de las cepas de *Salmonella*. Por otro lado, el antígeno O también es un determinante antigénico importante para inducir inmunidad en un hospedador.

En una realización particularmente preferida, la cepa de *Salmonella* de la presente invención, se atenúa mediante la inactivación parcial o total de la expresión del antígeno O, preferiblemente mediante una o más mutaciones y/o deleciones en el grupo del gen *rfb*, más preferiblemente en el gen *wbaP*, los más preferiblemente deleción del gen *wbaP*.

Se entiende que en el sentido en el que se utiliza en la presente memoria, las expresiones "locus *rfb*" y "gen *wbaP*" significan que abarcan cualquier locus y gen correspondiente en cualquier cepa de *Salmonella* que sea capaz de expresar el antígeno O o los antígeno relacionados.

El producto génico *wbaP* es la fosfogalactosiltransferasa que inicia la biosíntesis del antígeno O mediante la adición de fosfogalactosa a undecaprenilfosfato. Su inactivación/deleción conduce a la anulación completa de la síntesis del antígeno O, el producto de azúcar que compite con el *N*-glicano(s) (derivados) de *C. jejuni* por el undecaprenilfosfato vehículo de lípido y por la transferencia mediante la ligasa WaaL. La *N*-glicosilación de proteínas inducida por el locus *pgl* y la síntesis del antígeno O dependiente de *wzy* en bacterias son procesos homólogos. Se encontró que la ligasa WaaL del antígeno O de *Salmonella* tiene una especificidad relajada de sustrato y que puede transferir el *N*-glicano de *C. jejuni* al núcleo del lípido A de *Salmonella*.

Por lo tanto, en la realización más preferida, la cepa de *Salmonella* de la invención tiene el gen *wbaP* mutado, lo que inactiva la enzima de fosfogalactosiltransferasa. Hay que señalar que este tipo de inactivación del antígeno O, no se ha descrito con anterioridad para fines de vacunación y es superior a los mutantes negativos para el antígeno O conocidos actualmente, debido a que se define genéticamente y permite aumentar la cantidad de los *N*-glicanos (derivados) de *C. jejuni* presentados en la superficie celular de las cepas de *Salmonella*.

Por lo tanto y como una invención independiente, la presente invención también se refiere a una cepa mutada de *Salmonella*, preferiblemente con una deleción, y de esta forma inactivada en el gen *wbaP*, que es útil para usos en vacunas de cepas de *Salmonella*, así como también, las cepas de *Salmonella* como vehículos de antígenos heterólogos, preferiblemente glicosilados, más preferiblemente antígenos *N*-glicosilados.

En la realización más preferida, la invención se refiere a *Salmonella enterica*, preferiblemente a una cepa serovar Typhimurium, que:

(a) comprende

(i) al menos un operón *pgl* de *Campylobacter jejuni* o un derivado funcional del mismo, en el que están inactivados uno o más genes para la biosíntesis de bacilosamina y

(ii) mutaciones y/o deleciones en el gen *wbaP* que conducen a la inactivación completa de la biosíntesis del antígeno O;

(b) y presenta sobre su superficie celular al menos un *N*-glicano de *Campylobacter jejuni* o un derivado de *N*-glicano del mismo, preferiblemente GalNAc-a1,4-GalNAc-a1,4-[Glc-β-1,3]GalNAc-a1,4-Gal-NAc-a1,4-GalNAc-a1,3-GlcNAc.

5 Las cepas de *Salmonella* descritas anteriormente de la invención son muy inmunogénicas y producen respuestas inmunitarias contra infecciones por *C. jejuni*. Además, una vez preparadas se pueden propagar fácilmente y producir a gran escala. Como una ventaja adicional, la administración de las mismas a un animal o ser humano proporciona inmunidad contra infecciones por *C. jejuni* y *Salmonella*. Las mismas se pueden administrar como vacunas muertas o vivas, las vacunas vivas permiten una propagación prolongada y un estímulo inmunitario sostenido en el
10 hospedador, así como también respuestas inmunitarias completas sin adyuvantes.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere al uso médico de cepas de *Salmonella* vivas o muertas, de la presente invención, en particular para preparar un medicamento, preferiblemente una vacuna.

15 Preferiblemente, el medicamento es útil para la prevención y/o tratamiento de infecciones por *Campylobacter jejuni* y, opcionalmente, *Salmonella*, preferiblemente infecciones en ganado, más preferiblemente en ganado vacuno y aves de corral, lo más preferiblemente en aves de corral, tales como pollos, pavos, gansos y patos.

20 Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica, alimento o pienso (aditivo) que comprende la *Salmonella enterica* muerta o viva de la presente invención y un excipiente fisiológicamente aceptable.

25 Por ejemplo, una composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar mediante el desarrollo a media o a gran escala de cepas de *Salmonella* de la invención que contienen el al menos un operón *pgl* codificado por plásmidos o integrado en el cromosoma o derivado del mismo. Esta *Salmonella* se puede utilizar directamente o se puede formular para adaptarse a la diana específica humana o animal y a la vía de administración específica. Las composiciones farmacéuticas que comprenden *Salmonella* viva se prefieren por razones obvias. Como alternativa, la invención se refiere a un alimento o pienso, aditivo alimentario o para pienso para seres humanos o animales, preferiblemente ganado, más preferiblemente aves de corral, que comprende la *Salmonella enterica* muerta o viva
30 de la presente invención y un excipiente fisiológicamente aceptable y/o producto alimenticio. Por ejemplo, este pienso podría reducir en gran medida la colonización de *C. jejuni* de bandadas de aves de corral y por consiguiente disminuir la oportunidad de infecciones humanas por *C. jejuni* y también infecciones por *Salmonella* a través de comida contaminada.

35 Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un método para tratar y/o prevenir infecciones por *C. jejuni* y, opcionalmente, por *Salmonella*, que comprende la administración de una composición farmacéutica de *Salmonella enterica*, alimento o pienso, aditivo alimentario o para pienso de la presente invención a un ser humano o animal que necesita del mismo en una cantidad fisiológicamente activa.

40 Para el uso terapéutico y/o profiláctico, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar en cualquier forma farmacéutica convencional mediante cualquier forma convencional. Las vías de administración incluyen, pero no se limitan a, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intranasal, intrasinovial, mediante infusión, sublingual, transdérmica, oral (por ejemplo, sonda gástrica), tópica o mediante inhalación. Los modos preferidos de administración son oral, intravenoso e intranasal, siendo los más preferidos oral e intranasal.
45

La *Salmonella* de la invención se puede administrar sola o en combinación con adyuvantes que mejoran la estabilidad y/o inmunogenicidad de las bacterias, facilitan la administración de las composiciones farmacéuticas que las contienen, proporcionan una solución o una dispersión aumentadas, aumentan la actividad propagativa, proporcionan terapia complementaria y similares, incluyendo otros principios activos.
50

Las formas farmacéuticas de la *Salmonella* descrita en la presente memoria incluyen vehículos y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables conocidos por los expertos en la materia. Estos vehículos y adyuvantes incluyen, por ejemplo, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, sustancias tampón, agua, sales, electrolitos, sustancias a base de celulosa, gelatina, agua, petrolato, aceite animal o vegetal, aceite mineral o sintético, solución salina, dextrosa u otros compuestos de sacárido y glicol tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol, antioxidantes, lactato, etc. Las formas farmacéuticas preferidas incluyen comprimidos, cápsulas, soluciones, suspensiones, emulsiones, polvos reconstituibles y parches transdérmicos. Los métodos para preparar las formas farmacéuticas son bien conocidos, véase, por ejemplo, H. C. Ansel and N. G. Popovich, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 5a ed., Lea and Febiger (1990) y, en particular, Pastoret et al., *Veterinary Vaccinology*, Elsevier March 1999). Los niveles y requisitos de dosificación están bien reconocidos en la técnica y se pueden seleccionar por aquellos con experiencia normal en la materia a partir de métodos y técnicas disponibles adecuados para un paciente particular. Según apreciará el experto, se pueden requerir dosis menores o mayores dependiendo de factores particulares. Por ejemplo, las dosificaciones específicas y regímenes de tratamiento dependerán de factores tales como el perfil de salud general del paciente (humano o animal) la gravedad y evolución del trastorno del paciente o la disposición al mismo, y el juicio del médico o veterinario responsable del tratamiento.
65

En una realización preferida para vacunación oral, el régimen consiste en la administración de *Salmonella* que contiene el operón *pgl* o un derivado del mismo ya sea en el plásmido o integrado en el cromosoma en el día 1 o 2 después de la incubación de los polluelos con aproximadamente 10^6 ufc (unidades formadoras de colonias) por polluelo con un refuerzo en los días 14 o 21 después de la incubación con la misma cantidad de bacterias. Estas dos administraciones proporcionarán estimulación suficiente para que el sistema inmunitario constituya una respuesta contra el *N*-glicano de *C. jejuni* o derivados del mismo, y también contra proteínas de *Salmonella* para proporcionar protección contra la última colonización de los pollos. Una alternativa para vacunar pollos es mediante la inyección intravenosa de bacterias inactivadas, por ejemplo, inactivadas por calor o inactivadas por formalina en el día 1 o 2 después de la incubación y un refuerzo en el día 14 o 21. Como una opción adicional, los polluelos también se pueden vacunar sólo una vez en un punto de tiempo posterior hasta las 3 semanas de edad, ya sea intravenosamente con bacterias inactivadas por calor o inactivadas por formalina o intragástricamente con bacterias vivas.

Por último, pero no menos importante, la presente invención se refiere a un método para producir *Salmonella enterica* de acuerdo con la invención, que comprende las etapas de:

- (i) introducir en *Salmonella enterica*, preferiblemente mediante al menos un vector de plásmido o mediante integración genómica, al menos un operón *pgl* de *C. jejuni* o un derivado funcional del mismo, preferiblemente al menos un operón *pgl*, en el que uno o más, preferiblemente todos los genes para la biosíntesis de bacilosamina están inactivados e
- (ii) introducir preferiblemente mutaciones y/o deleciones en el gen *wbaP* que conduzcan a la inactivación completa de la biosíntesis del antígeno O.

A continuación, la presente invención se ilustra adicionalmente haciendo referencia a realizaciones específicas y experimentos que no se pretende que se interpreten como limitantes del alcance de la invención según se presenta por las reivindicaciones anexas.

Figuras

La **Figura 1** es una representación esquemática de una presentación de un *N*-glicano de *C. jejuni* en *S. enterica* sv. Typhimurium:

- A) muestra la transferencia del *N*-glicano de *C. jejuni* a un núcleo del lípido A de *S. Typhimurium* en una cepa que produce antígeno O y que incorpora el operón *pgl_{mut}* ("mut" significa que *PglB* está inactivado mediante dos mutaciones puntuales);
- B) muestra una cepa $\Delta wbaP$ de *S. Typhimurium* sin ningún antígeno O e incorpora un operón *pgl3_{mut}* en el cual están suprimidos los genes para la biosíntesis de bacilosamina;
- C) ilustra las deleciones en el operón *pgl3_{mut}*.

La **Figura 2** ilustra la presentación de los *N*-glicanos de *C. jejuni* en *S. enterica* sv. Typhimurium:

- A) muestra una inmunotransferencia de un anti-*N*-glicano de *C. jejuni* de una SDS-PAGE de extractos de células enteras de *S. Typhimurium* de tipo silvestre y $\Delta wbaP$ tratadas con la proteinasa K de cepas portadoras de los plásmidos indicados y que muestra la presentación del *N*-glicano de *C. jejuni* en el núcleo del lípido A de *S. Typhimurium*.
- B) es una SDS-PAGE teñida con plata (panel izquierdo) y una inmunotransferencia de un anti-antígeno O de *Salmonella* del grupo B (panel derecho) de una SDS-PAGE de extractos de células enteras de *S. Typhimurium* de tipo silvestre y $\Delta wbaP$ tratados con la proteinasa K. Se confirma la falta del antígeno O polimérico en la cepa $\Delta wbaP$.
- C) muestra una inmunotransferencia de un anti-*N*-glicano de *C. jejuni* de una SDS-PAGE de la cepa $\Delta wbaP$ de *S. Typhimurium* con un vector vacío integrado (control) o un operón *pgl3_{mut}* integrado y prueba la expresión del *N*-glicano de *C. jejuni* sobre el núcleo del lípido A de *S. Typhimurium* $\Delta wbaP$ con un operón *pgl3_{mut}* integrado.
- D) representa en el panel izquierdo una inmunotransferencia utilizando suero de un ratón infectado intravenosamente con *S. Typhimurium* $\Delta wbaP$ destruida por calor que presenta el *N*-glicano de *C. jejuni* con GlcNAc en el extremo reductor y codificado por *pgl3_{mut}*. Es evidente el reconocimiento de *C. jejuni* tipo silvestre, pero no de las células de 81-176*pglB* de *C. jejuni* BI-116*pglB*. El panel derecho muestra una SDS-PAGE teñida con azul de Coomassie de las muestras utilizadas en el análisis de inmunotransferencia de los sueros de ratón.

La **Figura 3** representa las pruebas *in vitro* utilizadas para demostrar la atenuación de *S. Typhimurium* $\Delta wbaP$

- A) muestra una sensibilidad aumentada de *S. Typhimurium* $\Delta wbaP$ para el complemento en el suero humano: la destrucción mediada por el complemento de la cepa tipo silvestre serovar Typhimurium resistente a kanamicina, M939, antígeno O negativo $\Delta wbaP::cat$ (SK111) y el mutante complementado $\Delta wbaP::pK19$ (SK133) se probó incubando una mezcla 1:1:1 de *Salmonella* tipo silvestre, $\Delta wbaP$ y $\Delta wbaP::pK19$ (SK133)

$\Delta wbaP$:pKI9 (SKI33) para los puntos de tiempo indicados junto con suero humano al 20 % o suero humano inactivado por calor al 20 %. La supervivencia se analizó mediante el sembrado en medios de diferenciación; B) representa el resultado del ajuste experimental de A), pero que difiere en el uso del suero inactivado por calor. Ninguna de las cepas se vio afectada en la supervivencia; C) ilustra el defecto de *S. Typhimurium* $\Delta wbaP$ en la motilidad de natación en comparación con *S. Typhimurium* tipo silvestre y la cepa no móvil *fliGHI:Tn10*.

La **Figura 4** ilustra una capacidad de colonización reducida para *S. Typhimurium* $\Delta wbaP$ en un experimento de co-infección con *S. Typhimurium* tipo silvestre:

A) presenta gráficamente los índices competitivos (CI; salida (mutante/tipo silvestre) / entrada (mutante/tipo silvestre) de serovar *Typhimurium* $\Delta wbaP$ (SK112) y tipo silvestre determinado en los días 1-3 después de la infección en heces y en el día 4 después de la infección en el contenido cecal que demuestra una capacidad de colonización reducida de *S. Typhimurium* $\Delta wbaP$ en comparación con el tipo silvestre;

B) CI en mLN (ganglios linfáticos mesentéricos), bazo e hígados en el día 4 después de la infección.

Ejemplos

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

En la Tabla 1 se proporciona un resumen de las cepas bacterianas utilizadas para los experimentos mostrados en los ejemplos. Las bacterias se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) (10 g/l de triptona Bacto, 5 g/l de extracto de levadura Bacto, 5 g/l de NaCl). Las placas de agar con LB se suplementaron con agar al 1,5 % (p/v). Los antibióticos se utilizaron en las siguientes concentraciones finales: ampicilina (amp) 100 µg/ml, kanamicina (kan) 50 µg/ml, cloranfenicol (cam) 25 µg/ml, estreptomycin (strep) 50 µg/ml, tetraciclina (tet) 10 µg/ml.

Ejemplo 1 - Presentación del *N*-glicano de *C. jejuni* sobre el núcleo del lípido A de *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium*

La biosíntesis del antígeno O dependiente de Wzy y la biosíntesis del *N*-glicano de *C. jejuni* son procesos homólogos (Feldman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 102(8):3016-21, 2005) los cuales se inician con el ensamble de una estructura de oligosacárido sobre un enlazador de undecaprenilpírofosfato. La homología de las dos vías, así como también la especificidad por el sustrato relajada de la ligasa WaaL del antígeno O de *S. enterica* sv. *Typhimurium* (Fält et al., Microbial Pathogenesis 20:11-30, 1996; De Qui Xu et al., Vaccine 25: 6167-6175, 2007) se exploraron para determinar la posibilidad de combinar las vías para que presenten el *N*-glicano de *C. jejuni* sobre el núcleo del lípido A de *Salmonella*.

Un plásmido que contiene el operón *pgl_{mut}* de *C. jejuni* con PglB inactivado (pACYC*pgl_{mut}*; Wacker et al 2002) se introdujo en una cepa de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* mediante electroporación. Como control negativo se utilizó el vector vacío pACYC184 correspondiente.

Los glicoconjugados de los transformantes se analizaron en cuanto a la presentación del *N*-glicano de *C. jejuni* mediante SDS-PAGE y la posterior inmunotransferencia con un antisuero anti-*N*-glicano de *C. jejuni* (Amber 2008). Las muestras se prepararon de la siguiente manera: el equivalente de 2 DO₆₀₀/ml de cultivos en crecimiento en fase logarítmica de *S. enterica* sv *Typhimurium* que contiene pACYC184 o pACYC*pgl_{mut}* se centrifugaron a 16.000 g durante 2 minutos y se desechó el sobrenadante. Las células se volvieron a suspender en 100 µl de tampón de muestra Lämmli (Tris-HCl 0,065 M pH 6,8, SDS al 2 % (p/v), β-mercaptoetanol al 5 % (v/v), glicerina al 10 % (v/v), azul de bromo-fenol (p/v) al 0,05 %) y se lisaron durante 5 minutos a 95 °C. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió proteinasa K (Gibco/Life Technologies) (concentración final 0,4 mg/ml) y se incubó a 1 hora a 60 °C antes de cargar cantidades iguales en una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 15 %. Para detectar el *N*-glicano de *C. jejuni*, se utilizó un antisuero policlonal de conejo contra el *N*-glicano de *C. jejuni* (S. Amber, PhD.-thesis, ETH Zürich, Departament of Biological Science, Zürich, 2008). La visualización de señales se llevó a cabo en un conjugado de cabra anti-IgG de conejo-HRP (Santa Cruz) y ECL (Amersham) como se recomendaba por el fabricante. El *N*-glicano de *C. jejuni* se podía detectar en el núcleo del lípido A de *S. enterica* sv. *Typhimurium* cuando pACYC*pgl_{mut}* estaba presente en las células (Figura 2A carril 2), pero no si el vector vacío se había introducido en las células (Figura 2A carril 1). Esto muestra que WaaL de *S. enterica* de sv *Typhimurium* transfiere el *N*-glicano de *C. jejuni* desde el undecaprenilpírofosfato hasta el núcleo del lípido A.

Ejemplo 2 - Construcción de una delección *wbaP* en *Salmonella enterica* sv *Typhimurium* y aumento de la presentación del *N*-glicano de *C. jejuni* en la cepa antígeno O negativo

La delección de la biosíntesis del antígeno O se supone que anuló la competición entre la vía de biosíntesis del antígeno O y la biosíntesis del *N*-glicano de *C. jejuni* por el undecaprenilfosfato vehículo de lípidos.

La construcción de un mutante de delección *wbaP* de *S. Typhimurium* tipo silvestre SL1344 se llevó a cabo como se describe (Datsenko and Wanner, PNAS USA 97 (12):6640-5, 2000). Se sintetizaron los cebadores RfbP H1P1 (para

la secuencia véase la tabla 1) y RfbP H2P2, se hibridaron al molde de ADN del plásmido PKD3, que lleva un gen de resistencia a cloranfenicol flanqueado por los sitios FRT (diana de reconocimiento FLP). Estos cebadores también contienen de 40 a 45 nucleótidos adicionales correspondientes a las regiones directamente en la dirección 5' y la dirección 3' del gen *wbaP*. Se utilizaron para amplificar un casete génico para una delección en fase de *wbaP* como se describe (Datsenko and Wanner, véase lo anterior). Después de la expresión inducida por arabinosa de la λ Red recombinasa a partir del plásmido pKD46 en la cepa SL1344 de *S. Typhimurium* tipo silvestre, la recombinasa intercambió el gen diana con el casete de cloranfenicol del producto de la PCR introducido mediante electroporación. Los transformantes se seleccionaron mediante la siembra en placas sobre placas con cloranfenicol a 37 °C durante la noche y se confirmó la presencia del gen *cat* en la posición correcta en el genoma mediante PCR. El clon resultante resistente a cloranfenicol (*wbaP::cat*) se denominó SK111. La eliminación del casete de resistencia a cloranfenicol fue posible utilizando pCP20 que codifica la recombinasa FLP que reconoce las regiones flanqueante FRT y la cepa resultante se denominó SK112, después de la verificación mediante PCR (véase también Ilg, Endt et al., Inf. Immun., 77, 2568, junio de 2009).

El análisis fenotípico de los glucoconjugados de la cepa resultante se realizó mediante SDS-PAGE seguido por una tinción posterior de los glucoconjugados con plata. Para la SDS-PAGE, las muestras se prepararon como sigue: el equivalente de 2 DO₆₀₀/ml de cultivos en crecimiento en fase logarítmica de *S. Typhimurium* tipo silvestre o *S. Typhimurium* $\Delta wbaP$ (SK112) se sometió a centrifugación a 16,000 g durante 2 minutos y se desechó el sobrenadante. Las células se volvieron a suspender en 100 μ l de tampón de muestra Lämmli (Tris-HCl 0,065 M, pH 6,8, SDS al 2 % (p/v), β -mercaptoetanol al 5 % (v/v), glicerina al 10 % (v/v), azul de bromofenol al 0,05 % (p/v)) y se lisaron durante 5 minutos a 95 °C. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió proteinasa K (Gibco/Life Technologies) (concentración final de 0,4 mg/ml) y se incubaron 1 hora a 60 °C antes de cargar cantidades iguales en una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12 %. Para detectar el antígeno O de *S. Typhimurium*, se utilizaron los factores 1, 4, 5, 12 del grupo B del antisuero O de *Salmonella* (Difco). La visualización de las señales se llevó a cabo en un conjugado de cabra anti-IgG de conejo-HRP (Santa Cruz) y ECL (Amersham) como se recomendaba por el fabricante. Para la tinción, se utilizó el método de Tsai and Frasch (Tsai and Frasch, Anal Biochem. 119(1): 115-9, 1982).

La delección del gen que codifica la fosfogalactosiltransferasa *WbaP* en *S. enterica* tipo silvestre condujo a la anulación de la biosíntesis del antígeno O como se puede ver en la Figura 2B. La SDS-PAGE con la tinción posterior de los glucoconjugados con plata, así como también una SDS-PAGE seguido por una inmunotransferencia con el anti-antisuero O específico del grupo B de *Salmonella* mostró el patrón típico de sucesión de lipopolisacáridos del antígeno O polimérico para la cepa *S. enterica* sv. *Typhimurium* tipo silvestre y la ausencia de este patrón en la cepa $\Delta wbaP$.

Esta *S. enterica* sv. *Typhimurium* $\Delta wbaP$ SK112 antígeno O negativo se ensayó para determinar su capacidad para presentar el *N*-glicano de *C. jejuni* sobre su superficie celular. Mediante electroporación se introdujeron los plásmidos pACYCpglmut o pACYC184. Los glicoconjugados de los transformantes se analizaron como se describe en el ejemplo 1. El *N*-glicano de *C. jejuni* se podía detectar en mayores intensidades en el carril que contiene la cepa $\Delta wbaP$ en comparación con la de tipo silvestre (Figura 2A, carril 4 frente a carril 2). No se pudo detectar ningún *N*-glicano de *C. jejuni* cuando estaba presente el vector vacío pACYC184 en la *S. enterica* sv. *Typhimurium* $\Delta wbaP$ SK112. Esto demuestra que en la cepa $\Delta wbaP$ se transfirió más *N*-glicano de *C. jejuni* al núcleo del lípido A.

Ejemplo 3: Construcción de un operón *pgl*_{mut} de *C. jejuni* alterado que conduce a una presentación aumentada del *N*-glicano de *C. jejuni* sobre *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium*

En *C. jejuni*, el *N*-glicano se sintetizó como el heptasacárido GalNAc5(Glc)-Bac, donde Bac, el azúcar en el extremo reductor, es 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxi-glucopiranososa. En *E. coli* y *S. Typhimurium* Bac no se sintetizó a menos que la maquinaria para la biosíntesis de *N*-glicano de *C. jejuni* se expresase de manera heteróloga. Se ha mostrado que en las células de *E. coli* tipo silvestre que co-expresan la maquinaria para la biosíntesis de *N*-glicano de *C. jejuni* se sintetizan dos tipos diferentes de *N*-glicano, uno con Bac en el extremo reductor y uno con GlcNAc. Este fenómeno se pudo atribuir a la acción de *WecA*, un UDP-GlcNAc: undecaprenilfosfato GlcNAc-1-fosfato transferasa implicado en la biosíntesis de glucolípidos (Linton D. et al., Mol. Microbiol., 55(6):1695-703, 2005). Como se sabe que la ligasa *WaaL* del antígeno O de *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium* puede transferir estructuras que contienen GlcNAc al núcleo del lípido A, se especuló que un *N*-glicano que contiene GlcNAc podría ser un mejor sustrato para *WaaL* que un *N*-glicano que contiene Bac. Se construyó un operón *pgl*_{mut} donde se habían suprimido totalmente los genes para la biosíntesis de bacilosamina, concretamente, *pglD*, *E*, *F*, *G*. Los genes que codifican *PglE*, *F*, *G* fueron completamente suprimidos, mientras que el único que codifica *pglD* se suprimió parcialmente. El marco de lectura abierto (ORF) de *pglD* en el operón *pgl* alterado termina después de 270 pares de bases, mientras que el ORF de longitud total contiene 612 pares de bases. El procedimiento para construir este operón *pgl*_{mut} alterado se llevó a cabo utilizando *E. coli* DH5 α como una cepa hospedadora para la propagación de plásmidos y es la siguiente: el ADN de pACYCpglmut se digirió con *Alw441* y *SmaI*, luego, el *Alw441* que sobresalía se rellenó con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y se volvió a ligar. El operón resultante se denominó pACYCpgl3mut y se transformó en la cepa $\Delta wbaP$. Los glucoconjugados de los transformantes resultantes se analizaron como se describe en el ejemplo 1. El *N*-glicano de *C. jejuni* se pudo detectar en mayores intensidades en el carril que contiene la cepa $\Delta wbaP$ con el operón *pgl*_{3mut} que en el carril que contiene la cepa $\Delta wbaP$ con el operón *pgl*_{3mut},

cuando se comparan con el tipo silvestre (Figura 2A, carril 5 frente a carril 4). En conjunto, la cepa $\Delta wbaP$ con el $pgI3_{mut}$ mostró las mayores intensidades cuando se ensayaba con el antisuero anti-*N*-glicano de *C. jejuni* y por lo tanto, demuestra los mayores niveles de *N*-glicano de *C. jejuni* presentados en el núcleo del lípido A de *Salmonella enterica* sv Typhimurium.

5 **Ejemplo 4: Integración del operón $pgI3_{mut}$ en el genoma de la cepa *Salmonella enterica* sv Typhimurium $\Delta wbaP$ antígeno O negativo**

10 Para garantizar la presentación continua del *N*-glicano de *C. jejuni* sobre el núcleo del lípido A de la cepa *Salmonella enterica* sv Typhimurium $\Delta wbaP$ *in vivo*, el operón $pgI3_{mut}$ se integró en el genoma de la cepa $\Delta wbaP$ SK112 en la dirección 3' del gen *pagC*.

15 Todas las etapas de clonación que implican un plásmido suicida con el oriR6K se realizaron en *E. coli* CC118 λ pir. El plásmido suicida integrativo final pKI15 se construyó de la siguiente forma: un homólogo de secuencia de 512 pb con la región diana en el genoma de *Salmonella* se amplificó mediante PCR con los cebadores 3' *PagC* Fw NotI y 3' *PagC* Rev SacII (ver secuencia en la Tabla 1). El fragmento de ADN resultante se insertó con SacII y NotI en pSB377 y el plásmido se denominó pKI14 después de la verificación de la secuencia de inserción. pKI15 se construyó mediante la digestión del ADN de pACYC*pgI3mut* con BamHI y Ehel mientras que se digería pKI14 con BamHI y SmaI. El corte del fragmento de 11083 pares de bases de pACYC*pgI3mut* se ligó a continuación con la estructura de pKI14. Ya que la electroporación de los plásmidos suicidas en las cepas de *Salmonella* es muy ineficiente, primero se introdujeron pKI15 o pKI14 en *E. coli* Sm10 λ pir para la conjugación mediante electroporación. Sm10 λ pir que contiene pKI15 o pKI14 se conjugó a continuación con SKI12. Para la conjugación, los equivalentes de 4 DO₆₀₀ de cultivos en fase logarítmica tardía de Sm10 λ pir que contiene pKI15 y SKI12 se centrifugaron y se lavaron tres veces con 1 ml de LB. Los sedimentos se volvieron a suspender en 100 μ l de LB, se combinaron y se diseminaron con un diámetro de 3 cm sobre una placa agar de LB que luego se incubó durante la noche a 37 °C. Las bacterias se extrajeron mediante lavado de la placa a la siguiente mañana con 1 ml de LB y se sembraron varias diluciones en placas en LB (+strep+tet) con selección para los conjugantes. Las cepas resultantes se denominaron SKI34 (SKI12::pKI14) y SKI35 (SKI12::pKI15).

20 Para probar el *N*-glicano de *C. jejuni* en el núcleo del lípido A de las cepas antígeno O negativo que contenían el grupo $pgI3_{mut}$ integrado o el vector vacío integrado como un control negativo, se prepararon extractos de células enteras de SKI34 y SKI35 y se analizaron como se describe en el ejemplo 1. La Figura 2C es una inmunotransferencia detectada con antisuero anti-*N*-glicano de *C. jejuni* que muestra señales intensas en el carril 2 que contiene SKI35 pero ninguna señal para el carril 1 que contiene SKI34. Esto demuestra una transferencia eficiente del *N*-glicano de *C. jejuni* al núcleo del lípido A de *Salmonella enterica* sv Typhimurium a partir de un operón $pgI3_{mut}$ integrado.

35 **Ejemplo 5: Inmunogenicidad del glicano codificado por el operón $pgI3_{mut}$**

40 Para investigar la inmunogenicidad del glicano codificado por $pgI3_{mut}$, se infectaron ratones con la bacteria inactivada por calor SKI12 +pML*pgI3mut* y sus sueros se analizaron para los anticuerpos anti-*N*-glicano de *C. jejuni*. El experimento se llevó a cabo como sigue:

45 Experimentos para infección de ratones

Las infecciones por *Salmonella* se realizaron en jaulas ventiladas individualmente en el RCHCI, Zurich, como se describió anteriormente (Stecher, Hapfelmeier et al., Infection Infect Immun. 2004 Jul; 72(7):4138-50 2004). Para la infección intravenosa, los ratones se inyectaron en la vena de la cola con 5 x 10⁵ UFC de *S. Typhimurium* SL1344 $\Delta wbaP$ (SKI12) inactivado con calor que porta pMLBAD (control) o pML*pgI3mut*. Después del análisis de los sueros en el día 29 después de la infección, los ratones se volvieron a inyectar con las mismas cepas bacterianas en el día 36 y los sueros se analizaron en el día 50.

50 Análisis de los sueros de ratón

55 Los sueros de ratón se analizaron para la producción de los anticuerpos anti-*N*-glicano de *C. jejuni* mediante inmunotransferencia contra extractos de células enteras de *C. jejuni* 81-176 y 81-176*pgIB* (control negativo). *C. jejuni* 81-176*pgIB* no produce proteínas glucosiladas y sirvió como control negativo. Se prepararon extractos de células enteras mediante recolección de *C. jejuni* de las placas de crecimiento bacteriano confluyente con 1 ml de PBS. Después de ajustar las muestras con PBS a la misma densidad óptica, las células se recolectaron mediante centrifugación durante 2 minutos a 16.000 x g a temperatura ambiente. Las células se lisaron durante 5 minutos a 95 °C en tampón de muestra Lämmli (Tris-HCl 0,065 M, pH 6,8, SDS al 2 % (p/v), β -mercaptoetanol al 0,05 % (v/v), glicerina al 10 % (v/v), azul de bromofenol al 5 % (p/v)) añadidos a los mismos volúmenes finales que los determinados anteriormente con PBS para proporcionar la misma cantidad de células en cada muestra. Esto se confirmó al separar volúmenes iguales de cada muestra mediante SDS-PAGE seguido por tinción de proteínas con azul de Coomassie. Adicionalmente, la proteína AcrA glucosilada y sin glucosilar se utilizó para visualizar una respuesta inmunitaria contra el *N*-glicano de *C. jejuni*. Para el análisis de los sueros de ratón, se separaron

volúmenes iguales de extractos de células enteras, así como también cantidades iguales de AcrA glucosilada y sin glucosilar mediante SDS-PAGE seguido por la transferencia de las proteínas a una membrana de fluoruro de polivinilideno para la detección mediante inmunotransferencia. Los sueros de ratón sirvieron como antisueros primarios en el primer paso de incubación. Se identificaron IgG unidos mediante un conjugado anti-IgG de ratón-HRP (Bethyl Laboratories). La detección se realizó con ECL (Amersham) de acuerdo con el fabricante.

La Figura 2D, muestra la presencia IgG anti-N-glicano de *C. jejuni* en sueros de ratón 61 días después de la re-infección. Los anticuerpos no reconocieron la AcrA sin glucosilar ni los extractos de proteínas sin glucosilar de *C. jejuni* y por lo tanto se demostró la especificidad para el glicano. No se pudo observar ninguna reacción específica del N-glicano con los sueros de ratones infectados con las cepas control (datos no mostrados).

Ejemplo 6: Fenotipo atenuado de *S. Typhimurium* $\Delta wbaP$

La atenuación de *S. Typhimurium* $\Delta wbaP$ se probó en diversos métodos *in vitro* e *in vivo*. El método *in vitro* consistió en analizar el mutante, así como también el tipo silvestre en cuanto su resistencia al suero, motilidad y resistencia al péptido antimicrobiano que imita polímixina B. La capacidad de colonización de $\Delta wbaP$ se analizó en un experimento de co-infección *in vivo*.

Análisis de la resistencia al suero

La actividad bactericida del complemento se analizó esencialmente como se describe (Bengoechea, Najdenski et al. 2004). En resumen, serovar *Typhimurium wbaP::cat* (SK111), M939, un derivado resistente a kanamicina de la cepa serovar *Typhimurium* SL1344 tipo silvestre (*aph* integrado en la dirección 3' de *sopE*) y las células de serovar *Typhimurium* $\Delta wbaP::pKI9$ (SK133) extraídas de cultivos en crecimiento exponencial se mezclaron en cantidades iguales (3×10^8 ufc/ml para M939, 4×10^8 ufc/ml para SK111 y SK133) y se diluyeron 5×10^4 veces antes de utilizarse en $1 \times$ PBS estéril. Este cultivo bacteriano diluido se mezcló 1:1 con suero humano al 20 % que no contenía anticuerpos contra LPS de serovar *Typhimurium* y se incubaron a 37 °C, con agitación ligera. Se tomaron alícuotas a 0, 15 y 30 minutos después del mezclado y la actividad complementaria se inactivó mediante la adición de caldo de infusión de corazón y cerebro. Las alícuotas se mantuvieron en hielo hasta la siembra en placas sobre LB (strep, kan) que se seleccionaron para el tipo silvestre, LB (Sm, Cam) que se seleccionaron para *wbaP::cat* y LB (Sm, Tet) para determinar las UFC de $\Delta wbaP::pKI9$. El mismo experimento se llevó a cabo utilizando suero donde el complemento se inactivó por calor a 56 °C durante 30 minutos.

Los datos se muestran como la media del log UFC \pm desviaciones estándar. La figura 3A, muestra la resistencia al suero disminuida de *S. Typhimurium* $\Delta wbaP$ en comparación con el tipo silvestre: después de 30 minutos de incubación con suero humano al 20 %, los recuentos para $\Delta wbaP$ fueron sesenta veces menores que al inicio del periodo de incubación. La figura 3B, representa las mismas cepas incubadas con suero inactivado por calor como control negativo.

Ensayo de motilidad para nadar

Debido a que la motilidad de las bacterias es un factor de virulencia conocido, la motilidad de las bacterias se analizó en placas de agar blando (0,3 % (p/v) de agar, 5 g/l de NaCl, 10 g/l de Bacto tripton). Se extendieron 1 μ l de cultivos durante la noche de serovar *Typhimurium* tipo silvestre (SL1344), serovar *Typhimurium* $\Delta wbaP$ (SK112), serovar *Typhimurium* $\Delta wbaP::pKI9$ (SK133) o serovar *Typhimurium fliGHI::Tn10* (M933) en la mitad de las placas y la motilidad se cuantificó midiendo el diámetro del halo visible después de 4,75 horas y 9,5 horas de incubación a 37 °C.

Cada experimento se llevó a cabo por triplicado en dos ocasiones diferentes y los datos se muestran como las medias \pm desviaciones estándar. Como es visible en la figura 3C, la motilidad disminuyó fuertemente en $\Delta wbaP$ (SK112) en comparación con el tipo silvestre, pero todavía seguía siendo superior respecto al control no motil *fliGHI::Tn10*.

Análisis de la resistencia a polimixina B

El equivalente de 1 DO₆₀₀/ml de cultivos en crecimiento exponencial a partir de la cepa serovar *Typhimurium* tipo silvestre SL1344 o serovar *Typhimurium* $\Delta wbaP$ (SK112) se centrifugaron, se resuspendieron en 150 μ l de $1 \times$ PBS estéril frío y se diluyó y 5×10^6 veces antes de utilizarse. Para el ensayo, se mezclaron 45 μ l de los cultivos diluidos con 5 μ l de polimixina B (Sigma, 1 μ g/ml concentración final) o 5 μ l de PBS y se incubaron durante 1 hora a 37 °C, bajo agitación ligera. Después de la adición de 80 μ l de LB las bacterias se sembraron en placas de LB agar que contienen estreptomycin. La eficiencia de la supervivencia se calculó dividiendo las UFC (unidades formadoras de colonias) del cultivo tratado con péptidos entre las UFC del cultivo sin tratar multiplicado por 100. El ensayo se realizó por triplicado en dos experimentos independientes y los datos se muestran como las medias \pm desviaciones estándar. La resistencia a polimixina B disminuida de *S. Typhimurium* $\Delta wbaP$ comparado con el tipo silvestre se pone de manifiesto en la figura 3D.

Capacidad de colonización de $\Delta wbaP$ en un experimento de co-infección

La capacidad de colonización de *S. Typhimurium* $\Delta wbaP$ se probó en un experimento de co-infección en el cual los ratones se infectaron intragástricamente con el mutante $\Delta wbaP$, así como con la cepa tipo silvestre. Los ratones C57BL/6 (SPF, colonia del RCHCI, Zurich) se pre- trataron mediante sonda gástrica con 20 mg de estreptomicina. Veinticuatro horas después los ratones se inocularon con 5×10^7 UFC de la cepa serovar Typhimurium o las mezclas de las 2 cepas como se indica. Las cargas bacterianas (UFC) en sedimentos fecales frescos, nodos linfoides mesentéricos (mLN), bazo, y contenido cecal se determinaron mediante la siembra en placas sobre placas de agar MacConkey (50 μ g/ml de estreptomicina) como se ha descrito anteriormente (Barthel, Hapfelmeier et al. 2003). Los índices competitivos (CI) se determinaron de acuerdo con la fórmula $CI = (\text{mutante/tipo silvestre}) \text{ salida}/(\text{mutante/tipo silvestre}) \text{ entrada}$ después de la siembra en placa. Se realizó un experimento de co-infección de serovar Typhimurium tipo silvestre (M939) y la cepa $\Delta wbaP$ (SKI11). Cinco ratones tratados con estreptomicina se infectaron con una mezcla 1:2 (total 5×10^7 UFC) intragástricamente de la cepa $\Delta wbaP$ (SKI11) y la cepa tipo silvestre. La proporción de las 2 cepas (CI; índice competitivo, véase Materiales y Métodos) se determinó en las heces en el día 1, 2 y 3 p.i. Se detectó una disminución de los recuentos de $\Delta wbaP$ (SKI11) en comparación con el tipo silvestre (una escala logarítmica por día) y se probó que la cepa $\Delta wbaP$ (SKI11) de hecho tuvo un defecto competitivo importante en comparación con la cepa serovar Typhimurium tipo silvestre en el tracto intestinal ($p > 0,05$; figura 4A). Además, el CI de las dos cepas en los sitios sistémicos (mLN, hígado, bazo) en el día 4 p.i. también demostró un defecto competitivo significativo de serovar Typhimurium $\Delta wbaP$ (SKI12). Sin embargo, el defecto era menos pronunciado que en el intestino (Figura 4B).

Tabla 1: Cepas, plásmidos y cebadores para la delección de *wbaP* utilizados en este trabajo

Cepas de <i>Salmonella enterica</i> sv Typhimurium		
Cepa	Genotipo y fenotipo	Fuente de la referencia
SL1344	tipo silvestre; strep ^R	Hoiseth, S. K. and B. A. Stocker, Nature 291:238-239, 1981
SKI11	SL1344 $\Delta wbaP::cat$; strep ^R , cam ^R	este estudio
SKI12	SL1344 $\Delta wbaP$; strep ^R	este estudio
SKI34	SKI12::pKI14; strep ^R , tet ^R	este estudio
SKI35	SKI12::pKI15; strep ^R , tet ^R	este estudio
Cepas de <i>Escherichia coli</i>		
DH5a	SupE44 $\Delta lacU169$ ($\Phi 80 lacZ \Delta M15$) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, D., J. Mol. Biol., 5,166(4):557-80, 1983
CC118 λpir	$\Delta(ara-leu)$, <i>araD</i> , $\Delta lacX74$, <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>phoA20</i> , <i>thi-1</i> , <i>rpsE</i> , <i>rpoB</i> , <i>argE(Am)</i> , <i>recA</i> , λpir	Herrero, M., V. de Lorenzo, and K. N. Timmis. J Bacteriol 172:6557-6567.
Sm10 λpir	<i>thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4</i> 2-Tc::Mu λpir , kan ^R	Miller, V. L. and J. J. Mekalanos. J. Bacteriol. 170:2575-2583, 1988.
Plásmidos		
Plásmido	Genotipo	Fuente de referencia
pSB377	tet ^R <i>oriR6K</i>	Mirold et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:9845-9850, 1999.
pKD3	<i>bla</i> FRT <i>cat</i> FRT PS1	Datsenko, K. A. and B. L.
	PS2 <i>oriR6K</i>	Wanner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:6640-6645, 2000.
pKD46	<i>bla</i> P _{BAD} <i>gam bet exo</i> pSC101 <i>oriTS</i>	Datsenko, K. A., and B. L. Wanner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:6640-6645, 2000.
pCP20	<i>bla cat</i> cl857 λP_R <i>flp</i> pSC101 <i>oriTS</i>	Datsenko, K. A., and B. L. Wanner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:6640-6645, 2000
pACYC184	Cm ^R , Tc ^R , <i>ori</i> p15A	New England Biolabs
pACYC <i>pgl</i> _{mut}	Cm ^R , <i>ori</i> p15A; grupo <i>C. jejuni pgl</i> con <i>pglB</i> ^{W458A,D459A} clonado en pACYC184	Science, 298(5599):1790-3, 29. Nov. 2002
pACYC <i>pgl</i> _{3mut}	Cm ^R , <i>ori</i> p15A; grupo <i>C. jejuni pgl</i> con <i>pglB</i> ^{W458A,D459A} clonado en pACYC184, delección en <i>pglE</i> , <i>F</i> , <i>G</i> y 3'- mitad de <i>pglD</i>	Este estudio
pKI14	Tet ^R , <i>oriR6K</i> , región de 500 pb 3' de <i>PagC</i> clonado en pSB377	Este estudio
pKI15	Tet ^R , <i>oriR6K</i> , grupo <i>C. jejuni pgl3mut</i> con <i>pglB</i> ^{W458A,D459A} clonado en pKI15	Este estudio
Cebadores para la delección de <i>wbaP</i>		
RfbP H1P1		

		CTTAATATGCCTATTTTATTACATTATGCACGGTCAG AGGGTGAGGATTAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	
		(SEQ ID NO: 4)	
	RfbP H2P2	GATTTTACGCAGGCTAATTTATACAATTATTATTTCAGT ACTTCTCGGTAAGCCATATGAATATCCTCCTTAGTTC CTATTCC (SEQ ID NO: 5)	
	Cebadores para la integración de <i>pg/3_{mut}</i>		
	3' PagC Fw NotI	AAGCGGCCGCGCATAAGCTATG CGGAAGGTTC (SEQ ID NO: 6)	
	3' PagC Rev SacII	ACCGCGGGACACTGAGGTAATA ACATTATACG (SEQ ID NO: 7)	

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Eidgenoessische Technische Hochschule Zurich
- <120> *Salmonella enterica* que presenta un N-glicano de *C. jejuni* o derivados del mismo
- <130> 50087PCT
- 10 <160> 7
- <170> PatentIn versión 3.5
- 15 <210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>
<223> secuón consenso para N-glicosilación
- <220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
25 <223> puede reemplazarse por Glu
- <220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(2)
30 <223> puede reemplazarse por Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val
- <220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
35 <223> puede reemplazarse por Arg, Asn, Asp, Cys, Gin, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val
- <220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
40 <223> puede reemplazarse por Thr
- <400> 1
- 45
- Asp Ala Asn Ala Ser**
1 5
- 50 <210> 2
<211> 20
<212> PRT

ES 2 646 320 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia señal para dirigirse a membrana externa

5

<400> 2

Met Lys Lys Ile Leu Leu Ser Val Leu Thr Thr Phe Val Ala Val Val
1 5 10 15

Leu Ala Ala Cys
20

10

<210> 3
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> motivo LAAC de secuencia señal

<400> 3

Leu Ala Ala Cys
1

20

<210> 4
 <211> 72
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> cebador RfbP H1P1

30

<400> 4

cttaaatatgc ctatatttatt tacattatgc acggtcagag ggtgaggatt aagtgtaggc 60
tggagctgct tc 72

35

<210> 5
 <211> 82
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> cebador RfbP H2P2

<400> 5

gattttacgc aggctaattt atacaattat tattcagtac ttctcggtaa gccatatgaa 60
tatcctcctt agttcctatt cc 82

45

<210> 6
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> cebador 3' PagC Fw NotI

ES 2 646 320 T3

	<400> 6	
	aagcggccgc gcataagcta tgcggaaggt tc	32
5	<210> 7	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> cebador 3' PagC Rev SacII	
	<400> 7	
	accgcgggac actgaggtaa taacattata cg	32

REIVINDICACIONES

1. *Salmonella enterica*, **caracterizada por que** comprende al menos un operón *pgl* (para la glicosilación de proteínas) de *Campylobacter jejuni* o un derivado funcional del mismo y presenta sobre su superficie celular al menos un *N*-glicano de *Campylobacter jejuni* o un derivado de *N*-glicano del mismo, en donde están inactivados uno más genes de la biosíntesis de bacilosamina por mutación y/o delección parcial o completa, preferiblemente por delección parcial y/o completa de los genes *pgl*, *D*, *E*, *F*.
2. *Salmonella enterica* de la reivindicación 1, seleccionada del grupo que consiste en *Salmonella* Typhimurium, enteritidis, heidelberg, gallinorum, hadar, agona, kentucky e infantis, más preferiblemente las cepas *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.
3. *Salmonella enterica* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende al menos un operón *pgl*, en el que el producto génico *pglB* está inactivado mediante mutación y/o delección.
4. *Salmonella enterica* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que al menos un derivado de *N*-glicano tiene la fórmula (II):
- $$\text{GalNAc-}\alpha\text{1,4-GalNAc-}\alpha\text{1,4-[Glc-}\beta\text{-1,3]GalNAc-}\alpha\text{1,4-Gal-NAc-}\alpha\text{1,4-GalNAc-}\alpha\text{1,3-GlcNAc.}$$
5. *Salmonella enterica* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el/los *N*-glicano(s) o el/los derivado(s) está(n) unido(s) a al menos un polipéptido de *Salmonella* homólogo o heterólogo que es o son transferidos y presentados sobre la superficie celular, preferiblemente está(n) unido(s) a al menos un polipéptido que comprende al menos un secunón de consenso N-Z-S/T, más preferiblemente D/E - X - N - Z - S/T (SEQ ID NO: 1), en donde X y Z pueden ser cualquier aminoácido natural, excepto Pro.
6. *Salmonella enterica* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que al menos un *N*-glicano o un derivado del mismo están unidos al núcleo del lípido A de *Salmonella* o a un derivado funcionalmente equivalente del mismo.
7. *Salmonella enterica* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la cepa de *Salmonella* se atenúa, preferiblemente mediante las mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en *pab*, *pur*, *aro*, *aroA*, *asd*, *dap*, *nadA*, *pncB*, *galE*, *pml*, *fur*, *rpsL*, *ompR*, *htrA*, *hemA*, *cdt*, *cya*, *crp*, *phoP*, *phoQ*, *rfc*, *poxA* y *galU*, más preferiblemente las mutaciones *aroA*, *cya* y *crp*.
8. *Salmonella enterica* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la cepa de *Salmonella* se atenúa mediante la inactivación parcial o total de la expresión del antígeno O, preferiblemente mediante una o más mutaciones y/o delecciones en el grupo génico *rfb*, más preferiblemente en el gen *wbaP*, lo más preferiblemente mediante delección del gen *wbaP*.
9. *Salmonella enterica* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, preferiblemente una cepa serovar Typhimurium, **caracterizada por que:**
- (a) comprende
- (i) al menos un operón *pgl* de *Campylobacter jejuni* o un derivado funcional del mismo, en donde están inactivados uno o más genes para la biosíntesis de bacilosamina y
- (ii) mutaciones y/o delecciones en el gen *wbaP* que conducen a la inactivación completa de la biosíntesis del antígeno O;
- (b) y presenta al menos sobre su superficie celular un *N*-glicano de *Campylobacter jejuni* o un derivado de *N*-glicano del mismo, preferiblemente GalNAc- α 1,4-GalNAc- α 1,4-[Glc- β -1,3]GalNAc- α 1,4-Gal-NAc- α 1,4-GalNAc- α 1,3-GlcNAc.
10. Uso de *Salmonella enterica*, preferiblemente *Salmonella enterica* viva, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para la preparación de un medicamento, preferiblemente una vacuna.
11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10 para la preparación de un medicamento, preferiblemente una vacuna para la prevención y/o el tratamiento de infecciones por *Campylobacter jejuni* y opcionalmente *Salmonella*, preferiblemente infecciones en ganado, más preferiblemente en ganado vacuno y aves de corral, lo más preferiblemente en aves de corral.
12. Composición farmacéutica, alimento o pienso, aditivo alimentario o para pienso que comprenden *Salmonella enterica*, preferiblemente *Salmonella enterica* viva, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y opcionalmente excipientes fisiológicamente aceptables.

13. *Salmonella enterica* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, una composición farmacéutica, alimento o pienso, aditivo alimentario o para pienso que comprenden *Salmonella enterica* de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento o la prevención de infecciones por *C. jejuni* y opcionalmente *Salmonella* en un ser humano o un animal.

5 14. Método para producir *Salmonella enterica* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende las etapas de:

10 (i) introducir en *Salmonella enterica* mediante al menos un vector plasmídico o mediante integración genómica, al menos un operón *pgl* de *C. jejuni* o un derivado funcional del mismo, preferiblemente al menos un operón *pgl*, en el que uno o más, preferiblemente todos los genes para la biosíntesis de bacilosamina están inactivados e
(ii) introducir preferiblemente mutaciones y/o deleciones en el gen *wbaP* que conduzcan a la inactivación completa de la biosíntesis del antígeno O.

Figura 1

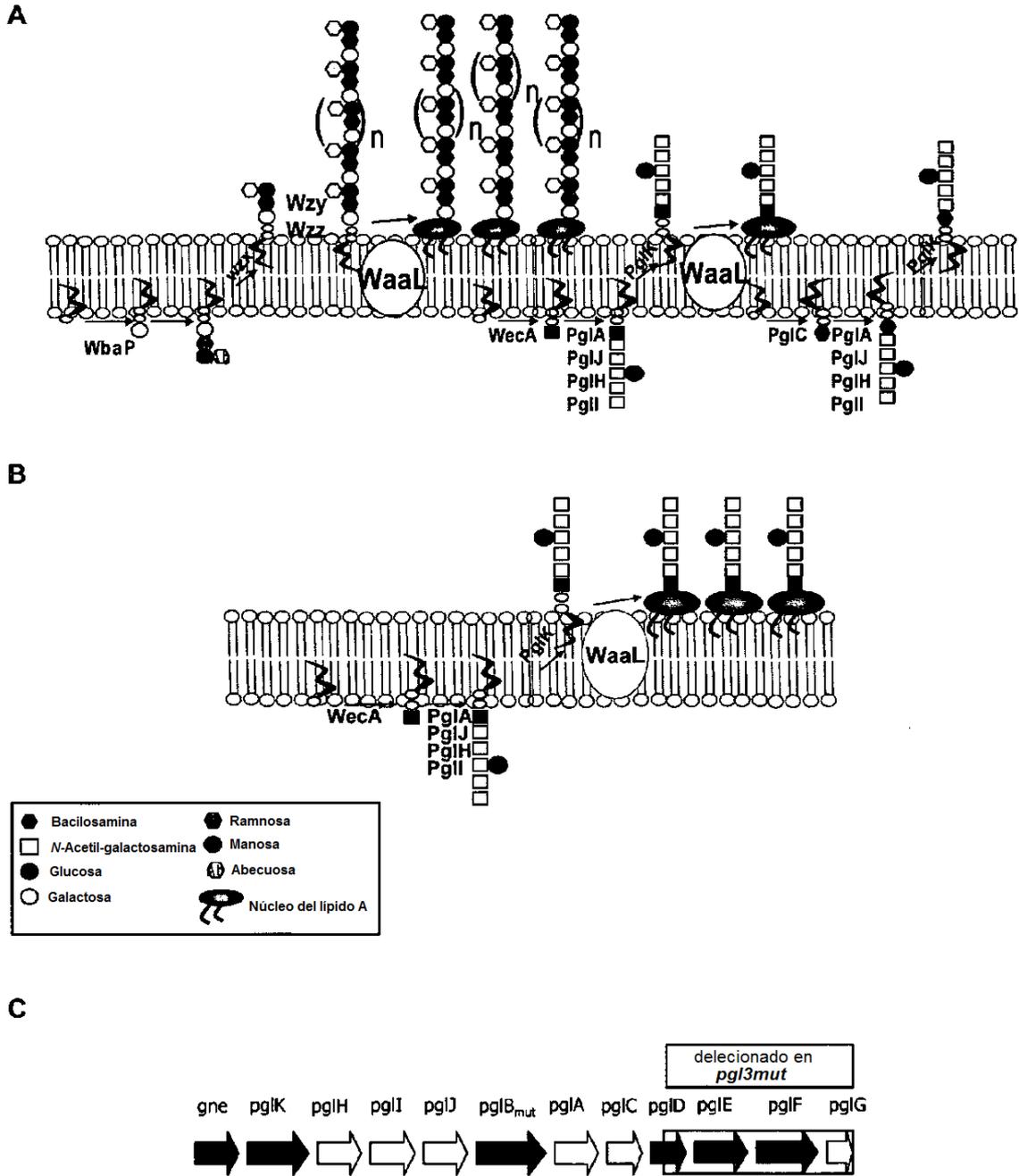


Figura 2

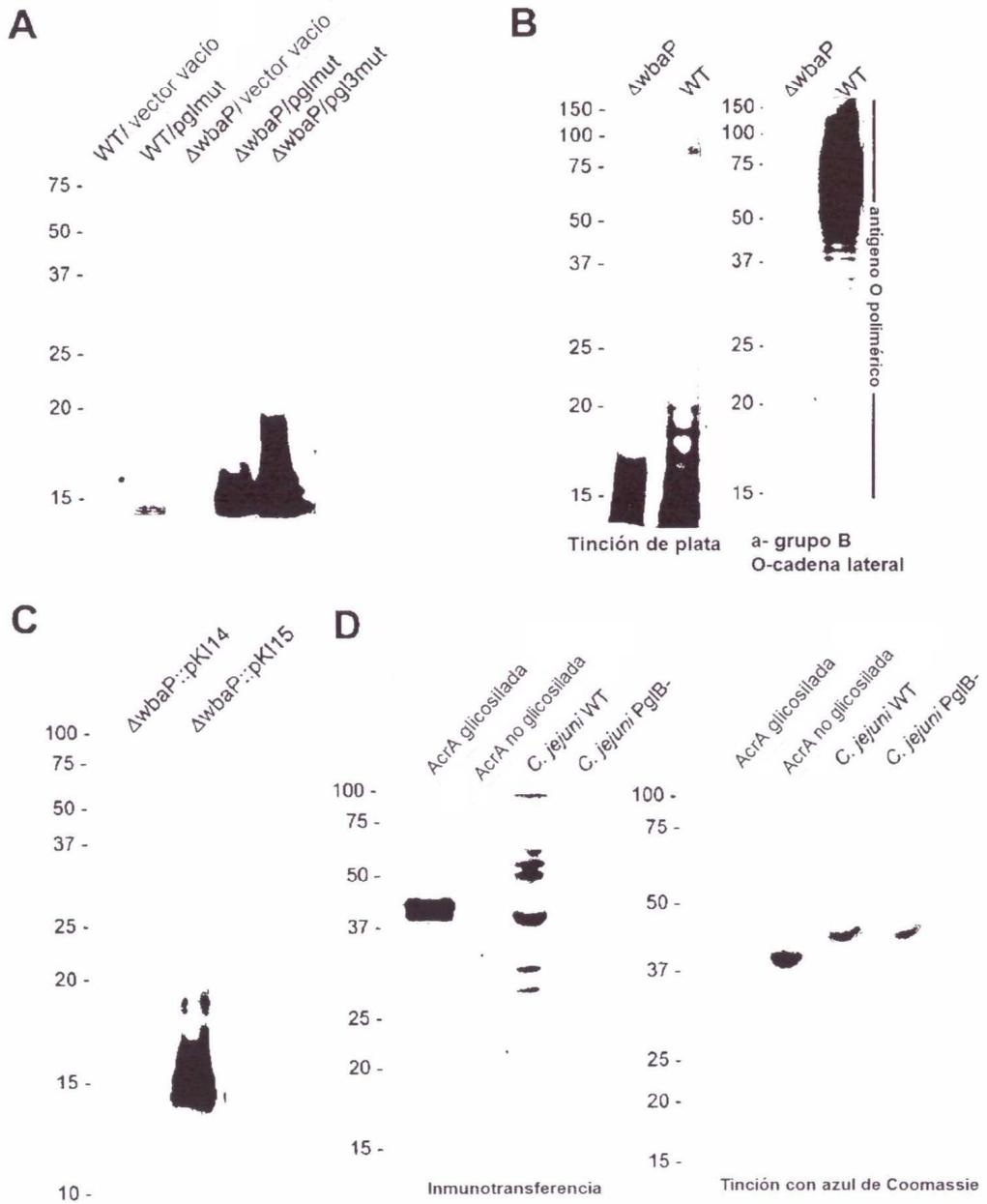


Figura 3

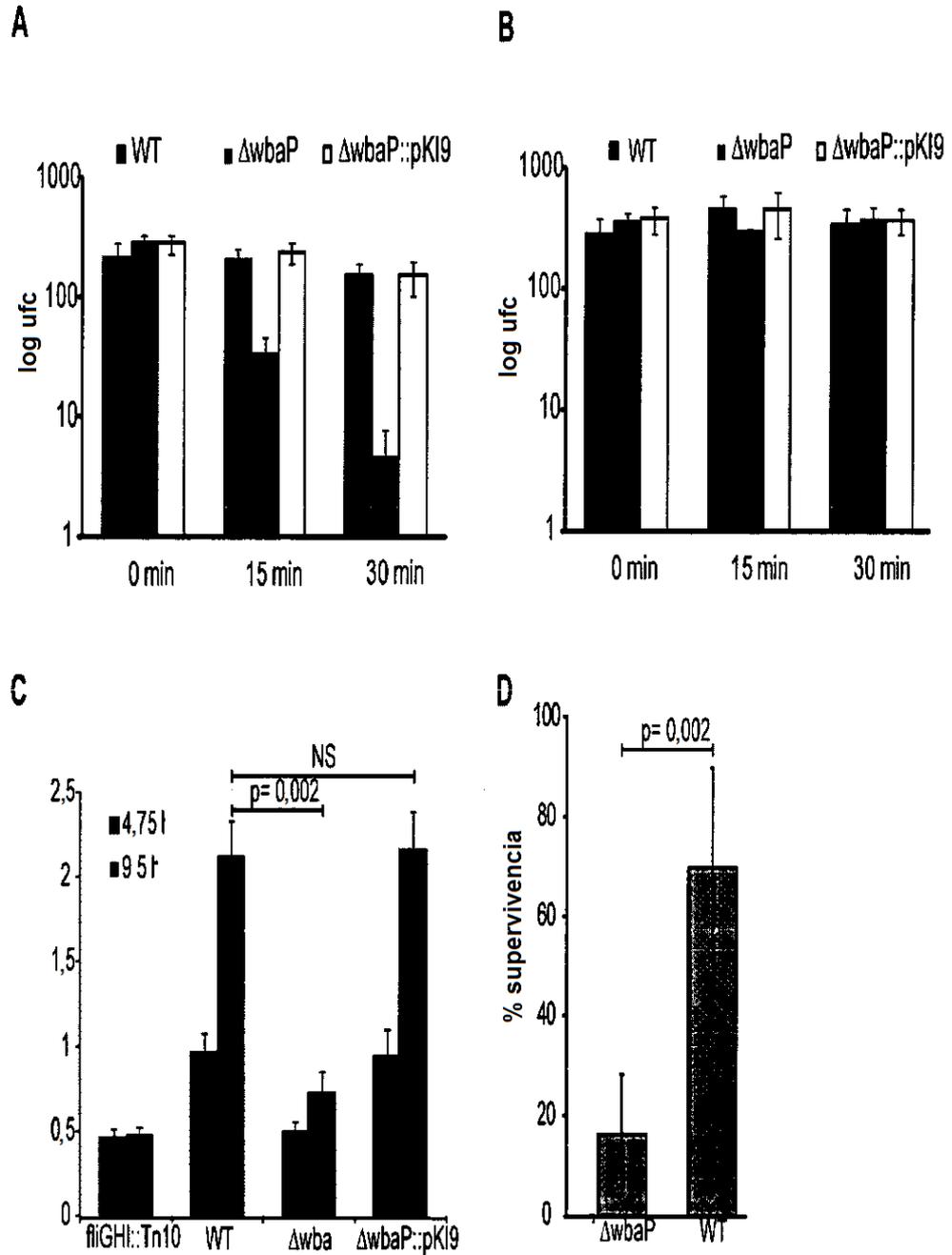


Figura 4

