

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 416**

51 Int. Cl.:

C12P 21/02	(2006.01)
A61K 38/16	(2006.01)
A61K 39/02	(2006.01)
A61K 39/095	(2006.01)
A61P 31/04	(2006.01)
A61P 37/04	(2006.01)
C12N 15/00	(2006.01)
C07K 9/00	(2006.01)
C12N 15/63	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2007 PCT/IB2007/004486**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2008 WO08093165**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2007 E 07872469 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 2142660**

54 Título: **Métodos y sistemas para la O-glicosilación de proteínas**

30 Prioridad:

13.12.2006 US 872403 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.02.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FELDMAN, MARIO y
FARIDMOAYER, AMIRREZA**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 652 416 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

Métodos y sistemas para la O-glicosilación de proteínas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la glicosilación de proteínas y, más específicamente, a métodos y sistemas para la O-glicosilación de proteínas en bacterias Gram-negativas.

10 **Antecedentes**

La glicosilación de proteínas es un proceso fundamental en organismos vivos. El análisis de la frecuencia de glicosilación ha pronosticado que más de la mitad de todas las proteínas en la naturaleza se identificarán finalmente como glicoproteínas. Sin estos hidratos de carbono añadidos, la función de muchas proteínas es aberrante. Están implicados hidratos de carbono complejos en comunicación celular a través del contacto célula/célula, metástasis (la propagación de células cancerosas a través del cuerpo), adhesión viral y bacteriana, y la unión de toxinas a células. La comprensión de las funciones de la biología de hidratos de carbono es crucial para la investigación sanitaria básica y para la industria farmacéutica.

Las glicoproteínas recombinantes representan una fracción principal de los compuestos activos en los fármacos biotecnológicos actuales. Ejemplos de glicoproteínas terapéuticas son eritropoyetina humana recombinante (rHuEPO), interferón beta y hormona foliculoestimulante (FSH). Aunque la función biológica está determinada normalmente por el componente proteico, los hidratos de carbono pueden afectar a muchas propiedades de la proteína, que pueden incluir pero no se limitan a, la estabilidad molecular, semivida en suero, solubilidad, actividad *in vivo* e inmunogenicidad. Por ejemplo, hHuEPO, que puede producirse en células de ovario de hámster chino, se usa clínicamente para tratar numerosas anemias incluyendo, pero sin limitarse a, aquellas asociadas con insuficiencia renal crónica, infección por VIH y algunos tipos de cánceres. rHuEPO contiene algunas cadenas de oligosacáridos que contienen ácido siálico como azúcar terminal. La eliminación de los residuos de ácido siálico da como resultado rHuEPO prácticamente inactiva *in vivo* debido a su rápido aclaramiento. Este ejemplo muestra la importancia de una estructura y patrón de hidratos de carbono definidos para la actividad biológica de glicoproteínas recombinantes.

Se han usado, en el pasado, células de mamíferos, insectos y levaduras para expresar glicoproteínas recombinantes. Todas estas células tienen la capacidad de glicosilar proteínas, pero presentan patrones de glicosilación diferentes que las células humanas. Debido a que la glicosilación de proteínas es un proceso esencial en células eucariotas y se producen modificaciones de azúcares muy complejas en los diferentes compartimentos celulares, la manipulación de la glicosilación de proteínas en organismos superiores es muy difícil. Por consiguiente, el uso de estos tipos de células da como resultado a menudo la producción de glicoproteínas que tienen estructuras y patrones de hidratos de carbono diferentes, lo que puede conducir a cambios serios en las propiedades, tal como se describió anteriormente. Estas estructuras y patrones de hidratos de carbono diferentes pueden de hecho conducir a la producción de glicoproteínas recombinantes que son completamente inactivas e inútiles para la producción de agentes terapéuticos. Por consiguiente, existe la necesidad de métodos y sistemas que puedan usarse para producir glicoproteínas recombinantes que tengan estructuras y patrones de hidratos de carbono específicos tanto *in vivo* como *in vitro*.

Hasta hace poco, se pensaba que las glicoproteínas eran una característica exclusiva de las células eucariotas. Aunque la glicosilación de proteínas no tiene lugar de manera natural en *Escherichia coli*, es un fenómeno común en otras bacterias. Las bacterias pueden tolerar la manipulación de sus sistemas de glicosilación y por tanto constituyen cajas de herramientas perfectas para la glicoingeniería.

La glicosilación de proteínas consiste en dos etapas principales: (i) el ensamblaje de un glucano y (ii) la unión del glucano a la proteína. En la mayoría de los casos, los glucanos se ensamblan secuencialmente sobre un portador lipídico mediante diferentes glicosiltransferasas. Este portador lipídico variará dependiendo del organismo. Por ejemplo, lo que no significa que sea limitativo, el portador lipídico puede ser dolicol-pirofosfato en la membrana del retículo endoplasmático de células eucariotas y puede ser undecaprenol-pirofosfato (Und-PP) en la membrana interna de las bacterias. Una vez que se ensamblan los glucanos sobre el portador lipídico, se transfieren a proteínas diana. Cuando los glucanos se unen a los grupos amido de residuos de asparagina (Asn) seleccionados, el proceso se llama N-glicosilación. Durante el proceso de O-glicosilación, los glucanos se unen al grupo hidroxilo en residuos de serina (Ser) o treonina (Thr) seleccionados. La transferencia de los glucanos del portador lipídico a las proteínas se lleva a cabo mediante enzimas denominadas oligosacaryltransferasas (OTAs).

En la producción de vacunas de conjugado, las glicoproteínas se usan como vacunas para ayudar a provocar una respuesta inmunitaria y proporcionar protección contra diversos patógenos y otras dolencias. En estas vacunas, la unión de glucanos a proteínas ayuda a aumentar la inmunogenicidad de los glucanos. Muchas técnicas están ahora

disponibles para producir tales vacunas (Jones, C. 2005 An. Acad. Bras. Cienc. 77(2): 293-324; Sood, R.K., y Fattom, A. 1998 Expert Opin. Investig. Drugs 7(3):333-347; Slovin, S.F., Keding, S.J., Ragupathi, G. 2005 Immunol. Cell Biol. 83(4):418-428). Sin embargo, cuando se usan la mayoría de las técnicas disponibles actualmente, no es posible controlar el/los sitio/s en la proteína en donde se unirá el glucano. Además, puede ser bastante difícil controlar la razón de glucano con respecto a proteína. Estas dificultades conducen a vacunas de conjugado que son de naturaleza heterogénea, lo que conduce a problemas cuando se intenta conseguir la aprobación para su uso de las agencias reguladoras sanitarias. La composición de las vacunas de conjugado puede variar, y son a menudo difíciles de reproducir exactamente. Por consiguiente, existe la necesidad de nuevos métodos y sistemas que puedan usarse para unir glucanos a proteínas de una manera más controlada para mejorar la producción de vacunas de conjugado.

El uso de bacterias para producir proteínas recombinantes O-glicosiladas se ha dado a conocer por Castric et al. en la patente estadounidense n.º 6.872.398 (la "patente '398"). En la patente '398, se da a conocer una vacuna polivalente contra infecciones bacterianas Gram-negativas que comprende pili glicosadas de manera heteróloga de *Pseudomonas aeruginosa*. Para producir esta vacuna, la patente '398 enseña la introducción, dentro de una bacteria Gram-negativa, de un vector que contiene *pilA*, el gen estructural de pilina de *Pseudomonas aeruginosa*, y *pilO*, el gen de *Pseudomonas aeruginosa* que codifica para la proteína responsable de la unión de la unidad de repetición de O-antígeno a la subunidad de pilina. Una vez expresada, PilO puede añadir la unidad de repetición de O-antígeno de la bacteria huésped Gram-negativa a la proteína pilina PilA. La pilina O-glicosilada puede purificarse entonces a partir de un cultivo de las bacterias transformadas. Sin embargo, este método y sistema tienen muchas desventajas y limitaciones graves. El sistema enseñado por Castric se basa estrictamente en el uso de la oligosacaryltransferasa PilO. Esta limitación da como resultado varias desventajas graves. En primer lugar, el uso de PilO limita gravemente el tipo de unidades de repetición de O-antígeno que pueden transferirse sobre la glicoproteína. De hecho, PilO sólo puede transferir glucanos pequeños, conocidos comúnmente por un experto en la técnica como oligosacáridos (es decir, glucanos que tienen 2-10 monosacáridos). En segundo lugar, PilO no puede transferir glucanos a sitios de glicosilación internos en proteínas que van a glicosilarse. De hecho, se ha mostrado que PilO sólo transfiere glucano a un residuo de serina que debe ser el residuo C-terminal de la proteína (Castric, P., et al. 2001, J. Biol. Chem. 276; 26479-26485). Esto impone claramente limitaciones importantes en las proteínas que pueden glicosilarse usando el sistema enseñado por Castric. Además, estas dificultades pueden impedir la producción de vacunas o agentes terapéuticos específicos debido a la incapacidad de PilO de transferir glucanos más grandes, conocidos comúnmente por un experto en la técnica como polisacáridos (es decir, glucanos que tienen más de 10 monosacáridos). En tercer lugar, PilO es muy difícil de expresar y purificar. Esto puede plantear limitaciones graves cuando se intenta usar este sistema para producir grandes cantidades de producto glicosilado para la producción de vacunas.

El sistema y método enseñado por Castric en la patente estadounidense n.º 6.872.398 tiene varias otras limitaciones. La producción de glicoproteínas recombinantes se limita a sistemas *in vivo*. Además, tanto la oligosacaryltransferasa como la proteína que va a glicosilarse deben originarse de *Pseudomonas aeruginosa*. Estas desventajas pueden ser muy problemáticas, principalmente para la producción de vacunas u otros agentes terapéuticos.

Por consiguiente, ha surgido la necesidad de un método y sistema que puedan usarse para O-glicosilar proteínas fácilmente usando una variedad de bacterias Gram-negativas de una manera *in vivo* o *in vitro*, al tiempo que se evitan algunos de los problemas enumerados anteriormente.

Sumario

Según un aspecto amplio de la invención, se proporciona un método para la O-glicosilación de proteínas con un glucano en bacterias Gram-negativas. El método comprende introducir en el organismo procariota, en cualquier orden particular, al menos (a) ADN que comprende un gen que produce una oligosacaryltransferasa de tipo PglL, y ADN que comprende un gen que produce una proteína que va a O-glicosilarse. La oligosacaryltransferasa de tipo PglL facilita la unión covalente del glucano a la proteína para producir la proteína O-glicosilada. El glucano comprende monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, o cualquier combinación de los mismos. En un aspecto, el glucano comprende una hexosa o un derivado de N-acetilhexosa en el extremo reductor. En otro aspecto, está presente galactosa en el extremo reductor del glucano. El portador lipídico es un poliprenol-pirofosfato incluyendo, pero sin limitarse a, undecaprenol-pirofosfato, dolicol-pirofosfato, y equivalentes sintéticos de los mismos.

Según otro aspecto amplio de la invención, se proporciona un método para producir la O-glicosilación de proteínas con un glucano en una bacteria Gram-negativa en el que el método comprende introducir en el organismo procariota, en cualquier orden particular, al menos (a) ADN que comprende *pglL* que produce una oligosacaryltransferasa de tipo PglL, (b) ADN que comprende *pilE* que produce una proteína que va a O-glicosilarse; y (c) ADN que comprende genes requeridos para el ensamblaje de un glucano sobre un portador lipídico. La oligosacaryltransferasa de tipo PglL facilita la unión covalente del glucano a la proteína para producir la proteína O-

glicosilada. El glucano comprende monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos o cualquier combinación de los mismos. En un aspecto, el glucano comprende una hexosa o un derivado de N-acetilhexosa en el extremo reductor. En otro aspecto, está presente galactosa en el extremo reductor del glucano. El portador lipídico es un poliprenol-pirofosfato incluyendo, pero no sin limitarse a, undecaprenol-pirofosfato, dolicol-pirofosfato, y equivalentes sintéticos de los mismos.

5 Según otro amplio aspecto de la invención, se proporciona un sistema para producir una proteína O-glicosilada que comprende una bacteria Gram-negativa y al menos los siguientes componentes presentes dentro del organismo: (a) ADN que produce una oligosacaryltransferasa de tipo PglL; (b) ADN que produce la proteína que va a O-glicosilarse; 10 y (c) ADN que comprende genes requeridos para el ensamblaje de un glucano sobre un portador lipídico. La oligosacaryltransferasa de tipo PglL facilita la unión covalente del glucano a la proteína para producir la proteína O-glicosilada. El glucano comprende monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, o cualquier combinación de los mismos. En un aspecto, el glucano comprende una hexosa o un derivado de N-acetilhexosa en el extremo reductor. En otro aspecto, está presente galactosa en el extremo reductor del glucano. El portador lipídico es un poliprenol-pirofosfato incluyendo, pero sin limitarse a, undecaprenol-pirofosfato, dolicol-pirofosfato, y equivalentes sintéticos de los mismos.

Según otro amplio aspecto de la invención, se proporciona un sistema para producir una proteína O-glicosilada que comprende una bacteria Gram-negativa y al menos los siguientes componentes presentes dentro del organismo: (a) 20 ADN que comprende *pglL* que produce una oligosacaryltransferasa de tipo PglL; (b) ADN que comprende *piE* que produce la proteína que va a O-glicosilarse; y (c) ADN que comprende genes requeridos para el ensamblaje de un glucano sobre un portador lipídico. La oligosacaryltransferasa facilita la unión covalente del glucano a la proteína para producir la proteína O-glicosilada. El glucano comprende monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, o cualquier combinación de los mismos. En un aspecto, el glucano comprende una hexosa o un derivado de N-acetilhexosa en el extremo reductor. En otro aspecto, está presente galactosa en el extremo reductor del glucano. El portador lipídico es un poliprenol-pirofosfato incluyendo, pero no sin limitarse a, undecaprenol-pirofosfato, dolicol-pirofosfato, y equivalentes sintéticos de los mismos.

Según otro amplio aspecto de la invención, se proporciona un método para producir una proteína O-glicosilada que comprende hacer reaccionar: (a) la proteína que va a O-glicosilarse, y (b) un glucano unido a un portador lipídico en presencia de una oligosacaryltransferasa de tipo PglL. La oligosacaryltransferasa de tipo PglL transfiere el glucano del portador lipídico a la proteína. El glucano comprende monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, o cualquier combinación de los mismos. En un aspecto, el glucano comprende una hexosa o un derivado de N-acetilhexosa en el extremo reductor. En otro aspecto, está presente galactosa en el extremo reductor del glucano. El portador lipídico es un poliprenol-pirofosfato incluyendo, pero sin limitarse a, undecaprenol-pirofosfato, dolicol-pirofosfato, y equivalentes sintéticos de los mismos.

Según otro amplio aspecto de la invención, se proporciona un método para producir una proteína O-glicosilada que comprende hacer reaccionar (a) proteína PilE que es el producto de expresión de *piE*, y (b) un glucano unido a un portador lipídico en presencia de una oligosacaryltransferasa que es el producto de expresión de *pglL*. La oligosacaryltransferasa transfiere el glucano del portador lipídico a la proteína. El glucano comprende monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, o cualquier combinación de los mismos. En un aspecto, el glucano comprende una hexosa o un derivado de N-acetilhexosa en el extremo reductor. En otro aspecto, está presente galactosa en el extremo reductor del glucano. El portador lipídico es un poliprenol-pirofosfato incluyendo, pero sin limitarse a, undecaprenol-pirofosfato, dolicol-pirofosfato, y equivalentes sintéticos de los mismos.

Según otro amplio aspecto de la invención, se proporciona una proteína O-glicosilada producida por los métodos y sistemas descritos en el presente documento que puede usarse para la producción de una vacuna. Estos métodos y sistemas son particularmente ventajosos ya que pueden usarse para preparar proteínas O-glicosiladas sin introducir limitaciones en cuanto al tipo de glucano que puede añadirse a las proteínas, la longitud del glucano transferido, el tipo de azúcar ubicado en el extremo reductor del glucano, la posición del glucano en la proteína o el tipo de bacteria Gram-negativa que puede usarse.

Breve descripción de los dibujos

55 La presente invención, tanto en cuanto a su organización como su manera de funcionamiento, puede entenderse de la mejor manera mediante referencia a la siguiente descripción, y los dibujos adjuntos de diversas realizaciones en los que se usan números similares a lo largo de todas las varias vistas, y en los que:

60 La figura 1A es un diagrama esquemático del N-glucano producido por *C. jejuni*.

La figura 1B es un diagrama esquemático del glucano de pilina producido por *N. meningitidis*.

La figura 1C es un diagrama esquemático del antígeno 07 producido por *E. coli*.

La figura 1D es un diagrama esquemático del glucano de pilina producido por *P. aeruginosa* O11.

5 La figura 1E es un diagrama esquemático del glucano producido por *S. enterica* serovar Typhimurium.

La figura 2A es un análisis de inmunotransferencia de tipo Western de extractos de *E. Coli* CLM24 de células completas que producen pilina de *N. meningitidis* (MC) glicosilada y no glicosilada. Se detectó la pilina mediante el anticuerpo monoclonal anti-pilina SM1 (panel superior) o el antisuero de glucano de *C. jejuni* R12 (panel inferior).
 10 R12 es un antisuero que reconoce específicamente el glucano *C. jejuni* (Wacker, M. *et al.*, 2002, Science 298(5599):1790-1793). Carril 1, pAMF3 (que expresa pilina MC) y pAMF5 (que expresa PglL). Carril 2, pAMF3, pACYC*pglB*_{mut} y pEXT22 (vector de clonación). Carril 3, pAMF3 (que expresa pilina MC), pACYC*pglB*_{mut} y pAMF5 (que expresa PglL). El plásmido pACYC*pgl* porta el locus *pgl*, que codifica para todas las enzimas necesarias para la síntesis del glucano transferido normalmente durante la N-glicosilación en *C. jejuni* (figura 1A) (Wacker, M. *et al.*,
 15 citado anteriormente). Su derivado pACYC*pglB*_{mut} porta una mutación que inactiva la PglB oligosacariltransferasa. La flecha superior indica el producto glicosilado, y la flecha inferior indica los productos no glicosilados.

La figura 2B es un análisis de inmunotransferencia de tipo Western que muestra el efecto de las mutaciones S63A y T62A sobre la glicosilación de pilina. Se detectó la pilina mediante el anticuerpo monoclonal anti-pilina SM1 (panel superior) o el antisuero de glucano de *C. jejuni* R12 (panel inferior). Todos los carriles corresponden a células que expresan pAMF5 y pACYC*pglB*_{mut}. Carril 1, pPiET62A. Carril 2, pPiES63A. Carril 3, pAMF6. La flecha superior indica el producto glicosilado, y la flecha inferior indica los productos no glicosilados.
 20

La figura 3 son análisis de inmunotransferencia de tipo Western que muestran la susceptibilidad de pilina glicosilada de *N. meningitidis* (MC) a la beta eliminación. Se usaron en este experimento extractos de células de *E. coli* CLM24 que contenían pilina glicosilada con glucano de *C. jejuni* (figura 3A). Se usaron extractos de la misma cadena que contenía AcrA N-glicosilada con glucano de *C. jejuni* como control (figura 3B). Se recogieron las células completas y se mezclaron con tampón de muestra Laemmli (SDS al 4%, glicerol al 20%, 2-mercaptoetanol al 10%, azul de bromofenol al 0,004% y Tris-HCl a 0,125 M, pH 6,8) y se calentaron durante 10 min a 95°C. Las muestras se fraccionaron mediante SDS-PAGE en geles al 15%, se transfirieron a una membrana de poli(floruro de vinilideno) (PVDF) y se cortaron en tiras. Se detectó el efecto del tratamiento con álcali sobre la desglicosilación de proteínas, β-eliminación, tras 16 h de incubación a 40°C usando el anticuerpo específico de glucano R12. Una vez transferidas a membranas de PVDF, se trataron las muestras con diferentes concentraciones de hidróxido de sodio (NaOH). Carril 1, sin tratamiento con NaOH. Carril 2, tratamiento con NaOH 0,055 M. Carril 3, tratamiento con NaOH 0,07 M.
 25 Carril 4, tratamiento con NaOH 0,09 M.
 30
 35

La figura 4A es el patrón de fragmentación esperado de la digestión con proteinasa K de pilina MC glicosilada. Los cuadrados con cruces representan DATDH (2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxihexosa). Los cuadrados en blanco representan HexNAc. Los círculos negros representan hexosa.
 40

La figura 4B es un espectro EM/EM de un ión de glucopéptido cargado doble a m/z 905,8²⁺ que corresponde a DATDH(HexNAc)5Hex unido al péptido ⁶³SAGVA⁶⁷, que resulta de la digestión con proteinasa K de pilina MC. Se observan los iones de fragmentos de péptidos comunes (y₃ y b₄) mostrados en la figura 4A, además de los fragmentos de azúcar y el péptido con los fragmentos de azúcar. Los cuadrados con cruces representan DATDH (2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxihexosa). Los cuadrados en blanco representan HexNAc. Los círculos negros representan hexosa.
 45

La figura 5A es un análisis de inmunotransferencia de lectina de tres formas diferentes de LPS de *E. coli* 07 producidas en *E. coli* SΦ874. Se ha usado una lectina específica para ramnosa, que es uno de los azúcares del antígeno 07. Carril 1, tipo natural. Carril 2, mutante *wzy* (polimerasa). Carril 3, mutante *wzz* (regulador de longitud de cadena). Los números a la derecha indican el número de unidades de repetición de 07 unidas al núcleo de lípido A.
 50

La figura 5B es un análisis de inmunotransferencia de tipo Western que demuestra la capacidad de PglL (panel izquierdo) y PilO (panel derecho) para transferir antígeno 07 de diferentes longitudes a sus respectivas pilinas en la cepa de *E. coli* SCM3 (derivado deficiente en ligasa de SΦ874). Se detectaron pilinas de *N. meningitidis* (MC) que contenían las tres versiones de O-antígeno mostradas en la figura 5A usando el anticuerpo monoclonal anti-pilina de MC. PglL podía transferir el antígeno 07 completamente polimerizado a la pilina de MC (carril 2). Se detectó pilina de *P. aeruginosa* que contenía O-antígeno de sólo hasta dos unidades de repetición en la cepa mutante *wzz* (carril 8), a pesar de la observación de que el O-antígeno que contenía dos y más unidades de repetición es igualmente abundante (véase la figura 5A, carril 3). Carriles 1-4: pAMF5 (que expresa PglL) y pAMF6 (que expresa pilina de MC). Además, el carril 2 contiene pJHCV32 (antígeno 07 de tipo natural), el carril 3 contiene pJHCV32-134 (mutante *wzy* 07) y el carril 4 contiene pJHCV32-136 (mutante 07 *wzz*). Los carriles 5-8, pPAC46 (que expresa PilO y pilina de
 55
 60

P. aeruginosa). Además, el carril 6 contiene pJHCV32, el carril 7 contiene pJHCV32-134 y el carril 8 contiene pJHCV32-136.

5 La figura 6 es un análisis de inmunotransferencia de tipo Western que muestra que la mutación de serina 63 suprime la glicosilación. El antígeno 07 de la cepa mutante wzz no se transfiere a la variante S63A de pilina de MC (carril 4). La glicosilación no se ve afectada en los mutantes N60A (carril 1), N61A (carril 2) y T62A (carril 3). Se incluyen para comparación pilina no glicosilada (carril 5) y de tipo natural glicosilada con el antígeno 07 (carril 6). Los carriles 1-4 contienen plásmido pAMF5 y pJHCV32::Tn3HoHo1-134. Carril 1, pPiEN60A. Carril 2, pPiEN61A. Carril 3, pPiET62A. Carril 4, pPiES63A. Carril 5, pAMF6, pEXT21 y pJHCV32::n3HoHo1-134. Carril 6, pAMF6, pAMF5 y
10 pJHCV32::Tn3HoHo1-134.

15 Las figuras 7A y 7B son análisis de inmunotransferencia de tipo Western que muestran que la glicosilación de pilina de MC solo se produce en presencia de una flipasa funcional, o bien Wzx (carril 1), una PglK codificada por *pgl* (carril 3) o una PglK codificada en trans (carril 4). Se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western los extractos celulares usando anticuerpos dirigidos contra pilina de MC (figura 7A) y el antisero R12 específico de glucano (figura 7B). Carriles: 1, cepa CLM24 que contiene pAMF5, pAMF6 y pACYC*pglB*_{mut}. Carril 2, SCM7 transformada con los plásmidos pAMF5, pAMF6 y pACYC*pglK*_{mut}. Carril 3, SCM7 que contiene pAMF5, pAMF6 y pACYC*pgl*. Carril 4, SCM7 transformada con pAMF5, pAMF6, pACYC*pglK*_{mut} y pCW27, que expresan PglK en trans. Carril 5, SCM7 transformada con pAMF5, pAMF6, pACYC*pglK*_{mut} y pMLBAD (vector de clonación). Se presentan
20 detalles de las cepas y los plásmidos en la tabla 1. La flecha indica la presencia de LPS que contiene el oligosacárido de *C. jejuni* en las cepas en donde están presentes una WaaL (ligasa) y una flipasa funcionales.

25 La figura 8A es un análisis de inmunotransferencia de tipo Western que usa anticuerpo anti-pilina en células de *E. coli* JM109 que expresan el O-antígeno de *Salmonella*. Esta inmunotransferencia muestra que la pilina puede glicosarse con un polisacárido que tiene galactosa en el extremo reductor en *E. coli*. Los carriles 1 a 3 contienen pPR1347 y pAMF8. Además, carril 1, pPiES63A. Carril 2, pAMF9. Carril 3, pPiET62A. Carril 4, pPR1347, pAMF9 y pEXT20.

30 La figura 8B es una reconstitución de la glicosilación de pilina en *Salmonella*. Panel izquierdo, *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium, cepa SL3749 transformada con pAMF9. Carril 1, pEXT20. Carril 2, pAMF8. Este panel muestra la transferencia de un polisacárido en células de *Salmonella*. Panel central, *Salmonella enterica* Typhimurium, cepa SL901 que porta una mutación en el gen de polimerasa *wzy*, transformada con pAMF9 (tanto en los carriles 3 como 4). El carril 3 contiene pEXT20. El carril 4 contiene pAMF8. Panel derecho, *Salmonella enterica* serovar Typhi, que porta una mutación en el gen de polimerasa *wzy*, transformada con pAMF9. Carril 5, pEXT20.
35 Carril 6, pAMF8. Los paneles central y derecho muestran la transferencia de oligosacáridos a diferentes cepas de *Salmonella*.

Descripción detallada de la invención

40 Los materiales, compuestos, composiciones y métodos descritos en el presente documento pueden entenderse más fácilmente mediante referencia a la siguiente descripción detallada de aspectos específicos de la materia dada a conocer y los ejemplos incluidos en la misma y en las figuras.

45 A lo largo de toda la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva la palabra “comprenden” y otras formas de la palabra, tales como “que comprende” y “comprende,” significa incluyendo pero sin limitarse a, y no se pretende que excluya, por ejemplo, otros aditivos, componentes, números enteros o etapas.

50 Tal como se usa en la descripción y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un,” “una,” y “el/la” incluyen referentes en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “un agente “ incluye mezclas de dos o más de tales agentes.

55 La presente invención se refiere al descubrimiento de métodos y sistemas para la O-glicosilación de proteínas *in vivo* o *in vitro*. Los métodos y sistemas *in vivo* comprenden introducir en una bacteria Gram-negativa en cualquier orden particular, al menos: (i) ADN que produce una oligosacariltransferasa de tipo PglL, y (ii) ADN que produce una proteína que va a O-glicosilarse. En una realización, estos métodos y sistemas se basan en genes que codifican para proteínas requeridas para el ensamblaje de un glucano sobre un portador lipídico, que son endógenas para el organismo procarionta y se requieren para la glicosilación. En otra realización, estos métodos y sistemas comprenden además introducir dentro de la bacteria Gram-negativa genes exógenos que codifican para proteínas que se requieren para el ensamblaje de un glucano sobre un portador lipídico. Estos métodos y sistemas son
60 particularmente ventajosos ya que pueden usarse para preparar proteínas O-glicosiladas sin introducir limitaciones en cuanto al tipo de glucano que puede añadirse a las proteínas, la longitud del glucano transferido, del tipo de azúcar ubicado en el extremo reductor del glucano, la posición del glucano en la proteína o el tipo de bacteria Gram-negativa que puede usarse.

Los métodos y sistemas *in vitro* comprenden incubar una oligosacariltransferasa de tipo PglL con una proteína que va a O-glicosilarse y con un glucano unido a lípido en un tampón adecuado.

5 Para los fines de esta invención, un glucano comprende cualquier azúcar que pueda transferirse (por ejemplo, unirse covalentemente) a una proteína. Un glucano comprende monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Tal y como se describió anteriormente, un oligosacárido es un glucano que tiene de 2 a 10 monosacáridos. Un polisacárido es un glucano que tiene más de 10 monosacáridos. Pueden seleccionarse polisacáridos del grupo que comprende O-antígenos, cápsulas y exopolisacáridos. Por supuesto, un experto en la técnica apreciará que puedan usarse otros tipos de polisacáridos.

10 Los glucanos útiles en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, hexosas, derivados de N-acetilo de hexosas, oligosacáridos, y polisacáridos. Otros ejemplos, incluyen glucanos de *C. jejuni*, *N. meningitidis*, *P. aeruginosa*, *S. enterica* LT2, y *E. coli* (véase la figura 1). En una realización, el monosacárido en el extremo reductor del glucano es una hexosa o un derivado de N-acetilo de una hexosa. En un aspecto, la hexosa puede ser galactosa. En un aspecto, el derivado de N-acetilo de hexosa puede seleccionarse del grupo que comprende N-acetilglucosamina (GlcNAc), 2-acetamido-2,6-didesoxihexosa (FucNAc) y DATDH (2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxihexosa).

15 Una oligosacariltransferasa de tipo PglL de la presente invención incluye oligosacariltransferasas que comprenden las siguientes propiedades: (a) capacidad de transferir glucanos a residuos de serina o treonina de proteínas; (b) capacidad de transferir glucanos que tienen diferentes longitudes y diferentes tipos de monosacáridos debido a una especificidad de glucanos relajada; y (c) capacidad de transferir polisacáridos a proteínas durante la O-glicosilación. En un aspecto, la oligosacariltransferasa de tipo PglL puede tener también la capacidad de transferir glucanos a sitios de glicosilación internos en proteínas que van a O-glicosilarse. En un aspecto, la oligosacariltransferasa de tipo PglL puede tener también la capacidad de O-glicosilar proteínas en el periplasma de organismos procariontes.

20 En una realización, la oligosacariltransferasa de tipo PglL es la proteína expresada por el gen L de glicosilación de pilina (*pglL*) o un homólogo del mismo. Por supuesto, un experto en la técnica entenderá que los homólogos son proteínas que pueden tener diferencias en la secuencia, pero ninguna diferencia importante en la actividad. En un aspecto, proteínas expresadas por *pglL* u homólogos de las mismas en *Neisseria* (por ejemplo, *N. meningitidis* o *gonorrhoea*) pueden producir oligosacariltransferasas útiles en el presente documento. Los ejemplos de secuencias genómicas de *pglL* de *N. meningitidis* para la expresión de oligosacariltransferasas de tipo PglL útiles en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, PglL de MC58 (n.º de registro AAF41024) (Tettelin, H. *et al.*, 2000, Science 287:1809-1815), Z7491 (Parkhill, J., *et al.*, 2000, Nature 404:502-506) y FAM18 (http://www.sanger.ac.uk/Projects/N_meningitidis/sero.shtml). PglL de *N. gonorrhoea* se ha denominado PglO (n.º de registro NGO0178) (Aas, F.E. *et al.*, 2007, Mol. Microbiol. 65:607-624).

25 En una realización de la presente invención, se preparan proteínas O-glicosiladas usando métodos y sistemas *in vivo*. Estos métodos y sistemas pueden usarse para producir proteínas O-glicosiladas en cualquier tipo de organismo procarionte. Las bacterias Gram-negativas que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, especies de bacterias de los géneros *Neisseria*, *Salmonella*, *E. coli*, *Pseudomonas* y *Yersinia*.

30 En una realización particular de la presente invención, la bacteria Gram-negativa usada es *Escherichia coli*. El uso de *E. coli* tiene muchas ventajas. *E. coli* se ha usado en el diseño de vacunas y agentes terapéuticos, y es una buena célula huésped para llevar a cabo reacciones de O-glicosilación *in vivo*. Por supuesto, tal como resultará evidente para un experto en la técnica, el uso de *E. coli* tiene muchas otras ventajas, que no se enumeran en el presente documento.

35 En otra realización, la bacteria Gram-negativa usada es *Salmonella*. El uso de *Salmonella* también tiene muchas ventajas. Por ejemplo, lo que no significa que sea limitativo, hay muchas aplicaciones de *Salmonella* en las que esta especie se usa para producir vacunas atenuadas. Además, *Salmonella* produce invariablemente glucanos endógenos que tienen galactosa en el extremo reductor del glucano. Un experto en la técnica apreciará que esto facilitaría luego en enormemente la producción de vacunas.

40 Los métodos para la O-glicosilación *in vivo* de proteínas de la presente invención implican generalmente la incorporación de al menos: (i) ADN que produce una oligosacariltransferasa de tipo PglL, y (ii) ADN que produce una proteína que va a O-glicosilarse. Tal como se comentó anteriormente, en una realización, estos métodos y sistemas se basan en los genes endógenos del organismo procarionte que codifican para las proteínas requeridas para el ensamblaje de un glucano sobre un portador lipídico y son necesarias para la glicosilación de proteínas. En otra realización, estos métodos y sistemas comprenden además introducir en el organismo procarionte genes exógenos que codifican para proteínas que se requieren para el ensamblaje de un glucano sobre un portador lipídico.

La incorporación de estos fragmentos de ADN en una bacteria Gram-negativa puede llevarse a cabo usando cualquiera de varias técnicas conocidas en la técnica. Un experto en la técnica apreciará que estas técnicas incluyen cualquier método que pueda usarse para transfectar o transformar de manera estable una célula huésped con cualquier constructo de ADN recombinante. Por ejemplo, cualquiera de las técnicas enumeradas y descritas en Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, J. y Russell, D.W., CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 3ª edición, 2001) puede usarse fácilmente para introducir fragmentos de ADN en una bacteria Gram-negativa para los fines de esta invención.

Los fragmentos de ADN insertados en la bacteria Gram-negativa elegida son generalmente genes o una porción del/de los gen(es), que pueden incluir truncamientos y/o mutaciones de los mismos, usados para producir una oligosacaryltransferasa de tipo PgIL, una proteína que va a glicosilarse y, en algunas realizaciones, proteínas requeridas para el ensamblaje de un glucano sobre un portador lipídico. Estos fragmentos de ADN pueden producirse en una amplia variedad de diferentes formas. Cada fragmento de ADN puede generarse de cualquier manera, incluyendo, por ejemplo, síntesis química o replicación de ADN o transcripción inversa o transcripción, que se basan en la información proporcionada por la secuencia de bases en la(s) región/regiones de la que se deriva el polinucleótido. Además, combinaciones de diferentes regiones que corresponden a las de la secuencia deseada pueden modificarse en formas conocidas en la técnica consecuentes con el uso previsto. Finalmente, la fuente de cada fragmento de ADN puede derivarse de la misma bacteria Gram-negativa o de diferentes bacterias Gram-negativas dependiendo del uso previsto.

En una realización de la presente invención, cada fragmento de ADN se refiere a una molécula de ADN recombinante que incluye un vector y un fragmento de ADN tal como se describió anteriormente. El vector puede tomar la forma de un plásmido tal como cualquier vector de expresión de intervalo de huésped amplio conocido en la técnica. Por supuesto, un experto en la técnica apreciará que, en algunos casos, puede ser beneficioso incluir más de uno de los fragmentos de ADN en un único plásmido, dependiendo del uso previsto. Además, tal como se comentó anteriormente, en algunas realizaciones, algunas de las proteínas requeridas están codificadas por genes endógenos para la bacteria Gram-negativa. En estas realizaciones, los fragmentos de ADN que codifican para estas proteínas están ubicados en el genoma de la bacteria Gram-negativa.

En los métodos y sistemas de la presente invención, la oligosacaryltransferasa de tipo PgIL facilita la unión covalente del glucano deseado al grupo hidroxilo de un residuo de serina o treonina presente en la proteína que va a glicosilarse. El fragmento de ADN que codifica para la oligosacaryltransferasa de tipo PgIL puede obtenerse de una amplia variedad de sistemas y organismos diferentes. Por supuesto, tal como se describió anteriormente, cualquiera de estas secuencias puede modificarse usando cualquier método conocido en la técnica para el uso previsto.

En los métodos y sistemas de la presente invención, la proteína que va a glicosilarse puede seleccionarse de una amplia gama de proteínas. En una realización de la invención, cuando la oligosacaryltransferasa de tipo PgIL usada se prepara a partir del gen *pglL* de *N. meningitidis* MC58 (n.º de registro AAF41024), el fragmento de ADN que produce la proteína que va a glicosilarse contiene el gen *pilE* (n.º de registro AAF40497) o un homólogo del mismo. El gen para *pilE* o un homólogo del mismo puede seleccionarse de una amplia variedad de organismos diferentes. En un aspecto, el fragmento de ADN para *pilE* se selecciona de *Neisseria* (por ejemplo, *meningitidis* o *gonorrhoea*). Por supuesto, tal como se describió anteriormente, estas secuencias pueden modificarse usando cualquier método conocido en la técnica para el uso previsto. Cuando se usa la proteína expresada por el gen *pilE* de *N. meningitidis* MC58 (n.º de registro AAF40497), se glicosila Ser63 de la proteína madura por la oligosacaryltransferasa de tipo PgIL expresada por el gen *pglL* de *N. meningitidis* MC58 (n.º de registro AAF41024). Por supuesto, tal como apreciará un experto en la técnica, el sitio de glicosilación puede diferir dependiendo de qué proteína se selecciona. La proteína que va a glicosilarse puede ser una proteína modificada tal como una proteína híbrida que contiene los determinantes para la glicosilación. Para los fines de esta invención, sin querer restringirse a la teoría, los determinantes para la glicosilación son sitios reconocidos por oligosacaryltransferasas de tipo PgIL como sitios de glicosilación. Por ejemplo, puede prepararse una proteína híbrida usando métodos conocidos en la técnica, en la que la proteína resultante contiene los determinantes de glicosilación de dos proteínas diferentes. Por supuesto, un experto en la técnica apreciará también que pueden prepararse muchas otras proteínas híbridas.

En una realización adicional de la invención, la proteína que va a glicosilarse no es una proteína pilina. Cualquier proteína que comprenda los determinantes de glicosilación reconocidos por oligosacaryltransferasa de tipo PgIL pretende incluirse dentro de los métodos y sistemas de la presente invención.

El tercer fragmento de ADN usado para la glicosilación *in vivo* comprende genes requeridos para el ensamblaje de un glucano sobre un portador lipídico. Tal como se comentó anteriormente, los glucanos útiles en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, hexosas, derivados de N-acetilo de hexosas, oligosacáridos y polisacáridos. En un aspecto, cuando se usa una oligosacaryltransferasa de tipo PgIL, es posible O-glicosilar proteínas con polisacáridos o con glucanos que tienen hexosas o derivados de N-acetilo de hexosas en el extremo reductor, tal como se describió anteriormente. La O-glicosilación de proteínas con polisacáridos o con glucanos que

tienen hexosas o derivados de N-acetilo de hexosas en el extremo reductor es muy ventajosa. Por ejemplo, la capacidad para producir proteínas que están O-glicosiladas con tales glucanos es muy útil para el desarrollo de vacunas y agentes terapéuticos, tal como se comentará posteriormente.

5 En una realización de la invención, también puede usarse un fragmento de ADN que contiene el/los gen(es) que produce(n) glucanos de uno o más organismos. Por ejemplo, el/los gen(es) responsable(s) para producir los glucanos de *C. jejuni*, *N. meningitidis*, *P. aeruginosa* y *E. coli* puede(n) usarse en el presente documento (véase la figura 1). Estos genes pueden estar implicados además en el ensamblaje y la translocación de glucanos. Estos genes pueden incluir, pero no se limitan a, genes que codifican para glicosiltransferasas y otras enzimas requeridas para el ensamblaje y transporte de glucanos.

10 En determinados aspectos de la invención, dependiendo de la selección de las bacterias Gram-negativas, la síntesis de glucanos *in vivo* puede implicar también la unión de unidades de azúcar sobre un portador lipídico tal como un portador de poliprenol-pirofosfato o equivalente sintético de los mismos. Por ejemplo, puede seleccionarse undecaprenol-pirofosfato (o undecaprenol-PP) como portador de poliprenol-pirofosfato. Alternativamente, es posible introducir uno o más genes que producen estas enzimas. Sin querer restringirse a la teoría, se cree que la O-glicosilación se produce en el periplasma del organismo (por ejemplo, *E. coli*). Tal como apreciará un experto en la técnica, la introducción de estos genes así como los otros fragmentos de ADN descritos anteriormente, permite, por primera vez, la producción de proteínas O-glicosiladas en cualquier bacteria Gram-negativa.

15 Usando los métodos *in vivo* y los sistemas descritos anteriormente, es posible producir cantidades a gran escala de proteínas O-glicosiladas. Los organismos procariontes transformados con los fragmentos de ADN descritos anteriormente pueden hacerse crecer usando diversos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, estas bacterias Gram-negativas pueden hacerse crecer en un cultivo de caldo para producir la proteína O-glicosilada y la proteína O-glicosilada puede aislarse. El aislamiento de las proteínas O-glicosiladas puede realizarse usando diversos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse cromatografía de afinidad de lectinas (Faridmoayer, A. *et al.*, 2007, J. Bacteriol. 189(22):8088-8098).

20 Aunque los métodos descritos anteriormente son útiles para la producción *in vivo* de proteínas glicosiladas, otra realización de la presente invención proporciona métodos y sistemas para la producción *in vitro* de proteínas O-glicosiladas. En una realización, el método comprende hacer reaccionar la proteína PiiE que es un producto expresión de *pilE* (n.º de registro AAF40497) con un glucano unido a un portador de undecaprenol-PP, en presencia de una oligosacaryltransferasa de tipo PglL. En un aspecto, la oligosacaryltransferasa de tipo PglL es PglL expresada a partir del gen *pglL* de *N. meningitidis* MC58 (n.º de registro AAF41024).

25 Un experto en la técnica apreciará que los fragmentos de ADN que codifican para *pilE* y *pglL* pueden modificarse o truncarse usando métodos conocidos en la técnica para el uso previsto. Estos fragmentos de ADN pueden expresarse en un organismo tal como se comentó anteriormente y tanto las proteínas pueden purificarse usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la oligosacaryltransferasa producida a partir de *pglL* se purifica a partir de fracciones de membrana solubilizadas usando técnicas conocidas en la técnica.

30 Para producir proteínas O-glicosiladas *in vitro*, la oligosacaryltransferasa puede incubarse con proteína y glucano que expresan diversas bacterias Gram-negativas. Por supuesto, un experto en la técnica apreciará que la proteína y el glucano no tienen que originarse a partir del mismo organismo procarionte. Tal como apreciará un experto en la técnica, las condiciones de incubación pueden variar ampliamente. Por ejemplo, las proteínas y los glucanos pueden incubarse en un tampón que tiene un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 8. En un aspecto, el tampón puede ser solución salina tamponada con fosfato. En otro aspecto, el tampón puede ser Tris-HCl 50 mM, que tiene un pH de 7,5.

35 La proteína glicosilada puede purificarse entonces y caracterizarse mediante técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, las técnicas dadas a conocer en Kowarik *et al.* (2006, Science, 314:1148-1150) pueden adaptarse en el presente documento para la producción *in vitro* de proteínas O-glicosiladas.

40 Las proteínas glicosiladas producidas en el presente documento pueden usarse como agentes terapéuticos para el tratamiento de varias enfermedades, en las que se administra una cantidad eficaz de la proteína O-glicosilada a un sujeto que necesita tal tratamiento. Los ejemplos de estas enfermedades incluyen, pero no se limitan a, trastornos autoinmunitarios, infecciones por VIH y hepatitis C, tuberculosis, candidiasis, leishmaniasis y diversas infecciones bacterianas. Además, se ha mostrado que algunos glucanos tienen posibles aplicaciones para el tratamiento de varias enfermedades autoinmunitarias que afectan a una porción de la población humana.

45 Las proteínas glicosiladas producidas en el presente documento pueden usarse también como vacuna o en una composición farmacéutica para la prevención de una enfermedad cuando se administra una cantidad eficaz de la proteína a un sujeto que necesita tal tratamiento. Por tanto, los métodos descritos en el presente documento para

producir varias proteínas O-glicosiladas diferentes demostrarán ser útiles en el descubrimiento de fármacos.

Los siguientes materiales y métodos se usaron en los ejemplos que siguen. Estos materiales y métodos son para fines ilustrativos.

5

Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento

10

Pueden hacerse crecer células de *E. coli* y *P. aeruginosa* 1244 en LB a 37°C. Se añadieron trimetoprima a 100 µg/ml, tetraciclina a 20 µg/ml, espectinomicina a 80 µg/ml, cloramfenicol a 20 µg/ml, kanamicina 50 µg/ml y ampicilina a 100 µg/ml en el medio cuando se requería. Las cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* así como los plásmidos de DH5α que pueden usarse se enumeran en la tabla 1. Por supuesto, un experto en la técnica apreciará que también pueden usarse otras cepas y plásmidos no enumerados en la tabla 1.

Tabla 1:

Cepa	Descripción	Fuente/referencia
Cepas bacterianas		
<i>E. coli</i> DH5α	F-φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_k⁻, m_k⁺</i>) <i>gal phoA supE44 λ thi¹ gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> CLM24	W3110 que carece de ligasa Waal	Feldman, M. F. <i>et al.</i> , 2005, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102:3016-21.
<i>E. coli</i> Sφ874	<i>LacZ trp</i> Δ (<i>sbcB-rfb</i>) <i>upp</i>	Neuhard, J., y E.
	<i>rel rpsL</i>	Thomassen. 1976, J. Bacteriol. 126:999-1001.
<i>E. coli</i> SCM3	Sφ874, Δ <i>waal</i>	Faridmoayer, A. <i>et al.</i> , <i>supra</i>
<i>E. coli</i> SCM7	Sφ874, Δ <i>wec</i>	Alaimo, C., <i>et al.</i> , 2006, Embo J. 25:967-76.
<i>E. coli</i> JM109 (P4729) que expresa O-antígeno de <i>Salmonella</i> , SGSC# 2442.	<i>E. coli</i> JM109 transformada con pPR1347, que codifica para O-antígeno de <i>S. enterica</i> LT2, Km ^R	Salmonella Genetic Stock, University of Calgary (SGSC)
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium (SL3749), SGSC# 228	Serogrupo B, mutante de O-antígeno ligasa (Δ <i>rfa</i>)	Salmonella Genetic Stock, University of Calgary (SGSC)
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium (SL901), SGSC# 82	Serogrupo B, mutante de O-antígeno polimerasa (Δ <i>wzy</i>)	Salmonella Genetic Stock, University of Calgary (SGSC)
<i>Salmonella enterica</i> Typhi	Mutante de O-antígeno polimerasa (Δ <i>wzy</i>)	Hoare, A. <i>et al.</i> , 2006, Infect. Immun. 74(3):1555-64
Plásmidos		
pSPORT1	Vector de clonación, Amp ^R	Invitrogen
pMLBAD	Vector de clonación, inducible por arabinosa, Tmp ^R	Lefebre, M. D., y M. A. Valvano. 2002, Appl. Environ. Microbiol. 68:5956-64.
pEXT20	Vector de clonación, inducible por IPTG, Amp ^R	Dykxhoorn, D. M., R. St Pierre, y T. Linn. 1996, Gene 177:133-6
pEXT21	Vector de clonación, inducible por IPTG, Sp ^R	
pEXT22	Vector de clonación, inducible por IPTG, Km ^R	

ES 2 652 416 T3

pPAC46	Codifica para operón <i>pilA-pilO</i> de <i>P. aeruginosa</i> 1244, Amp ^R	Castric, P. 1995. Microbiology 141 (Pt 5):1247-54.
pACYC <i>pgl</i>	Codifica para la agrupación de <i>C. jejuni</i> <i>pgl</i> , Cm ^R	Wacker, M., <i>et al.</i> , <i>supra</i>
pACYC <i>pglBmut</i>	Codifica para la <i>C. jejuni</i> <i>pgl</i> que contiene mutaciones W458A y D459A in	
	PglB, Cm ^R	
pACYC <i>pglKmut</i>	Codifica para <i>C. jejuni</i> <i>pgl</i> que contiene un casete Km en <i>pglK</i> , Cm ^R , Km ^R	Alaimo, C. <i>et al.</i> , <i>supra</i>
pLPS2	Codifica para la agrupación del antígeno O11 de <i>P. aeruginosa</i> PA103, Tet ^R	Goldberg, J.B. <i>et al.</i> , 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89(22):10716-10720
pJHCV32	Codifica para la agrupación del antígeno 07 de <i>E. coli</i> , Tet ^R	Marolda, C. L., <i>et al.</i> , 1999, Microbiology 145 (Pt 9):2485-95
pJHCV32::Tn3HoHo1-134	Codifica para la agrupación del antígeno 07 de <i>E. coli</i> que porta un transposón en <i>wzz</i> , Tet ^R Amp ^R	
pJHCV32::Tn3HoHo1-136	Codifica para la agrupación del antígeno 07 de <i>E. coli</i> que porta un transposón en <i>wzy</i> , Tet ^R Amp ^R	
pCW27	<i>pglK</i> en pMLBAD/Myc-6xHis, Tp ^R	Alaimo, C., <i>et al.</i> , <i>supra</i>
pWA2	AcrA etiquetado con hexa-His periplásmico soluble bajo el control del promotor Tet, en pBR322, Amp ^R	Feldman, M. F., <i>et al.</i> , <i>supra</i>
pMAF10	PglB etiquetado con HA clonado en pMLBAD, Tp ^R	Feldman, M. F., <i>et al.</i> , <i>supra</i>
pPR1347	Codifica para la agrupación del O-antígeno de <i>Salmonella enterica</i> LT2	Neal BL, Brown PK, Reeves PR. 1993, J. Bacteriol. 175(21):7115-8.
pAMF3	PilE clonado en pEXT20, Amp ^R	Faridmoayer, A. <i>et al.</i> , <i>supra</i>
pAMF4	PglL etiquetado con His ₁₀ clonado en pSPORT1, Km ^R	
pAMF5	PglL etiquetado con His ₁₀ clonado en pEXT22, Km ^R	
pAMF6	PilE clonado en pEXT21, Sp ^R	
pAMF7	PilE etiquetado con His ₆ clonado en pEXT20, Amp ^R	
pAMF8	PglL clonado en pEXT20, Amp ^R	
PAMF9	PilE etiquetado con His ₆ clonado en	
	pMLBAD Tp ^R	
PAMF14	PilE etiquetado con His ₆ clonado en pEXT21, Sp ^R	
pPiIES63A	PilE mutado en Ser 63 a Ala, clonado en pEXT21, Sp ^R	
pPiIET62A	PilE mutado en Thr 63 a Ala, clonado en pEXT21, Sp ^R	
pPiIEN61A	PilE mutado en Asn 61 a Ala, clonado en pEXT21, Sp ^R	
pPiIEN60A	PilE mutado en Asn 60 a Ala, clonado en pEXT21, Sp ^R	

	Anticuerpo policlonal, conjugado de peroxidasa		
IgG de α -ratón de cabra	Conjugado con peroxidasa	1:8,000	Rockland
IgM de α -ratón de cabra	Conjugado con peroxidasa	1:10.000	Calbiochem
α -Biotina de cabra	Conjugado con peroxidasa	1:5.000	Sigma
α -Conejo de cabra	Conjugado con peroxidasa	1:8.000	Bio-Rad
α -STL3	Anticuerpo policlonal contra la lectina STL3	1:6.000	Tateno, H., <i>et al.</i> , 1998, J. Biol. Chem., 273:19190-7
Lectinas	Especificidad de azúcar	Concentración	
STL3	Lectina de unión a ramnosa	2,5 μ g/ml	Tateno, H., <i>et al.</i> , <i>supra</i>
SBA	Lectina de unión a GalNAc, conjugada con biotina	2,5 μ g/ml	Vector Labs

Purificación de pilina glicosilada usando cromatografía de afinidad

Se produjo pilina de la cepa MC58 (codificada por el gen *pilE*), glicosilada con el glucano de *C. jejuni* en *E. coli* SCM3 transformada con pAMF5, pAMF14 (que expresa *pilE* etiquetada con 6XHis C-terminal, tabla I), y pACYC*pglBmut*. Se añadió IPTG (0,5 mM) a los cultivos y se recogieron las células en la fase estacionaria. Se lavaron los sedimentos con tampón Tris-HCl 30 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 0,3 M (tampón 1) y se resuspendieron en el mismo tampón que contenía cóctel inhibidor de proteasas libre de EDTA completo (Roche). Se rompieron las células mediante una prensa francesa y se centrifugaron a 10.000Xg durante 10 min para eliminar los residuos celulares. Se separaron las membranas mediante ultracentrifugación (200.000Xg durante 2 h) y se resuspendieron en también 1 que contenía n-dodecil- β -D-maltósido (DDM) al 2%, (tampón 2). Se centrifugó la suspensión (200.000Xg durante 1 h) y luego se añadió imidazol al sobrenadante en la concentración final de 20 mM. Se aplicó la disolución a una columna de Ni-NTA agarosa (Qiagen) previamente equilibrada con tampón 2 que contenía imidazol 20 mM y se lavó con el mismo tampón para eliminar las proteínas no unidas. Se eluyeron las proteínas unidas de la columna usando tampón 2 que contenía imidazol 250 mM. Se dializó el eluato durante la noche a 4°C en Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, que contenía NaCl 10 mM, DTT 1 mM y DDM al 0,8% (tampón 3). Se aplicaron las disoluciones de proteína a una columna de SBA-agarosa (Vector Labs) equilibrada mediante el tampón 3. Se eliminaron las proteínas no unidas lavando la columna con tampón 3 y se eluyeron las proteínas con tampón 3 que contenía D-galactosa 0,5 M. Se recogieron las fracciones de proteína y se mantuvieron a -20°C.

β -eliminación de O-glucanos

Se usó en este experimento una cepa de *E. coli* CLM24 que producía PilE O-glicosilada. Se transformó esta cepa con pAMF5, pAMF6 y pACYC*pglBmut*. Se recogieron las células completas y se mezclaron con tampón de muestra Laemmli (SDS al 4%, glicerol al 20%, 2-mercaptoetanol al 10%, azul de bromofenol al 0,004% y Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8) y se calentaron durante 10 minutos a 95°C. Se fraccionaron las muestras mediante SDS-PAGE en geles al 10%. Se transfirieron las proteínas a una membrana de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) y se cortó en tiras. Se trataron las tiras de membrana con diferentes concentraciones de hidróxido de sodio (0,055, 0,07, 0,09 M). Se detectó el efecto del tratamiento con álcali sobre la desglicosilación de las proteínas (es decir, β -eliminación) tras 16 h de incubación a 40°C usando el anticuerpo específico de glucano R12.

Con el fin de que la invención se entienda más completamente, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son para fines ilustrativos sólo y no han de interpretarse como limitativos del alcance de la invención de ningún modo. Además, estos ejemplos no pretenden excluir equivalentes y variaciones de la presente invención, que son evidentes para un experto en la técnica.

EJEMPLO 1

Expresión funcional de PglL en *E. coli*

La mutagénesis de *pglL* en *N. meningitidis* dio como resultado la producción de pilina no glicosilada. Se expresó

PgIL en *E. coli* y se analizó con respecto a la glicosilación de pilina de *N. meningitidis*, que está codificada por el gen *pilE*. Se transformaron los plásmidos pACYC*pglB*_{mut} y pAMF3, que expresan el gen de pilina de *N. meningitidis pilE*, en células CLM24. El plásmido pACYC*pgl* porta el locus *pgl*, que codifica para todas las enzimas necesarias para la síntesis del glucano normalmente transferido durante la N-glicosilación en *C. jejuni* (figura 1A) (4). Su derivado pACYC*pglB*_{mut} porta una mutación que inactiva la PglB oligosacariltransferasa. Se detectaron dos bandas, que corresponden presumiblemente a pilina premadura y madura en extractos celulares completos mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando un anticuerpo monoclonal dirigido contra pilina de *N. meningitidis* (véase el panel superior de la figura 2A). Cuando estas células se transformaron adicionalmente con el plásmido pAMF5, que codifica para PglL, se detectó una banda extra de movilidad electroforética más lenta con tanto un antisuero monoclonal anti-pilina como el antisuero R12 específico de glucano de *C. jejuni* (véase la figura 2A, carriles 3), lo que indica que la pilina estaba glicosilada. Puesto que la presencia de pilina glicosilada era dependiente de PglL, se concluyó que PglL presenta actividad OTasa. La estructura del glucano de *C. jejuni* transferido en este experimento por PglL es diferente del trisacárido encontrado en pilina de *N. meningitidis* (figura 1B), lo que indica que PglL tiene también una especificidad de azúcar relajada.

Los glucanos unidos a O pueden liberarse de las proteínas mediante una reacción de β -eliminación en condiciones alcalinas ligeras. Por el contrario, los glucanos unidos a N no se desprenden de las proteínas en estas condiciones. La unión entre pilina y el glucano de *C. jejuni* era susceptible de β -eliminación (véase la figura 3). Se transfirieron extractos celulares completos que contenían pilina glicosilada a membranas de PVDF y se trataron con diferentes concentraciones de NaOH según el protocolo descrito por Duk *et al* (1997, Anal. Biochem. 253:98-102). Se detectó el glucano unido a proteína con el antisuero R12. La unión entre pilina y el glucano era lábil a álcalis, mientras que AcrA N-glicosilada era resistente al tratamiento (figura 3B), lo que confirma que, tal como se esperaba, la pilina estaba realmente O-glicosilada.

Esto está apoyado adicionalmente por el hecho de que la mutación de S63 suprimió la glicosilación (figura 2B, carriles 2). La observación de que el pentapéptido S⁶³ AGVA⁶⁷ estaba unido a un glucano de *C. jejuni*, tal como se identificó mediante espectrometría de masas (figura 4), proporciona apoyo adicional de la O-glicosilación.

EJEMPLO 2

PglL puede transferir un polisacárido, mientras que pilO transfiere sólo hidratos de carbono cortos.

La polimerización de O-antígeno y, tal como se ha mostrado, la glicosilación de pilina se producen ambos en el periplasma bacteriano. Se sometió a prueba la transferencia de antígeno 07 polimerizado (figura 1C) por PilO en *E. coli*. La cepa S Φ 874 (tabla 1) porta una delección que abarca la agrupación de O-antígeno endógena completa. Para generar polisacáridos unidos a O, se introdujeron plásmidos que contenían la agrupación génica necesaria para la síntesis del antígeno 07 de *E. coli* en la cepa S Φ 874. Se produjeron tres variantes de antígeno 07 diferentes usando diferentes plásmidos: antígeno 07 de tipo natural (07 WT; véase el carril 1 en la figura 5A); un mutante de O-antígeno polimerasa (O7wz_{mut}) que sólo produce una única subunidad de 07 (véase el carril 2 en la figura 5A); y un mutante en el gen regulador de la longitud de cadena O (OT wzz_{mut}) que produce un O-antígeno con distribución de longitud alterada (véase el carril 3 en la figura 5A) (20). Se observó la capacidad de PilO para transferir las tres variantes del antígeno 07 en la cepa SCM3 (tabla 1), un derivado de la cepa S Φ 874 que carece del gen *waaL*. En el mutante *wzy*, se transfirió una única subunidad de antígeno 07 a la pilina (figura 5B, carril 7). Aunque la transferencia del antígeno 07 en el antígeno 07 de tipo natural era indetectable (figura 5B, carril 6), se transfirieron hasta dos subunidades de O-antígeno a la pilina en el mutante *wzz* (figura 5B, carril 8). No se transfirieron a la pilina cadenas de O-antígeno que contenían tres o más subunidades repetitivas, aunque el mutante *wzz* produce cantidades similares de cadenas que contienen dos, tres y cuatro unidades de repetición de O (figura 5A, carril 3). Por tanto, PilO no puede transferir glucanos de O-antígeno que contienen más de dos subunidades repetitivas. No se detectó pilina glicosilada en la cepa 07 de tipo natural porque la formación de cadenas cortas que podían transferirse por PilO se reduce por la actividad de Wzz. Por el contrario, PglL podía transferir antígeno 07 corto y también completamente polimerizado (figura 5B, carriles 5-8).

La figura 6 muestra que el polisacárido se transfiere a un residuo de serina, puesto que la mutación de N60, N61 y T62 no afectan a la glicosilación, mientras que la mutación S63A suprime completamente la transferencia del polisacárido a PilE.

EJEMPLO 3

Se requiere translocación de Und-PP-glucano al periplasma para la actividad de PilO y PglL

En la biosíntesis de O-antígeno, peptidoglucano, exopolisacáridos y cápsula, así como en la N-glicosilación de proteínas en *C. jejuni*, se translocan sustratos de undecaprenol-pirofosfato (Und-PP) o “se invierten” dentro del

periplasma mediante la acción de flipasas (Alaimo, C., *et al.*, citado anteriormente). La cepa de *E. coli* SCM7 carece de todas las flipasas conocidas, y se ha usado recientemente para caracterizar PglK, la flipasa del sistema de glicosilación de *C. jejuni* (tabla 1) (Alaimo, C., *et al.*, citado anteriormente). Se usó esta cepa para identificar el compartimento celular en el que tiene lugar la glicosilación de pilina. Se introdujeron pPAC46 y pACYC*pgl* o pACYC*pglK* (tabla 1) en células SCM7. Se detectó glicosilación de pilina en las células que portaban la agrupación de *pgl* intacta. pACYC*pglK* porta una mutación no polar en el gen *pglK*. La pilina no estaba glicosilada en células SCM7 que portaban pACYC*pglK*, en donde no estaba presente flipasa y por tanto se impide la translocación de Und-PP-glucanos dentro del periplasma (véase el carril 2, figuras 7A y 7B). Se detectó actividad de PglL sólo en presencia de una flipasa funcional en las células. Por tanto, se requiere la translocación del oligosacárido unido a Und-PP para la glicosilación dependiente de PglL, lo que indica que las actividades de PglL se localizan en el periplasma.

EJEMPLO 4

15 PglL puede transferir glucanos que portan una hexosa en el extremo reductor a la pilina

El O-antígeno de *Salmonella enterica* de diferentes serovares (*es decir*, Typhimurium y Typhi) se componen de subunidades de repetición con una hexosa en el extremo reductor (figura 1). Para someter a prueba si PglL puede transferir un glucano que contiene una hexosa en el extremo reductor, se coexpresaron PglL y PilE en *E. coli* JM109 que portaba el plásmido pPR1347 (tabla 1), que codifica para las enzimas requeridas para la síntesis de O-antígeno de *S. enterica* serovar Typhimurium. El análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpo anti-pilina mostró que este O-antígeno puede transferirse a PilE mediante PglL en *E. coli* (véase la figura 8A, carril 2). El reemplazo de PglL por el vector vacío correspondiente dio como resultado la expresión de la pilina no glicosilada (figura 8A, carril 4). Además, el mutante de pilina T62A también está glicosilado con O-antígeno de *Salmonella* (figura 8A, carril 3) mientras que el mutante de pilina S63A suprime la glicosilación (figura 8A, carril 1). Esto demuestra que un glucano que contiene galactosa en el extremo reductor puede unirse a un residuo de serina en PilE.

Además, puede lograrse la glicosilación de pilina en el huésped original *S. enterica* cuando están presentes tanto PglL como PilE (figura 8B, carril 2). El reemplazo del plásmido que codifica para PglL por el vector vacío correspondiente dio como resultado pilina no glicosilada (figura 8B, carril 1). PglL también puede transferir una única subunidad de O-antígeno producida en los mutantes Wzy de *S. enterica* serovar Typhimurium (figura 8B, carril 4), y en los mutantes Wzy de *S. enterica* serovar Typhi (figura 8B, carril 6). Las flechas en la figura 8B indican la posición de pilina glicosilada con una única subunidad de O-antígeno. Los carriles 3 y 5 son controles negativos de glicosilación, en los que el plásmido que expresa PglL se ha reemplazado por el vector vacío correspondiente.

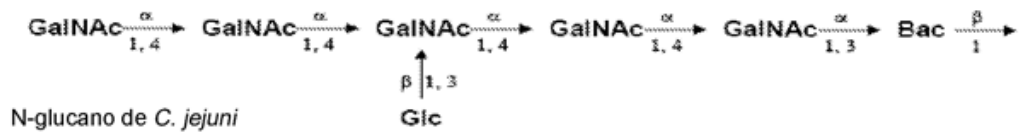
REIVINDICACIONES

1. Método para la O-glicosilación de proteínas con un glucano en una bacteria Gram-negativa, comprendiendo el método introducir en la bacteria Gram-negativa, en cualquier orden particular, al menos:
- 5 (a) ADN que comprende un gen que produce una oligosacaryltransferasa PglL de *Neisseria*; y
- (b) ADN que comprende un gen que produce una proteína que va a O-glicosilarse;
- 10 en el que la oligosacaryltransferasa PglL facilita la unión covalente del glucano a la proteína para producir la proteína O-glicosilada,
- en el que el método comprende además introducir ADN que comprende un gen requerido para el ensamblaje del glucano sobre un portador lipídico.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, en el que se aplica uno cualquiera o más de los siguientes:
- a) el portador lipídico es un poliprenol-pirofosfato que comprende undecaprenol-pirofosfato, dolicol-pirofosfato, o equivalente sintético de los mismos;
- 20 b) el gen comprende una glicosil transferasa o una enzima requerida para el ensamblaje y transporte del glucano;
- c) la oligosacaryltransferasa PglL se deriva mediante una proteína expresada por *pglL* en *Neisseria*;
- 25 d) el gen que produce una proteína que va a O-glicosilarse comprende *pilE* de *Neisseria*;
- e) el gen que produce la oligosacaryltransferasa PglL es *pglL* y el gen que produce la proteína que va a O-glicosilarse es *pilE*;
- 30 f) la bacteria Gram-negativa es *Escherichia coli*;
- g) la bacteria Gram-negativa es *Salmonella*;
- h) el glucano es un polisacárido;
- 35 i) el glucano comprende una hexosa o un derivado de N-acetilhexosa en el extremo reductor;
- j) el gen comprende una glicosil transferasa o una enzima requerida para el ensamblaje y el transporte del glucano.
- 40 3. Método para producir la O-glicosilación de proteínas con un glucano en una bacteria Gram-negativa, comprendiendo el método introducir, dentro de la bacteria Gram-negativa, en cualquier orden particular, al menos:
- a) ADN que comprende *pglL* que produce una oligosacaryltransferasa PglL de *Neisseria*;
- 45 b) ADN que comprende *pilE* que produce una proteína que va a O-glicosilarse; y
- c) ADN que comprende un gen requerido para el ensamblaje de un glucano sobre un portador lipídico;
- 50 en el que la oligosacaryltransferasa PglL facilita la unión covalente del glucano a la proteína para producir las proteínas O-glicosiladas.
4. Método según la reivindicación 3, en el que se aplica uno cualquiera o más de los siguientes:
- 55 a) el ADN que comprende *pilE* es *pilE* de *Neisseria*;
- b) la bacteria Gram-negativa es *Escherichia coli*;
- c) la bacteria Gram-negativa es *Salmonella*;
- 60 d) el glucano es un polisacárido;
- e) el glucano comprende una hexosa o un derivado de N-acetilhexosa en el extremo reductor;

- f) el portador lipídico es un poliprenol-pirofosfato que comprende undecaprenol-pirofosfato, dolicol-pirofosfato, o equivalente sintético de los mismos;
- 5 g) el gen comprende una glicosil transferasa o una enzima requerida para el ensamblaje y transporte del glucano.
5. Sistema para producir una proteína O-glicosilada que comprende una bacteria Gram-negativa y al menos los siguientes componentes presentes dentro de la bacteria Gram-negativa:
- 10 (a) ADN que produce una oligosacariltransferasa PglL de *Neisseria*;
- (b) ADN que produce la proteína que va a O-glicosilarse; y
- (c) ADN que comprende un gen requerido para el ensamblaje de un glucano sobre un portador lipídico;
- 15 en el que la oligosacariltransferasa PglL facilita la unión covalente del glucano a la proteína para producir la proteína O-glicosilada.
6. Sistema según la reivindicación 5, en el que se aplica uno cualquiera o más de los siguientes:
- 20 a) el ADN que produce la oligosacariltransferasa PglL es *pglL* y el ADN que produce la proteína que va a O-glicosilada es *pilE*;
- b) la bacteria Gram-negativa es *Escherichia coli*;
- 25 c) la bacteria Gram-negativa es *Salmonella*;
- d) el glucano es un polisacárido;
- 30 e) el glucano comprende una hexosa o un derivado de N-acetilhexosa en el extremo reductor;
- e) el portador lipídico es una poliprenol-pirofosfato que comprende undecaprenol-pirofosfato, dolicol-pirofosfato, o equivalente sintético de los mismos;
- 35 g) el gen comprende una glicosiltransferasa o una enzima requerida para el ensamblaje y el transporte del glucano.
7. Sistema para producir una proteína O-glicosilada que comprende una bacteria Gram-negativa y al menos los siguientes componentes presentes dentro de la bacteria Gram-negativa:
- 40 (a) ADN que comprende *pglL* que produce una oligosacariltransferasa PglL de *Neisseria*;
- (b) ADN que comprende *pilE* que produce la proteína que va a O-glicosilarse; y
- (c) ADN que comprende un gen requerido para el ensamblaje de un glucano sobre un portador lipídico;
- 45 en el que la oligosacariltransferasa facilita la unión covalente del glucano a la proteína para producir la proteína O-glicosilada.
8. Sistema según la reivindicación 7, en el que se aplica uno cualquiera o más de los siguientes:
- 50 a) el ADN que comprende *pilE* es *pilE* de *Neisseria*;
- b) la bacteria Gram-negativa es *Escherichia coli*;
- 55 c) la bacteria Gram-negativa es *Salmonella*;
- d) el glucano es un polisacárido;
- e) el glucano comprende una hexosa o un derivado de N-acetilhexosa en el extremo reductor;
- 60 f) el portador lipídico es un poliprenol-pirofosfato que comprende undecaprenol-pirofosfato, dolicol-pirofosfato, o un equivalente sintético de los mismos.
9. Método para producir una proteína O-glicosilada que comprende hacer reaccionar:

- (a) la proteína que va a O-glicosilarse, y
- 5 (b) un glucano unido a un portador lipídico en presencia de una oligosacaryltransferasa PgL de *Neisseria*;
en el que la oligosacaryltransferasa PgL transfiere el glucano del portador lipídico a la proteína.
10. Método según la reivindicación 9, en el que se aplica uno cualquiera o más de los siguientes:
- 10 a) la proteína que va a glicosilarse es PilE y la oligosacaryltransferasa PgL es PgL;
- b) el portador lipídico es un poliprenol-pirofosfato que comprende undecaprenol-pirofosfato, dolicol-pirofosfato, o un equivalente sintético de los mismos;
- 15 c) tanto la proteína que va a glicosilarse, el glucano unido al portador lipídico como la oligosacaryltransferasa se han aislado de un cultivo de caldo de un procarionta;
- d) el procarionta es *Escherichia coli*;
- 20 e) el procarionta es *Salmonella*.
11. Método para producir una proteína O-glicosilada que comprende hacer reaccionar:
- (a) proteína PilE que es la producto expresión de *pilE*, y
- 25 (b) un glucano unido a un portador lipídico en presencia de una oligosacaryltransferasa que es el producto expresión de *pglL*;
- en el que la oligosacaryltransferasa transfiere el glucano del portador lipídico a la proteína.
- 30 12. Método según la reivindicación 11, en el que:
- a) el portador lipídico es un poliprenol-pirofosfato que comprende undecaprenol-pirofosfato, dolicol-pirofosfato, o un equivalente sintético de los mismos; y/o
- 35 b) tanto la proteína que va a glicosilarse, el glucano unido a un portador lipídico como la oligosacaryltransferasa se han aislado de un cultivo de caldo de un procarionta.
13. Método o sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para producir una proteína O-glicosilada que comprende además producir una vacuna o una composición farmacéutica.
- 40 14. Uso de proteína PgL y proteína PilE para producir proteínas O-glicosiladas mediante cualquiera de los métodos y sistemas según las reivindicaciones 1-12.

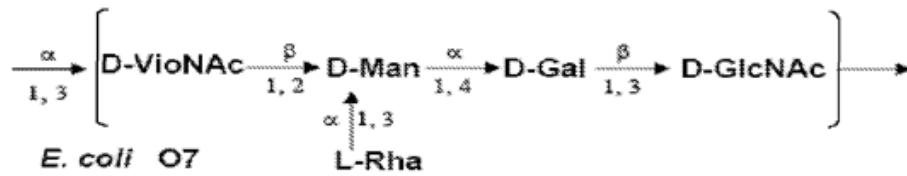
A



B

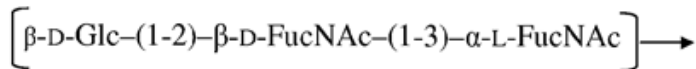
N. meningitidis
Gal(β1-4)Gal(α1-3)DATDH

C



D

P. aeruginosa O11



E

S. enterica LT2

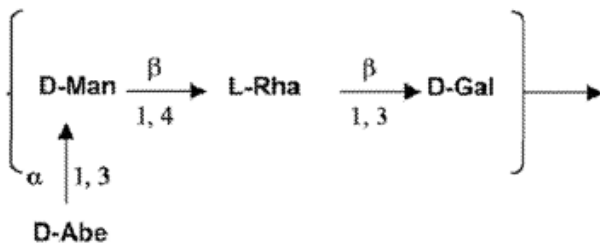
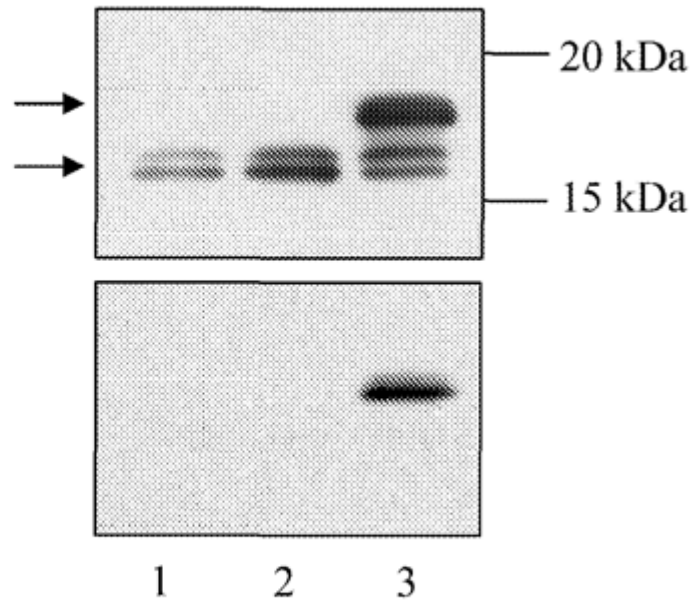


FIGURA 1

A



B

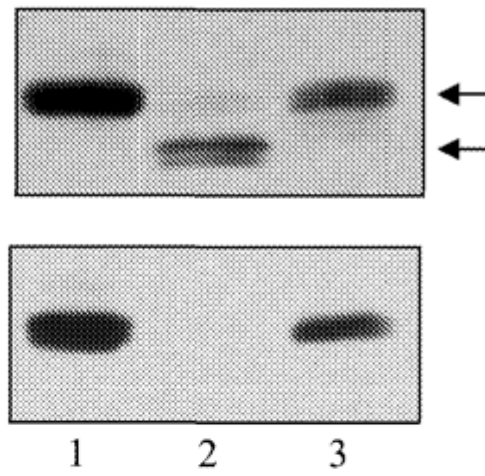


FIGURA 2

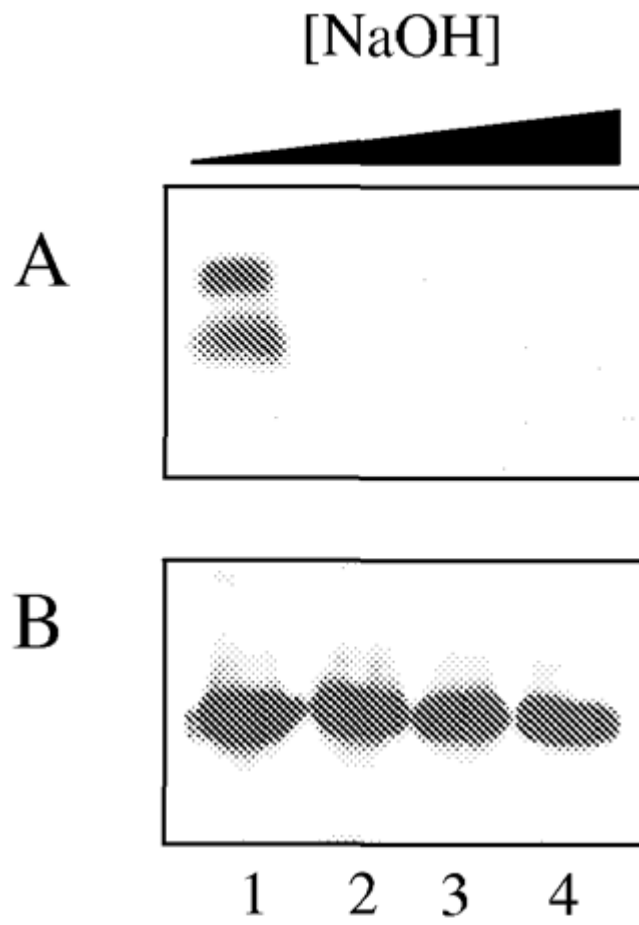


FIGURA 3

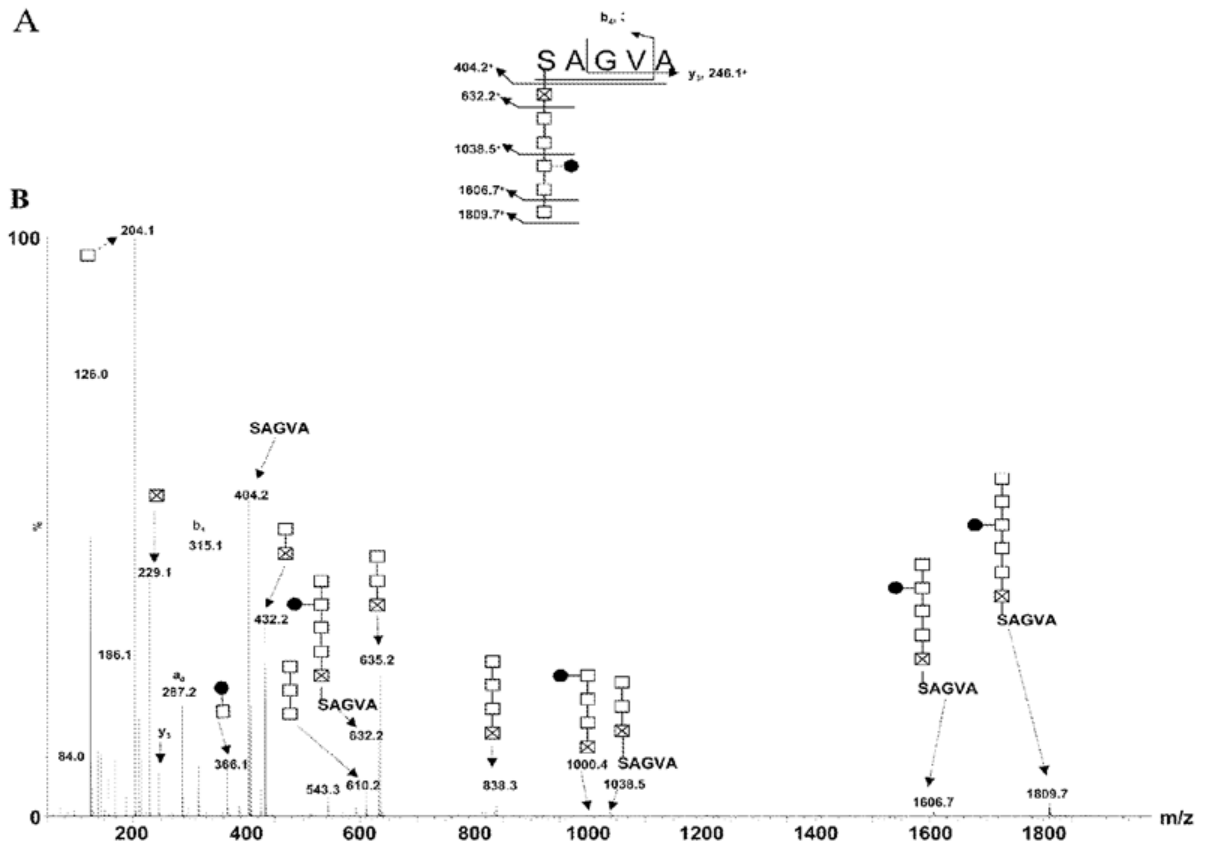
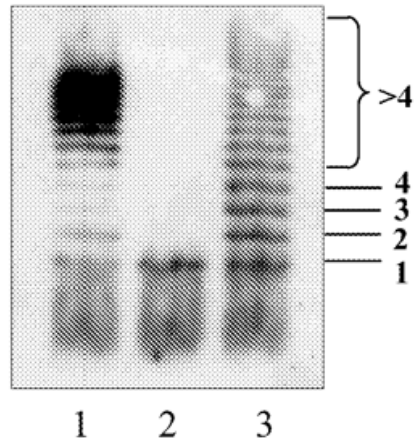


FIGURA 4

A



B

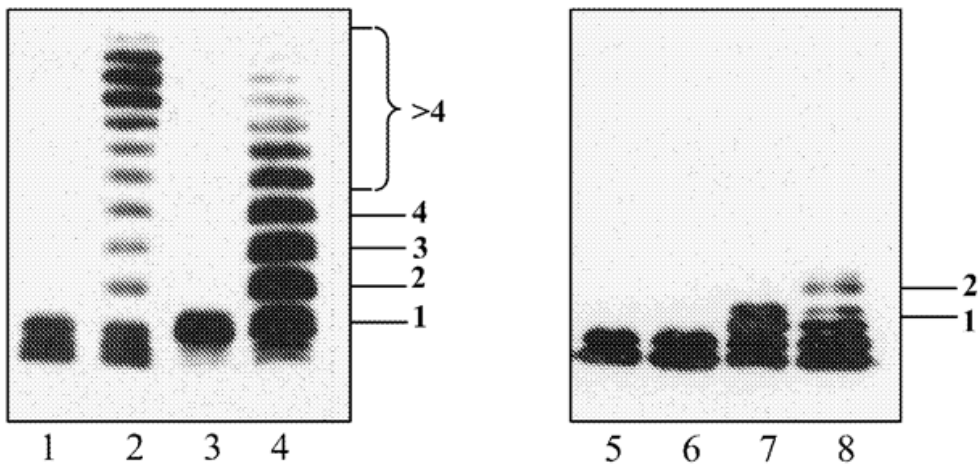


FIGURA 5

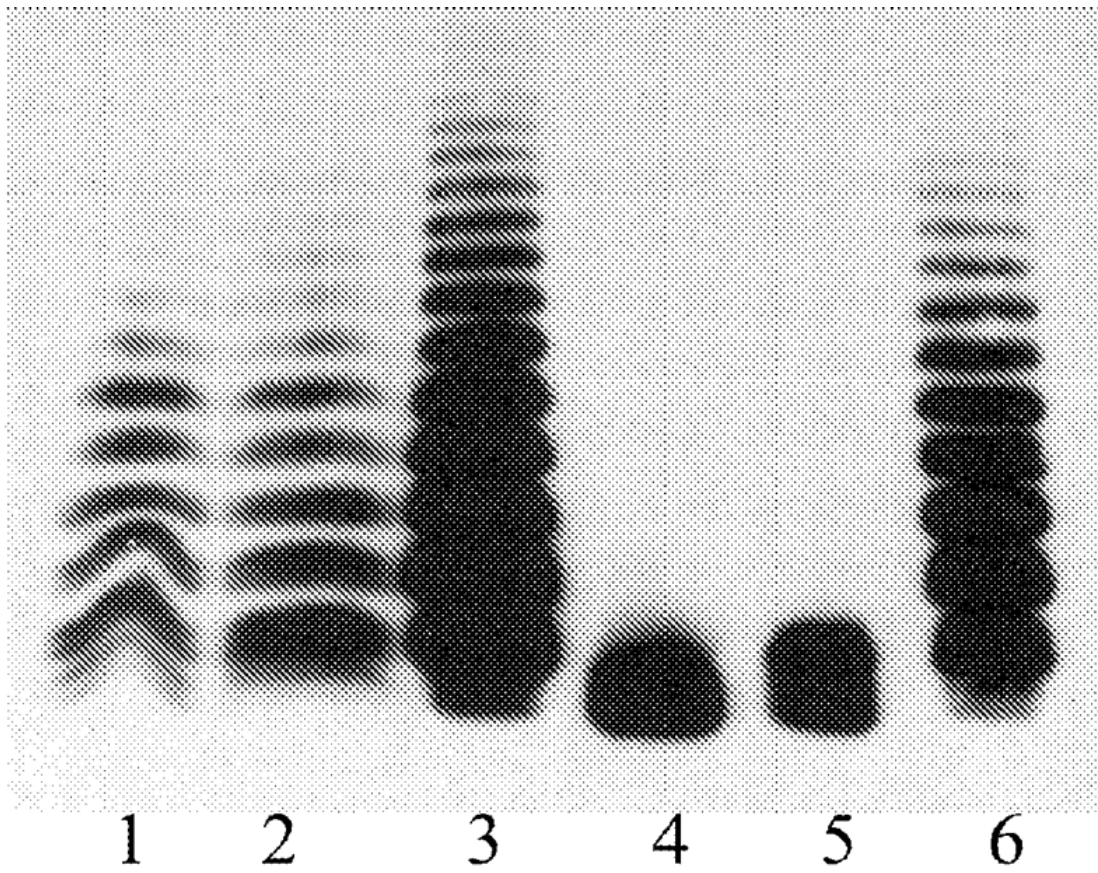


FIGURA 6

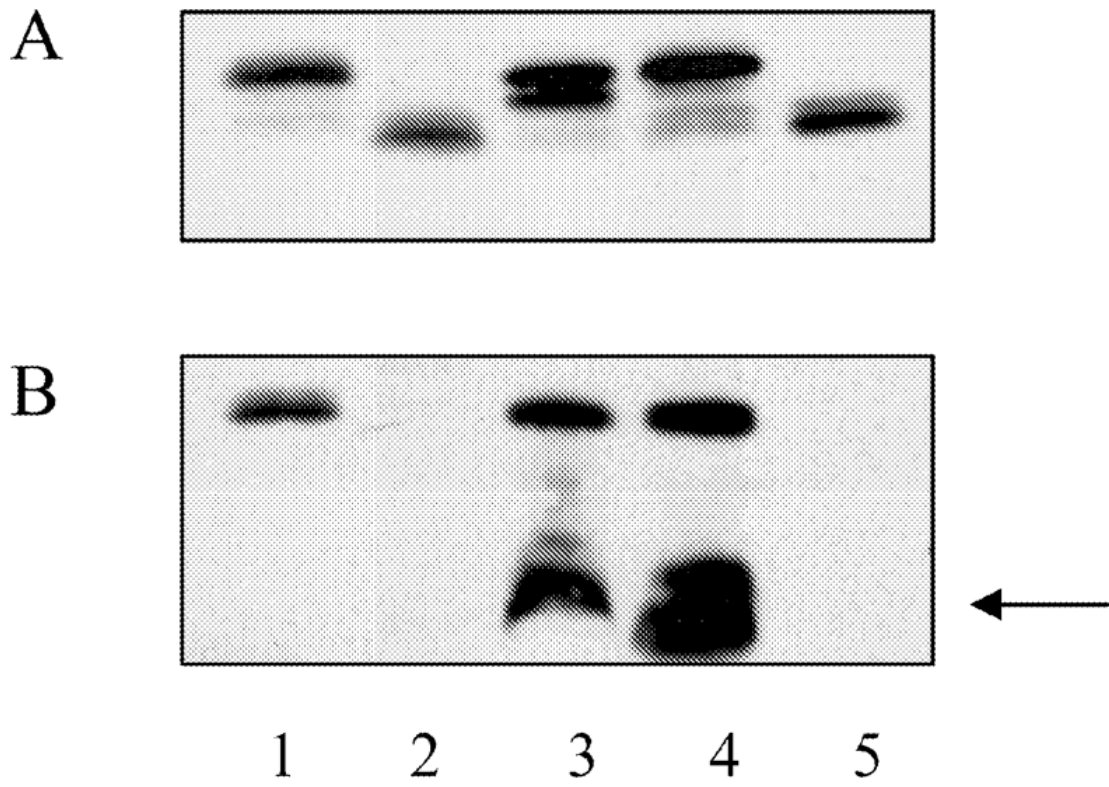
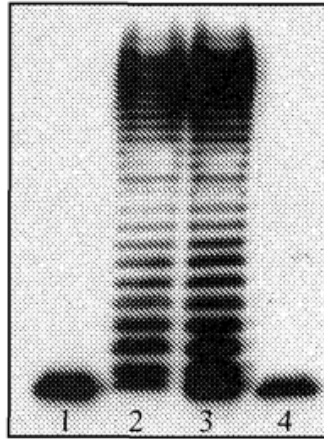


FIGURA 7

A



B

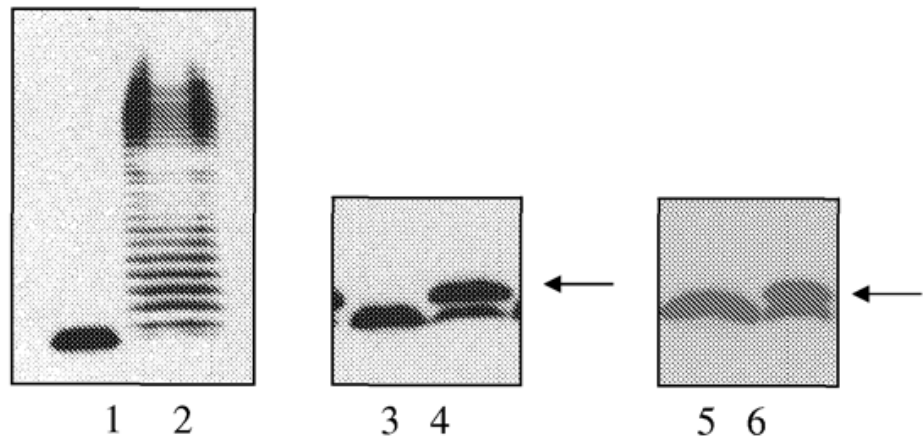


FIGURA 8