(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 684 087**

(51) Int. CI.:

C07K 14/205	(2006.01)	***C07K 9/00***	(2006.01)
A61K 39/106	(2006.01)	***C12N 15/00***	(2006.01)
A61K 39/116	(2006.01)	***C12N 15/31***	(2006.01)
A61K 39/385	(2006.01)	***C12N 15/62***	(2006.01)
A61K 39/39	(2006.01)	***G01N 33/564***	(2006.01)
A61P 31/04	(2006.01)	***A61K 39/02***	(2006.01)
A61P 37/04	(2006.01)	***C07K 16/00***	(2006.01)
C07K 19/00	(2006.01)	***C07K 16/28***	(2006.01)
C07K 7/06	(2006.01)	***C12P 21/00***	(2006.01)
C07K 7/08	(2006.01)	***A61K 39/00***	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.09.2011 PCT/CA2011/050535**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **08.03.2012 WO12027850**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2011 E 11820973 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 2611823**

(54) Título: **Péptido que contiene múltiples sequones de glicosilación ligada a N**

(30) Prioridad:

03.09.2010 US 379896 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.10.2018

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

SZYMANSKI, CHRISTINE y
NOTHAFT, HARALD

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

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

Péptido que contiene múltiples sequones de glicosilación ligada a N

Referencia cruzada a solicitud relacionada

Esta solicitud reivindica la prioridad para la solicitud de patente provisional estadounidense No. 61/379,896, presentada el 3 de septiembre de 2010.

Campo de la invención

La invención se refiere a péptidos derivados de campilobacter que contienen múltiples sequones secuenciales para la glicosilación ligada a N.

Antecedentes

Una vez se consideró que la glicosilación de la proteína asparagina (ligada a N) existía solo en eucariotas y arqueas hasta su descubrimiento en el ε-Proteobactenum Campylobacter jejuni (Szymanski CM et al., 1999: Evidence for a system of general protein glycosylation in Campylobacter jejuni. Mol Micro, 32(5): 1022-1030; Wacker M et al., 2002: N-linked glycosylation in Campylobacter jejuni and its functional transfer into E. coli. Science, 298(5599):1790-1793; Young NM et al., 2002: Structure of the N-linked glycan present on multiple glycoproteins in the Gram-negative bacterium, Campylobacter jejuni. J Biol Chem, 277(45):42530-42539). En eucariotas, la glicosilación ligada a N es un proceso esencial y está catalizada por un complejo de oligosacariltransferasa (OST) que consiste de 9 proteínas con STT3 que es la subunidad catalítica (para una revisión, véase: Yan A & Lennarz WJ., 2005: Unraveling the mechanism of protein N-linked glycosylation. J Biol Chem, 280(5):3121-3124). En C. jejuni, la glicosilación ligada a N se produce en el periplasma y PglB, la proteína ortóloga STT3, es la enzima clave responsable de la transferencia de oligosacáridos a péptidos y proteínas aceptores. La presencia de una secuencia consenso (un sequon de glicosilación ligada a N) dentro de los péptidos aceptores secretados es necesaria para el reconocimiento mediante PglB. Este sequon consiste en D/E-X_1-N-X_2-S/T, en la que X_1 y X_2 pueden ser cualquier aminoácido excepto prolina (Kowarik M et al., 2006: Definition of the bacterial N-glycosylation site consensus sequence. EMBO J, 25(9):1957-1966).

El modelo actual para el ensamble del glicano ligado a N de C. jejuni se muestra en la Figura 1 (Szymanski CM et al., 2003: Campylobacter - a tale of two protein glycosylation systems. Trends Microbiol, 5(11): 233-238). El heptasacárido ligado a bactoprenilpirofosfato se ensambla en el citosol mediante la adición de azúcares activados por nucleótidos (Szymanski CM et al., 2003: Campylobacter - a tale of two protein glycosylation systems. Trends Microbiol, 5(11): 233-238; Szymanski CM et al., 2003: Detection of conserved N-linked glycans and phase-variable lipooligosaccharides and capsules from campylobacter cells by mass spectrometry and high resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. J Biol Chem, 278(27): 24509-24520). El heptasacárido completo se trasloca a través de la membrana interna hacia el periplasma mediante el transportador de casete de unión a ATP (ABC) PglK (Alaimo C et al., 2006: Two distinct but interchangeable mechanisms for flipping of lipid-linked oligosaccharides. EMBO J, 25(5):967-976). El oligosacárido se transfiere a un sequon de glicosilación ligada a N mediante PglB o se libera en el espacio periplásmico como oligosacárido libre (fOS) (Nothaft et al., 2009: Study of free oligosaccharides derived from the bacterial N-glycosylation pathway. PNAS, 106(35): 15019-15024). (Young NM et al., 2002: Structure of the N-linked glycan present on multiple glycoproteins in the Gramnegative bacterium, Campylobacter jejuni. J Biol Chem, 277(45): 42530-42539; Wacker M et al., 2002: N-linked glycosylation in Campylobacter jejuni and its functional transfer into E. coli. Science, 298(5599):1790-1793).

Se ha demostrado que la maquinaria de glicosilación de proteínas ligadas a N de C. jejuni se puede transferir funcionalmente a Escherichia coli (Wacker M et al., 2002: N-linked glycosylation in Campylobacter jejuni and its functional transfer into E. coli. Science, 298(5599):1790-1793). Esto ha llevado a un aumento de la actividad para explotar esta ruta para la ingeniería de glicoproteínas y ha abierto la posibilidad de diseñar mediante ingeniería estructuras de glicanos para diversos propósitos, que incluyen, pero no se limitan a, promover la investigación de proteínas glicosiladas ligadas a N y glicosilación ligada a N, y aplicaciones terapéuticas que incluyen la producción de anticuerpos y vacunas terapéuticamente útiles.

Sin embargo, la ingeniería de glicoproteína ligada a N utilizando la maquinaria de glicosilación de C. jejuni en E. coli tiene varias desventajas y limitaciones. Una de las limitaciones más importantes para la producción de glicoproteínas recombinantes es el número de sequones de glicosilación ligada a N presentes en una glicoproteína natural. Como apreciará un experto en la materia, las técnicas de biología molecular actualmente disponibles permiten la inserción de sequones de glicosilación ligada a N adicionales en proteínas glicosiladas naturalmente e incluso la inserción de sequones de glicosilación ligada a N en proteínas que normalmente no están glicosiladas. Sin embargo, la inserción de estos sitios de glicosilación ligada a N sigue un enfoque principalmente de prueba y error. Sin un conocimiento significativo de la estructura tridimensional de una proteína, algunos sitios de glicosilación ligada a N se pueden insertar en regiones de la proteína que no serán accesibles para la maquinaria de glicosilación de proteínas (Kowarik M et al., 2006: N-linked glycosylation of folded proteins by the bacterial oligosaccharyltransferase. Science, 314 (5802): 1148-1150; Kowarik M et al., 2006: Definition of the bacterial N-linked glycosylation site consensus sequence. EMBO J,

25(9):1957-1966). Más aún, la falta de información sobre la estructura tridimensional de una proteína puede evitar la inserción de sequones de glicosilación ligada a N secuencial. El sequon de glicosilación ligada a N identificado por Kowarik M et al. (2006) se identificó como la formación de un segmento dentro de una proteína, pero en el que solo se identificó un único sequon de ese tipo dentro de una proteína, o los sequones estaban ampliamente separados dentro de la proteína. Sin la información estructural de proteínas, es muy difícil introducir múltiples sequones de glicosilación ligada a N o sequones secuenciales en una proteína y asegurar la glicosilación eficiente en un anfitrión recombinante.

Adicionalmente, la ingeniería de los sequones de glicosilación ligada a N en una proteína o péptido es un proceso que consume tiempo y a menudo es costoso. Esto puede ser particularmente problemático para el desarrollo de anticuerpos y/o vacunas terapéuticas.

En consecuencia, ha surgido la necesidad de péptidos y proteínas que contengan múltiples sequones de glicosilación ligada a N, que se puedan glicosilar de manera eficiente y recombinante, mientras se evitan algunos de los problemas enumerados anteriormente. Uniprot: Q0P8I1 (base de datos UniProt 19 de septiembre de 2006), también conocida como Nucleótido Genbank: Cj1433c, y Parkhill J. et al., 2000: The genome sequence of the food-borne pathogen Campylobacter jejuni reveals hypervariable sequences. Nature, 403:665-668, divulgan una proteína hipotética de Campylobacter jejuni que comprende nueve unidades contiguas de la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 1. Ihssen J. et al., 2010: Production of glycoprotein vaccines in Escherichia coli.Microbial Cell Factories, 9:61 divulga la biosíntesis in vivo de dos candidatos de vacuna conjugados contra Shigella dysenteriae tipo 1. Dos proteínas portadoras periplásmicas diferentes, AcrA de C. jejuni y una forma toxoide de la exotoxina de Pseudomonas aeruginosa se glicosilaron con antígenos de Shigella O en E. coli.

El documento WO 2009/104074 divulga una vacuna bioconjugada que comprende un portador de proteína que comprende una secuencia de consenso D/E-X-N-Z-S/T insertada, en la que X y Z pueden ser cualquier aminoácido excepto prolina; por lo menos un polisacárido antigénico de por lo menos una bacteria, ligado al portador de proteína, en el que por lo menos un polisacárido antigénico es por lo menos un antígeno O bacteriano de una o más cepas de Shigella, E. coli o Pseudomonas aeruginosa; y, opcionalmente, un adyuvante. También se describe un método para producir un bioconjugado O1 en un biorreactor.

El documento WO 2006/119987 divulga de forma similar proteínas N-glicosiladas recombinantes que comprenden una o más secuencias de consenso introducidas como se describió anteriormente y métodos para su producción. La secuencia consenso se N-glicosila eficientemente mediante la oligosacariltransferasa (OST, OTasa) de Campylobacter spp., preferiblemente de C. jejuni.

Esta información de antecedentes se proporciona con el propósito de hacer conocida información considerada por el solicitante como de posible relevancia para la presente invención. No se pretende necesariamente, ni se debe interpretar, que cualquiera de las informaciones anteriores constituye una técnica anterior contra la presente invención.

Resumen

El objeto de la presente solicitud es proporcionar un péptido que contiene múltiples sequones de glicosilación ligada a N, y métodos de preparación y uso de los mismos. La presente invención proporciona: un péptido como se define en la reivindicación 1 adjunta a esta; una proteína quimérica como se define en la reivindicación adjunta 3; un método para producir una proteína quimérica como se define en la reivindicación adjunta 4; usos del péptido y/o proteína quimérica de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas 10 y 11; y una vacuna, un método para diagnosticar una infección bacteriana y un kit de inmunoensayo para el mismo como se define en la reivindicación adjunta 12, 13 y 15, respectivamente.

De acuerdo con un aspecto amplio, se proporciona un péptido que comprende por lo menos dos copias de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1 (este péptido se menciona aquí como un péptido “GlycoTag”), en el que las copias de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1 son contiguas o separadas por no más de 6 aminoácidos, en la que el péptido se glicosila en por lo menos una de las copias de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1. En una realización, el péptido GlycoTag comprende nueve copias de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1. El péptido GlycoTag puede comprender adicionalmente un péptido de señal que facilita la secreción periplásmica.

De acuerdo con otro aspecto amplio, se proporciona una proteína quimérica que comprende por lo menos un péptido GlycoTag y un segundo péptido o proteína. El péptido GlycoTag comprende por lo menos dos copias de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1, que son contiguas o separadas por no más de 6 aminoácidos, en los que el péptido se glicosila en por lo menos una de las copias de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1. En una realización, el segundo péptido o proteína comprende una proteína derivada de, o nativa a, un Campylobacter. En una realización, la segunda proteína es AcrA. En una realización, la segunda proteína o péptido se selecciona del grupo que consiste de una toxina, un toxoide, un anticuerpo y una proteína periplásmica. La toxina o toxoide se puede derivar del grupo seleccionado de Bordetella pertussis, Clostridium tetani, y Corynebacterium diphtheriae. En una realización, el anticuerpo seleccionado como la segunda proteína o péptido dirige una célula dendrítica.

De acuerdo con otro aspecto amplio, se proporciona un método para producir una proteína quimérica que comprende múltiples sitios de glicosilación, el método comprende las etapas de diseñar mediante ingeniería un gen quimérico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido GlycoTag ligado operablemente, directamente o a través de un polinucleótido ligador, a una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo péptido o proteína (por ejemplo, una proteína o péptido que es capaz de dirigir la proteína quimérica al espacio periplásmico), y expresar el gen quimérico resultante en un anfitrión. El anfitrión puede ser E. coli.

En una realización, el segundo péptido o proteína comprende una toxina o toxoide, un anticuerpo o una proteína periplásmica. En una realización, la toxina o toxoide se deriva de Bordetella pertussis, Clostridium tetani, o Corynebacterium diphtheriae. En una realización, la segunda proteína comprende un anticuerpo. En ese caso, la proteína quimérica puede ser para uso en una composición libre de adyuvante para uso en el tratamiento de una infección por Campylobacter. En una realización, el anticuerpo dirige una célula dendrítica. En una realización, la segunda proteína o péptido se deriva de, o es nativa a, un Campylobacter. En otra realización, la segunda proteína es AcrA.

En una realización, el método para producir una proteína quimérica comprende la etapa adicional de glicosilar el péptido o proteína quimérica con una pluralidad de glicanos ligados a N. En una realización, los glicanos ligados a N se derivan de C. jejuni.

El péptido GlycoTag descrito en este documento se puede utilizar para diferentes propósitos. En una realización, el péptido GlycoTag se puede utilizar para exhibir N-glicanos de origen eucariótico, bacteriano y/o arqueano. En otra realización, se puede utilizar para exhibir O-glicanos. En una realización, el péptido GlycoTag cuando se glicosila con glicanos específicos se puede utilizar como un portador de glicano en una vacuna que es para vacunación contra patógenos humanos zoonóticos seleccionados del grupo que consiste de Campylobacter upsaliensis en gatos y perros, Campylobacter coli en cerdos y Campylobacter jejuni en pollos. En otra realización, se puede utilizar como un portador de glicano en una vacuna que es para vacunación contra Diarrea de Viajero provocada por Campylobacter jejuni. En otra realización, se puede utilizar como un portador de glicano en una vacuna que es para vacunación de vacas y ovejas para prevenir infertilidad y abortos provocados por Campylobacter fetus venerealis y Campylobacter fetus fetus. En aún otra realización, se puede utilizar en un método diagnóstico en el que se utiliza para exhibir glicanos bacterianos y para luego determinar la presencia o ausencia, o para cuantificar, antisuero en una muestra obtenida de un sujeto que se sospecha tiene una infección bacteriana.

En otra realización, el péptido GlycoTag de la presente invención se puede utilizar como un adyuvante en la preparación de vacunas. También se puede utilizar en combinación con una segunda proteína o péptido para la preparación de una vacuna o producto farmacéutico. El segundo péptido o proteína puede comprender una proteína derivada de o nativa a un Campylobacter. En una realización, la segunda proteína es AcrA. En una realización, la segunda proteína o péptido se selecciona del grupo que consiste de una toxina, toxoide, un anticuerpo y una proteína periplásmica. La toxina o toxoide se puede derivar de Bordetella pertussis, Clostridium tetani, o Corynebacterium diphtheriae. En una realización, el anticuerpo seleccionado como la segunda proteína se dirige una célula dendrítica.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención, tanto en cuanto a su organización como a su modo de funcionamiento, se puede entender mejor por referencia a la siguiente descripción, y a los dibujos adjuntos de diversas realizaciones en las que se utilizan números similares a lo largo de las diversas vistas, y en las que:

La Figura 1 es un diagrama esquemático del proceso de glicosilación ligada a N en C. jejuni como se determina en la técnica anterior.

La Figura 2A es la salida gráfica de un análisis bioinformático de un segmento de la proteína Cj 1433c utilizando SignalP-NN. Los primeros 70 aminoácidos de la proteína 1433c se analizaron con el programa SignalP (versión 3.0) (http: //www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) para evaluar la posibilidad de que Cj 1433c sea una proteína periplásmica. El algoritmo muestra claramente la ausencia de una secuencia de péptido de señal necesaria para la secreción en el espacio periplásmico de C. jejuni, que es un requisito previo para la glicosilación de la proteína ligada a N.

La Figura 2B es la salida gráfica de un análisis bioinformático de un segmento de la proteína Cj 1433c utilizando SignalP-HMM. Los primeros 70 aminoácidos de la proteína 1433c se analizaron con el programa SignalP (versión 3.0) (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) para evaluar la posibilidad de que Cj 1433c sea una proteína periplásmica. El algoritmo muestra claramente la ausencia de una secuencia de péptidos de señal necesaria para la secreción en el espacio periplásmico de C. jejuni, que es un requisito previo para la glicosilación de la proteína ligada a N.

La Figura 3 muestra la secuencia de los primeros 150 aminoácidos de la proteína 1433c de C. jejuni (SEQ ID NO: 31). La secuencia que contiene el péptido GlycoTag (nueve repeticiones de la SEQ ID NO: 1) se ubica entre ** y **. Se subraya el sequon de N-glicosilación (DLNNT).

La Figura 4 muestra la composición de las construcciones Nos. 1, 2 y 3, donde el GlycoTag se fusionó a una construcción AcrA. Para las construcciones 1, 2 y 3, se utilizó AcrA, una N-glicoproteína de Campylobacter fetus fetus (Cff) ($AcrA^{Cff}$). El péptido GlycoTag se insertó en el terminal N en la construcción 1 (para producir la proteína de fusión GlycoTag-$AcrA^{Cff}$-His), en el terminal C en la construcción 2 (para producir la proteína de fusión $AcrA^{Cff}$-GlycoTag-His), y entre el dominio del lipoilo y del α-hairpin de la proteína AcrA en la construcción 3 (para producir la proteína de fusión N-$AcrA^{Cff}$-GlycoTag-C-$AcrA^{Cff}$-His). "ss" significa secuencia líder de pectato liasaB, mientras que "His6" significa una etiqueta de hexahistidina.

La Figura 5 representa una fotografía de un gel de SDS-PAGE que demuestra la expresión de la primera generación de proteínas de fusión GlycoTag-$AcrA^{Cff}$ producidas utilizando las construcciones descritas en la Figura 4. La secuencia líder de pectato liasaB (ss) se utilizó para dirigir la proteína al periplasma. La expresión de las proteínas de fusión en E. coli BL21 cultivadas a 28ºC fue seguida por transferencia Western (anti-His) después de SDS-PAGE al 10% de las células después de la inducción con IPTG 0.1 mM durante 18 h. Solo la construcción de fusión de terminal C (construcción 2, carril 2) dio como resultado una proteína con el tamaño esperado de 55 kDa.

La Figura 6A es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión $AcrA^{Cff}$-GlycoTag-His según la construcción 1 mostrada en la Figura 4. Las secuencias de aminoácidos líder pelB derivadas de pET22b (ss) y hexahistidina están en cursiva, los sequones de glicosilación ligada a N están en negrita y el péptido GlycoTag está subrayado.

La Figura 6B es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión GlycoTag-$AcrA^{Cff}$-His según la construcción 2 mostrada en la Figura 4. Las secuencias de aminoácidos líder pelB derivadas de pET22b (ss) y hexahistidina están en cursiva, los sequones de glicosilación ligada a N están en negrita y el péptido GlycoTag está subrayado.

La Figura 6C es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión N-$AcrA^{Cff}$-GlycoTag-C-$AcrA^{Cff}$-His de interdominio según la construcción 3 mostrada en la Figura 4. Las secuencias de aminoácidos líder pelB derivadas de pET22b (ss) y hexahistidina están en cursiva, los sequones de glicosilación ligada a N están en negrita y el péptido GlycoTag está subrayado.

La Figura 7A representa una fotografía de un electroforetograma que muestra la purificación de la proteína de fusión $AcrA^{Cff}$-GlycoTag-His soluble expresada de forma periplásmica (construcción 2) en presencia de la maquinaria pgl de C. jejuni. La cromatografía de afinidad de Ni-NTA se utilizó para purificación. El carril 1 es una muestra de lisado de células en bruto; el carril 2 es una muestra de flujo de columna; y el carril 3 es una muestra del eluido obtenido con imidazol 250 mM.

La Figura 7B representa una fotografía de una inmunotransferencia de proteínas marcadas con His producidas por transferencia Western con anticuerpos anti-His. El carril 1 es una muestra de la proteína $AcrA^{Cff}$ y el carril 2 es una muestra de la proteína de fusión $AcrA^{Cff}$-GlycoTag-His.

La Figura 7C representa una fotografía de una inmunotransferencia de proteínas etiquetadas con His producidas por transferencia Western con antisuero específico de N-glicano de C. jejuni. El carril 1 es una muestra de la proteína $AcrA^{Cff}$ y el carril 2 es una muestra de la proteína de fusión $AcrA^{Cff}$-GlycoTag-His.

La Figura 7D es una vista expandida del carril 2 de la Figura 7C, que muestra la proteína de fusión N-glicosilada con hasta 11 heptasacáridos.

La Figura 8A es un diagrama esquemático de una construcción utilizada para producir una proteína de fusión toxoide-GlycoTag en el sistema heterólogo de glicosilación de la proteína E. coli (proteína de fusión $toxC_{cd}$-GlycoTag). El GlycoTag se fusionó al terminal C de la porción terminal N (nt 79 a nt 654) del gen toxC de Corynebacterium diphtheriae NCTC 13129. "ss" significa la secuencia líder de pectato liasaB, mientras que "His6" significa una etiqueta de hexahistidina.

La Figura 8B es un diagrama esquemático de una construcción utilizada para producir una célula dendrítica que se dirige a la proteína de fusión GlycoTag de anticuerpo de cadena simple (proteína de fusión scFv-GlycoTag) en el sistema de glicosilación de proteína de E. coli heteróloga. El GlycoTag se fusionó con el terminal C de un scFv que reconoce el receptor DEC-205 en células dendríticas de ratón, "ss" significa la secuencia líder de pectato liasaB, mientras que "His6" significa una etiqueta de hexahistidina.

La Figura 8C representa una fotografía de un electroforetograma de un gel de SDS-PAGE al 10% que muestra la expresión de la proteína de fusión $toxC_{Cd}$-GlycoTag en el sistema heterólogo de glicosilación de la proteína de E. coli. La proteína de fusión se purificó utilizando cromatografía de afinidad Ni-NTA. El carril 1 es una muestra de lisado de células completas de células después de la inducción de expresión de proteínas con IPTG 0.1 mM durante 18 h; el carril 2 es una muestra de flujo a través de la cromatografía de afinidad Ni-NTA; y el carril 3 es una muestra de proteína eluida con imidazol 250 mM.

La Figura 8D representa una fotografía de un electroforetograma que muestra inmunodetección de la glicosilación de la proteína de fusión tox-C_{Cd}-GlycoTag con antisuero hR6 específico a N-glicano de Campylobacter jejuni en E. coli (pgl+), carril 1, o E. coli (pgl-), carril 2.

La Figura 8E representa una fotografía de un electroforetograma de un gel de SDS-PAGE al 10% que muestra la expresión de la proteína de fusión scFv-GlycoTag en el sistema de glicosilación de la proteína de E. coli heteróloga. La proteína de fusión se purificó utilizando cromatografía de afinidad Ni-NTA. El carril 1 es una muestra de lisado de células completas de células después de la inducción de la expresión de proteínas con IPTG 0.1 mM durante 18 h; el carril 2 es una muestra de flujo a través de la cromatografía de afinidad Ni-NTA; y el carril 3 es una muestra de proteína eluida con imidazol 250 mM.

La Figura 8F representa una fotografía de un electroforetograma que muestra inmunodetección de la glicosilación de la proteína de fusión scFv-GlycoTag con antisuero hR6 en E. coli (pgl+), carril 1, o E. coli (pgl-), carril 2.

La Figura 9A es un diagrama esquemático de una construcción utilizada para producir una proteína de fusión toxoide-$(GlycoTag)_2$ en el sistema de glicosilación de proteína de E. coli heteróloga (proteína de fusión toxC_{cd}-$(GlycoTag)_2$). Se fusionaron dos copias secuenciales del péptido GlycoTag con el terminal C de la porción de terminal N (nt 79 a nt 654) del gen toxC de Corynebacterium diphtheriae NCTC 1312. “ss” significa la secuencia líder de pectato liasaB, mientras que “His6” significa una etiqueta de hexahistidina.

La Figura 9B ilustra la detección de las proteínas de fusión toxC_{Cd}-GlycoTag y toxC_{Cd}-$(GlycoTag)_2$ expresadas y glicosiladas con el heptasacárido de C. jejuni. Una transferencia de Western con antisuero hR6 después de SDS-PAGE al 12% de proteína toxC_{Cd}-GlycoTag (carril 2) purificada por afinidad Ni-NTA (como se describió anteriormente en la Figura 8) y proteínas de fusión toxC_{Cd}-$(GlycoTag)_2$ (carril 3). La expresión de proteína en E. coli BL21 en presencia del operón de glicosilación de la proteína C. jejuni en el plásmido pACYC se indujo con IPTG 0.1 mM durante 18 h. Para mayor claridad, las señales específicas de glicoproteína individual están marcadas por una línea en el lado de la señal correspondiente. Los tamaños de los marcadores de peso molecular en kDa (carril 1) se indican a la izquierda.

La Figura 10 es un diagrama de barras que resume la respuesta de anticuerpos específicos a N-glicanos. Las placas ELISA (Maxisorb de 96 pozos Nunc) se recubrieron durante la noche con conjugado de LipidA-N-glicano monovalente (preparado de acuerdo con Manoharan R et al., 1990: UV resonance Raman spectra of bacteria, bacterial spores, protoplasts, and calcium dipicolinate. J. Microbiol. Methods 11(1): 1-15) de una cepa mutante de polimerasa O-antigénica de E. coli que expresa el grupo de genes de glicosilación de proteínas de C. jejuni (Wacker M et al., 2002: N-linked glycosylation in Campylobacter jejuni and its functional transfer into E. coli. Science, 298(5599):1790-1793)). Las placas se lavaron 3 veces con PBST (Tween 20 al 0.1% en PBS, pH 7.3) seguido de una etapa de bloqueo con leche descremada al 2% durante 3 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron una vez con PBST y se agregaron los sueros de ratón diluidos 1:50 (en PBST) y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Después, las placas se lavaron con PBST y se incubaron con anticuerpo antiratón marcado con fosfatasa alcalina (Santa Cruz, dilución 1:1000 en PBST). Después de 1 h a temperatura ambiente, las placas se lavaron 3 veces con PBST, se agregó PNPP a cada pozo, y se tomaron OD_{405} nm y OD_{570} nm (fondo) después de 30 min utilizando un lector de microplacas. Cada barra representa los valores sustraídos de fondo para el grupo de antígenos indicado; las desviaciones estándar que representan 2 repeticiones experimentales y 2 técnicas están indicadas por barras de error.

La Figura 11A es un diagrama de barras que resume la respuesta de anticuerpos específicos a N-glicano desde el día 21. Las placas de ELISA se recubrieron como se describe (Figura 10). El análisis de la respuesta inmunitaria específica a N-glicano utilizando sueros de ratón diluidos (1:100 en PBST) se realizó como se describe (en la Figura 10).

La Figura 11B es un diagrama de barras que resume la respuesta de anticuerpos específicos de N-glicano desde el día 35. Las placas de ELISA se recubrieron como se describe (Figura 10). El análisis de la respuesta inmunitaria específica a N-glicano utilizando sueros de ratón diluidos (1:100 en PBST) se realizó como se describe (en la Figura 10).

La Figura 12A representa los recuentos de colonias (cfu) obtenidos después de la colonización de pollos de 1 día de edad por Campylobacter jejuni en los grupos que se describen en la tabla 3. La barra representa el nivel medio de colonización para cada grupo.

La Figura 12B ilustra la respuesta humoral de IgG (IgY) en sueros de pollo del grupo 4 y grupo 5 después de la inmunotransferencia contra extractos de E. coli digeridos con Proteinasa K produciendo N-glicano monovalente ligado a lípido A de C. jejuni (+) o núcleo LipidA (-) que se separaron en geles de DOC al 16% y se sondearon con sueros de diferentes pollos (sangrado final, [número de pollo de grupo como se indicó]). El peso molecular de las señales específicas a N-glicano cuando se compara con el control positivo (control positivo [+ve]) sondeado con antisuero específico de N-glicano, hR6, se indican mediante una flecha. No se obtuvo señal específica de N-glicano con sueros combinados obtenidos a partir del sangrado final de pollos del grupo 1 (control negativo [-ve]).

La Figura 13 representa los recuentos de colonias (cfu) obtenidos después de la colonización de pollos de 1 día de edad por Campylobacter jejuni en los grupos que se describen en la tabla 4. La barra representa el nivel medio de colonización para cada grupo.

La Figura 14 es un diagrama esquemático de una construcción utilizada para producir una proteína de fusión de factor de proteína de unión a maltosa Xa-GlycoTag-hexahistidina en el sistema de glicosilación de proteína de E. coli heteróloga (MalE-GT-His). El GlycoTag se fusiona al terminal C de MalE que se puede purificar utilizando cromatografía de afinidad amilosa-agarosa. “Ptac” significa promotor inducible por IPTG, “MalE” significa proteína de unión a maltosa, “sitio Xa” significa secuencia de reconocimiento de proteasa del factor Xa “ss” significa secuencia líder de pectato liasa B, mientras que “His6” significa una de etiqueta de hexahistidina.

La Figura 15 ilustra la detección del péptido GlycoTag y la detección del péptido GlycoTag glicosilado con el heptasacárido de C. jejuni. Las transferencias Western con His-Tag-específico y antisuero hR6 específico a N-glicano de Campylobacter jejuni después de SDS-PAGE al 15% de GlycoTag purificado por afinidad Ni-NTA (como se describió anteriormente en la Figura 8) después de la digestión de proteína de fusión MalE-GlycoTag purificada con amilosa-agarosa con proteasa del factor Xa (carril 1, antisuero específico a His-Tag; carril 3, antisuero hR6) y GlycoTag glicosilado purificado por afinidad con Ni-NTA (como se describió anteriormente en la Figura 8) expresado en presencia de la maquinaria de glicosilación de proteína de C. jejuni después de la digestión de la proteína de fusión MalE-GlycoTag con afinidad de amilasa-agarosa con proteasa del factor Xa (carril 2, antisuero específico His-Tag, carril 4, antisuero hR6). La expresión proteica en E. coli DH5α, en presencia o ausencia del operón de glicosilación de la proteína C. jejuni sobre el plásmido pACYC se indujo con IPTG 0.1 mM durante 18 h. Para mayor claridad, las señales específicas de glicoproteínas individuales están marcadas por una línea en el lado de la señal correspondiente. Los tamaños de los marcadores de peso molecular en kDa se indican a la izquierda.

Descripción

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

Como se utiliza en la especificación y las reivindicaciones, las formas singulares “un”, “una” y “el” incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

El término “que comprende” como se utiliza en el presente documento, se entenderá que significa que la siguiente lista no es exhaustiva y puede incluir o no otros elementos adecuados adicionales, por ejemplo, una o más características adicionales, componentes y/o ingredientes según corresponda.

El término “secuencia de ácidos nucleicos” (o molécula de ácido nucleico) se refiere a una molécula de ADN o ARN en forma de cadena sencilla o doble, particularmente un ADN que codifica una proteína o fragmento de proteína de acuerdo con la invención.

Los términos “proteína” o “polipéptido” se utilizan de forma intercambiable y se refieren a moléculas que consisten en una cadena de aminoácidos, sin referencia a un modo de acción, tamaño, estructura tridimensional u origen específico. Un “fragmento” o “parte” de una proteína todavía puede denominarse “proteína”. Un “péptido”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polipéptido corto.

El término “toxoide” como se utiliza en el presente documento, se refiere a una toxina bacteriana cuya toxicidad se ha debilitado, suprimido o inactivado mediante ya sea tratamiento químico (por ejemplo, formalina) o térmico, mientras se mantienen otras propiedades, normalmente inmunogenicidad. Como se utiliza en el presente documento, el término toxoide abarca una proteína o fragmento peptídico de una toxina debilitada, suprimida o inactivada.

El término “gen” significa una secuencia de ADN que comprende una región (región transcrita), que se transcribe en una molécula de ARN (por ejemplo, un ARNm) en una célula, ligada operablemente a regiones reguladoras adecuadas (por ejemplo, un promotor). De esta manera, un gen puede comprender diversas secuencias ligadas operablemente, tales como un promotor, una secuencia líder 5' que comprende, por ejemplo, secuencias implicadas en el inicio de la traducción, una región de codificación (proteína) (ADNc o ADN genómico) y una secuencia 3' no traducida que comprende, por ejemplo, sitios de terminación de la transcripción.

Un “gen quimérico” (o gen recombinante) se refiere a cualquier gen que normalmente no se encuentra en la naturaleza en una especie, en particular un gen en el que una o más partes de la secuencia de ácidos nucleicos no están asociadas entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el promotor no está asociado en la naturaleza con parte o la totalidad de la región transcrita o con otra región reguladora. El término “gen quimérico” se entiende que incluye construcciones de expresión en las que un promotor o secuencia reguladora de la transcripción está ligada operablemente a una o más secuencias de codificación o a una secuencia antisentido (complemento inverso de la cadena sentido) o secuencia repetida invertida (sentido y antisentido, por lo que la transcripción de ARN forma ARN de doble cadena luego de transcripción).

Como se utiliza en el presente documento, el término “ligado operablemente” se refiere a un enlace de elementos polinucleotídicos en una relación funcional. Un ácido nucleico está “ligado operablemente” cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor, o más bien una secuencia reguladora de la transcripción, se liga operablemente a una secuencia de codificación si afecta la transcripción de la secuencia de codificación. Ligado operablemente significa que las secuencias de ADN que se unen son normalmente contiguas y, cuando sea necesario se unen dos regiones de codificación de proteínas, contiguas y en marco de lectura con el fin de producir una “proteína quimérica”. Una “proteína quimérica” es una proteína compuesta por varios “dominios” de proteína (o motivos) que no se encuentran como tales en la naturaleza pero que se unen para formar una proteína funcional, que muestra la funcionalidad de los dominios unidos. Una proteína quimérica también puede ser una proteína de fusión de dos o más proteínas de origen natural. El término “dominio” como se utiliza en este documento significa cualquier parte(s) o dominio(s) de la proteína con una estructura específica o función que puede transferirse a otra proteína para proporcionar una nueva proteína híbrida con por lo menos la característica funcional del dominio.

El término “péptido objetivo”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a secuencias de aminoácidos que pueden dirigir una proteína a un orgánulo o ubicación intracelular, tal como espacio periplásmico, o al espacio extracelular (péptido de señal de secreción). Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido objetivo se puede fusionar (en marco) a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el extremo terminal amino (extremo terminal N) de la proteína.

Se entiende aquí que una “construcción de ácido nucleico” o “vector” significa una molécula de ácido nucleico artificial que resulta del uso de tecnología de ADN recombinante y que se puede utilizar para suministrar ADN exógeno en una célula anfitriona. Los vectores pueden comprender otros elementos genéticos para facilitar su uso en la clonación molecular, tales como, por ejemplo, marcadores seleccionables, sitios de clonación múltiple y similares (véase a continuación).

El término “péptido GlycoTag”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a un péptido que tiene dos o más copias de un sequon de glicosilación ligada a N, derivada de la proteína citoplásmica Cj 1433c putativa, que está presente naturalmente en la cepa 11168 de C. jejuni El péptido GlycoTag puede estar en forma purificada o aislada y, opcionalmente, incluye glicanos unidos a él. El péptido GlycoTag glicosilado en por lo menos una de las copias de la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 1 se puede utilizar solo o en combinación con diferentes proteínas o péptidos y se puede incorporar a una proteína o péptido quimérico para uso, por ejemplo, en el desarrollo de sistemas de suministro de antígeno/anticuerpo, la preparación de vacunas, productos farmacéuticos y pruebas de diagnóstico, y la investigación de terapias para contrarrestar las infecciones por Campylobacter.

El péptido GlycoTag glicosilado descrito anteriormente se puede utilizar para mostrar cualquier N-glicano, que incluye aquellos de una fuente eucariótica, bacteriana y/o arqueana, o un imitador de N-glicano generado a partir de enzimas de cualquiera o de las tres fuentes. Más aún, el péptido GlycoTag glicosilado se puede utilizar para mostrar cualquier O-glicanos, donde solo se requiere treonina.

El péptido GlycoTag se deriva de la secuencia de aminoácidos de terminal N de la proteína Cj 1433c de la cepa 11168 de C. jejuni (Figura 3, SEQ ID NO: 31). Este segmento de la proteína contiene nueve repeticiones de la secuencia de aminoácidos KIDLNNT (SEQ ID NO: 1), en el que cada repetición contiene un sequon de glicosilación ligada a N (DLNNT). Los análisis bioinformáticos (Figuras 2A y 2B) han mostrado que la proteína Cj 1433c que contiene el péptido GlycoTag no se secreta en el espacio periplásmico bacteriano y, por lo tanto, carece de uno de los prerrequisitos previos para la glicosilación ligada a N bacteriana en el anfitrión nativo. Más aún, el uso del programa TMpred (“Predicción de las Regiones Transmembranales y Orientación”) (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) y el programa TMHMM para la predicción de hélices de transmembrana en proteínas (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/) no predijo la presencia de dominios de transmembrana en Cj 1433c. Por lo tanto, era inesperado que la proteína Cj 1433c contuviera una secuencia altamente susceptible a la glicosilación. Además de estos análisis bioinformáticos, un análisis de glicoproteoma completo realizado por Scott et al. (2010) no pudieron detectar la proteína Cj 1433c como glicoproteína N-ligada en C. jejuni (Scott NE et al., 2010: Simultaneous glycan-peptide characterization using hydrophilic interaction chromatography and parallel fragmentation by CID, HCD and ETD-MS applied to the N-linked glycoproteome of Campylobacter jejuni. Mol Cell Proteomics, published on April 1, 2010 as Manuscript M000031-MCP201. Sin pretender estar limitado a la teoría, es evidente para un experto en la técnica que estos análisis muestran que sería poco probable el uso exitoso del péptido GlycoTag como péptido aceptor de N-glicano. Sorprendentemente, los presentes inventores han demostrado que no es el caso. En una realización, para permitir la glicosilación ligada a N en diversos sistemas anfitriones, se puede modificar el péptido GlycoTag para incluir un péptido de señal que permite la exportación desde la célula anfitriona. En una realización, el péptido de señal permite la exportación al periplasma de células bacterianas. En una realización, el péptido GlycoTag se fusiona a una secuencia líder de pectato liasaB.

En una realización, el péptido GlycoTag comprende entre 3 y 30 repeticiones de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1.

En otra realización, el péptido GlycoTag comprende entre 3 y 30 repeticiones de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1, en la que las repeticiones se separan una de otra por hasta 6 aminoácidos.

En otra realización, el péptido GlycoTag comprende entre 3 y 30 repeticiones de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1, en la que las repeticiones son contiguas.

En otra realización, el péptido GlycoTag comprende por lo menos 9 repeticiones de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1, en la que las repeticiones se separan una de otra por hasta 6 aminoácidos.

En otra realización, el péptido GlycoTag comprende por lo menos 9 repeticiones de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1, en la que las repeticiones son contiguas.

En otra realización, el péptido GlycoTag comprende aproximadamente nueve repeticiones de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1. Las nueve repeticiones de la SEQ ID NO: 1 son contiguas. En otra realización, las nueve repeticiones de la SEQ ID NO: 1 se separan una de otra por hasta 6 aminoácidos.

Se ha determinado ahora que el péptido GlycoTag que comprende aproximadamente nueve sequones de glicosilación ligada a N establece el complemento completo, o casi completo, de las estructuras de glicano, exponiendo de esta manera efectivamente un gran número de fracciones de glicano dentro de una sola proteína o péptido. La glicosilación de un péptido GlycoTag que comprende 9 repeticiones de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1 puede generar una mezcla de péptidos glicosilados que contienen cada uno de 0-9 glicanos (como se muestra utilizando el análisis SDS-PAGE).

En un ejemplo, se pueden agregar diferentes estructuras de glicano al péptido GlycoTag. Por ejemplo, se puede lograr la glicosilación utilizando diferentes rutas de glicosilación en E. coli para agregar diferentes glicanos a los sitios de glicosilación. En un ejemplo específico, el uso de promotores inducibles asociados con cada grupo de genes (para las diferentes rutas de glicosilación) de tal manera que ninguno permite glicosilar completamente el GlycoTag.

Preparación del péptido GlycoTag

Como se apreciará fácilmente por un trabajador experto en la técnica, el péptido GlycoTag y las proteínas que comprenden un péptido GlycoTag se pueden preparar utilizando una variedad de métodos bien conocidos.

El péptido GlycoTag se puede sintetizar, en su totalidad o en parte, utilizando síntesis de péptidos en estado sólido. Alternativamente, el péptido GlycoTag se puede preparar, en todo o en parte, a partir de péptidos aislados obtenidos a partir de fuentes naturales.

El péptido GlycoTag se puede preparar mediante expresión recombinante de un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el péptido GlycoTag, en una célula anfitriona que comprende opcionalmente maquinaria de glicosilación ligada a N, utilizando técnicas conocidas en el arte. La célula anfitriona puede ser E. coli que se ha transformado para expresar la maquinaria pgl de C. jejuni (Wacker M et al., 2002: N-linked glycosylation in Campylobacter jejuni and its functional transfer into E. coli. Science, 298(5599): 1790-3). La construcción de genes y vectores quiméricos para la introducción, preferiblemente estable, del péptido GlycoTag que codifica secuencias de ácidos nucleicos en células anfitrionas es generalmente conocida en la técnica. Para generar un gen quimérico, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido GlycoTag se liga operablemente a una secuencia promotora, adecuada para la expresión en las células anfitrionas, utilizando técnicas de biología molecular estándar. La secuencia promotora ya puede estar presente en un vector de tal manera que la secuencia nucleica del péptido GlycoTag se inserta simplemente en el vector corriente abajo de la secuencia promotora. El vector se utiliza a continuación para transformar las células anfitrionas y el gen quimérico se inserta en el genoma nuclear o en un plásmido y se expresa allí utilizando un promotor adecuado. En una realización, un gen quimérico comprende un promotor adecuado para la expresión en células microbianas (por ejemplo, bacterias), ligadas operablemente a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido GlycoTag o proteína de fusión como se describe en el presente documento.

En una realización, el péptido GlycoTag se fusiona a una etiqueta de afinidad para facilitar la purificación por cromatografía de afinidad. En una realización, la etiqueta de afinidad se fusiona con el terminal N del péptido GlycoTag. En una realización, la etiqueta de afinidad se fusiona con el terminal C del péptido GlycoTag. Por supuesto, como apreciará un experto en la técnica, se puede utilizar una amplia variedad de etiquetas de afinidad diferentes, dependiendo del tipo de purificación de afinidad contemplada. Los ejemplos específicos de etiquetas de afinidad que se pueden utilizar para ayudar en la purificación del péptido GlycoTag incluyen, pero no se limitan a, etiquetas de epítopo, etiquetas de cromatografía y, más específicamente, una etiqueta de hexahistidina (a veces denominada His-tag)

Métodos y sistemas para utilizar el péptido GlycoTag

El péptido GlycoTag se puede utilizar en una amplia variedad de aplicaciones diferentes. El péptido GlycoTag se puede utilizar como adyuvante en la preparación de vacunas. Por supuesto, como apreciará un experto en la técnica, el péptido GlycoTag se puede diseñar por ingeniería para transportar diferentes N-glicanos dependiendo de la aplicación prevista.

En una realización, el péptido GlycoTag, cuando se glicosila con glicanos específicos, se puede utilizar como un portador de glicano en una vacuna que es para la vacunación contra patógenos humanos zoonóticos tales como Campylobacter upsaliensis (en gatos y perros), Campylobacter coli (en cerdos) y Campylobacter jejuni (en pollos). Como otro ejemplo, que tampoco pretende ser limitante, el péptido GlycoTag glicosilado con glicanos específicos se puede utilizar en una vacuna para vacunar a los humanos contra la diarrea del viajero (Campylobacter jejuni) y vacunar vacas y ovejas para prevenir infertilidad y abortos (Campylobacter fetus venerealis y el Campylobacter fetus fetus).

En una realización, el péptido GlycoTag se puede coexpresar recombinantemente con una proteína aceptora, un péptido o un anticuerpo utilizando técnicas conocidas en el arte. Las proteínas, péptidos y anticuerpos aceptores incluyen, pero no se limitan a, toxinas, toxoides, proteínas periplásmicas, anticuerpos y anticuerpos dirigidos a células dendríticas. En una realización, la proteína es AcrA. En una realización, la toxina se puede seleccionar entre las toxinas expresadas por Bordetella pertussis, Clostridium tetani o Corynebacterium diphtheria. Por supuesto, son posibles muchos otros ejemplos. Esto puede ser particularmente ventajoso, ya que la coexpresión del péptido GlycoTag con una proteína, péptido o anticuerpo aceptor puede servir como base para la preparación de un rango de productos útiles, que incluyen vacunas contra Cambylobacter u otras bacterias y vacunas que tienen una eficacia mejorada. En un ejemplo, que no se pretende sea limitante, el péptido GlycoTag, cuando se glicosila con glicanos específicos y se coexpresa con otras proteínas y péptidos, se puede utilizar como portador de glicano en una vacuna que es para la vacunación contra patógenos humanos zoonóticos tales como Campylobacter upsaliensis (en gatos y perros), Campylobacter coli (en cerdos) y Campylobacter jejuni (en pollos). Como otro ejemplo, que tampoco pretende ser limitante, la coexpresión del péptido GlycoTag glicosilado con glicanos específicos con otras proteínas y péptidos se puede utilizar para preparar vacunas contra la diarrea del viajero (Campylobacter jejuni) y contra Campylobacter fetus venerealis y Campylobacter fetus fetus.

En una realización de la presente invención, el GlycoTag glicosilado se puede fusionar con una proteína aceptora, un péptido o un anticuerpo con el fin de dirigir o orientar la fusión al periplasma de E. coli o de otro organismo de expresión. La multivalencia del GlycoTag tiene la ventaja de unir varias estructuras de glicano en múltiples copias a una proteína o portador de péptido en alta densidad sin tener que manipular por ingeniería secuencias aceptoras de N-glicano adicionales en las proteínas objetivo. Esto puede ser particularmente ventajoso ya que puede permitir la expresión recombinante de proteínas y péptidos que pueden mostrar múltiples estructuras de N-glicano. Como apreciará un experto en la técnica, una amplia variedad de péptidos portadores y proteínas son adecuados para la fusión con GlycoTag. Estos incluyen, pero no se limitan a, toxinas, toxoides, proteínas periplásmicas, anticuerpos y anticuerpos dirigidos a células dendríticas. En una realización, la proteína es AcrA. En una realización, la toxina se puede seleccionar entre las toxinas expresadas por Bordetella pertussis, Clostridium tetani o Corynebacterium diphtheria. Por supuesto, muchos otros ejemplos son posibles. Esto puede ser particularmente ventajoso, ya que la GlycoTag glicosilada fusionada a una proteína transportadora puede servir como base para un rango de productos útiles, que incluyen vacunas contra Cambylobacter y vacunas que tienen una eficacia mejorada. El péptido GlycoTag puede incluso utilizarse en composiciones libres de adyuvante. En un ejemplo, que no pretende ser limitante, el GlycoTag, cuando se glicosila con glicanos específicos, se puede utilizar como un portador de glicano en una vacuna que es para la vacunación contra patógenos humanos zoonóticos tales como Campylobacter upsaliensis (en gatos y perros), Campylobacter coli (en cerdos) y Campylobacter jejuni (en pollos). Como otro ejemplo, que tampoco pretende ser limitante, GlycoTag glicosilado con glicanos específicos se puede utilizar en una vacuna para vacunar a los humanos contra la diarrea del viajero (Campylobacter jejuni) y vacunar vacas y ovejas para prevenir la infertilidad y los abortos (Campylobacter fetus venerealis y Campylobacter fetus fetus). Como se apreciará fácilmente, el péptido GlycoTag se puede utilizar en la preparación de una vacuna para cualquier epítopo de carbohidrato inmunógeno de patógeno. En otro ejemplo no limitante, se puede utilizar un péptido GlycoTag glicosilado adecuadamente en la fabricación de una vacuna contra el patógeno oral, C. rectus.

Como apreciará un experto en la técnica, existen muchas formas diferentes en que el GlycoTag se puede fusionar a una proteína o péptido. El péptido GlycoTag se puede fusionar directamente o a través de un ligador a una proteína capaz de dirigirse al periplasma de un organismo de vector de expresión seleccionado tal como E. coli que, en presencia de genes que codifican maquinaria de glicosilación de proteínas, da como resultado N-glicosilación de los sitios respectivos sobre el GlycoTag.

En una realización, se prepara un péptido o proteína de fusión de GlycoTag, o proteína quimérica, a partir de la expresión de un gen quimérico que incluye una secuencia de codificación para el péptido GlycoTag ligado operablemente a una secuencia de codificación para un segundo péptido o proteína. De acuerdo con lo anterior, también se proporciona un vector que comprende dicho gen quimérico y secuencias apropiadas para la expresión del gen quimérico en un organismo anfitrión.

En una realización, una fusión entre el péptido GlycoTag y una proteína puede incluir una etiqueta de afinidad para facilitar la purificación por cromatografía de afinidad. Por supuesto, como apreciará un experto en la técnica, se puede utilizar una amplia variedad de etiquetas de afinidad diferentes, dependiendo del tipo de purificación de afinidad contemplada. Más aún, dependiendo de la naturaleza del producto de fusión, la etiqueta de afinidad se puede colocar en el terminal N o en el terminal C.

En una realización, el péptido GlycoTag se puede modificar para unir cualquier sacárido ligado a lípidos expresado en presencia de la proteína de fusión de GlycoTag.

En otra realización, el péptido GlycoTag glicosilado se utiliza en un método o sistema de ensayo de diagnóstico. En un ejemplo de esta realización, el péptido GlycoTag se modifica por ingeniería para mostrar glicanos específicos característicos de una bacteria infecciosa. El péptido GlycoTag se puede utilizar entonces en un ensayo inmunológico para detectar, y opcionalmente cuantificar, anticuerpos dirigidos a las bacterias infecciosas. En el método inmunológico, el péptido GlycoTag glicosilado se pone en contacto con una muestra biológica de un sujeto sospechoso de infección bacteriana y la mezcla se incuba para permitir que se formen complejos de unión entre el péptido GlycoTag y los anticuerpos presentes en la muestra que son específicos para los glicanos mostrados. Los complejos de unión se detectan luego utilizando métodos estándar, y opcionalmente se cuantifican. Como apreciará un trabajador experto en la técnica, el ensayo puede realizarse utilizando una variedad de técnicas bien conocidas para ensayos inmunológicos. En una realización, el péptido GlycoTag glicosilado se inmoviliza sobre un soporte sólido antes del contacto con la muestra biológica. El soporte sólido puede ser, por ejemplo, placas de microtitulación, perlas de polímero, perlas de agarosa, perlas paramagnéticas o membranas.

De acuerdo con otro aspecto, se proporciona un kit de inmunoensayo que comprende péptidos GlycoTag glicosilados como se describió anteriormente y reactivos para la detección de complejos de unión formados con los péptidos GlycoTag glicosilados y anticuerpos específicos para antígenos bacterianos que corresponden con los componentes antigénicos de los péptidos GlycoTag glicosilados. El kit de inmunoensayo incluye adicionalmente instrucciones de uso y puede incluir adicionalmente un recipiente u otros medios para recoger una muestra de un sujeto del que se sospecha tiene una infección bacteriana.

Con el fin de que la invención se comprenda más completamente, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son solo para propósitos ilustrativos y no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención de ninguna manera. Más aún, estos ejemplos no pretenden excluir equivalentes y variaciones dentro del alcance de la presente invención, que sean evidentes para un experto en la técnica.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de proteínas de fusión GlycoTag/AcrA

La glicoproteína AcrA de Campylobacter fetus fetus ($AcrA^{Cff}$), que posee naturalmente dos sequones de N-glicosilación, se utilizó como el portador de proteína. Se construyó un plásmido para expresar el gen AcrA de C. fetus fetus en BL21 de E. coli utilizando la secuencia líder de pectato liasaB (pelB) sobre el plásmido pET22b (Novagen) para dirigir la proteína al espacio periplásmico a través de la ruta secretora (Sec). Por lo tanto, los cebadores $AcrA^{Cff}$-NcoI (5'-ATGGCCATGGA-TAATAAAAAATCAGCC-3'[SEQ ID NO: 3]) y $AcrA^{Cff}$-XhoI (5'-TTTCTCGAGTTTGCTTCCTTTGGCATCATTTATCG-3' [SEQ ID NO: 4]) se utilizaron para amplificar los nucleótidos 67 a 1052 del gen AcrA del ADN cromosómico de C. fetus fetus 82-20, mientras que simultáneamente se introducen sitios de restricción (subrayados) para NcoI y XhoI. El producto de PCR se insertó en el plásmido pET22b, que se había digerido con las mismas enzimas de restricción. La proteína AcrA es una proteína periplasmática en el anfitrión nativo y también es un objetivo para la glicosilación ligada a N cuando se expresa en BL21 de E. coli en presencia del operón de glicosilación de la proteína C. jejuni (después de la inducción con IPTG 0.1 mM, Figura 7C, carril 1).

La secuencia de péptidos GlycoTag se preparó como sigue: La secuencia de ADN que codifica el terminal N de la proteína Cj1433c [SEQ ID NO: 2], que es **CTCGAGTT**CATAAAAAATTTCAAGCAACATGAAAAAATTAAGATAGATCTTAATAATACAAAGATAGATCTTAATAATA
CAAAGATAGATCTTAATAATA
CAAAGATAGATCTTAATAATACAAAGATAGATCTTAATAATACAAAGATAGATCTTAAT
AATACAAAGATAGATCTTAATAATACAAAGATAGATCTTAATAATACAAAGATAGAATTATCGCAATTAAAAAAAGAGC
TCGAG (los sitios de restricción para XhoI se muestran en negrita), se generó mediante PCR con oligonucleótidos específicos de genes (1433c-XhoI-1: 5'-AAA**CTC-GAGTT**CATAAAAAATTTCAAGC-3'[SEQ ID NO: 5] y 1433c-XhoI-2: 5'-ATAT**CTCGAG**CTCTTTTTTTAATTGCG-3' [SEQ ID NO : 6]) a partir del ADN cromosómico de la cepa 11168 de Campylobacter jejuni secuenciada de genoma (Parkhill J et al., 2000: The genome sequence of the food-borne pathogen Campylobacter jejuni reveals hyper-variable sequences. Nature, 403(6770):665-668). Los fragmentos de ADN digeridos se fusionaron en marco con el terminal N (construcción 1, Figura 4 [SEQ ID NO: 7]), con el terminal C (construcción 2, Figura 4 [SEQ ID NO: 8]) y entre los dominios lipoil y α-hairpin (como se describe en Symmons M et al., 2009: The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump. PNAS, 106(17): 6893-6894) de la proteína AcrA de C. fetus fetus ($AcrA^{Cff}$) en la posición del nucleótido 457 de la secuencia de codificación de AcrACff (construcción 3, Figura 4 [SEQ ID NO: 9]). Para la construcción 1, el producto de PCR descrito anteriormente se introdujo a través del sitio NcoI. Para la construcción 2, el producto de PCR descrito anteriormente se introdujo a través del sitio XhoI. Para la construcción 3, el producto de PCR descrito anteriormente se introdujo a través del sitio NheI. La inserción correcta de los productos de PCR en los sitios respectivos se verificó por secuenciación de ADN. Las proteínas de fusión (construcciones 1, 2 y 3) se expresaron en un sistema de expresión BL21 de E. coli de la siguiente manera. A una DO_{600} de 0.6 (después del crecimiento a 37°C), los cultivos se indujeron con IPTG 0.1 mM y las células se cultivaron durante 18 h adicionales a la misma temperatura. Los cultivos se enfriaron en hielo durante 15 min y las

células se recogieron por centrifugación (10 min, 10.000 rpm, 4ºC), se lavaron dos veces en un volumen de cultivo de tampón de PBS helado y finalmente se resuspendieron en 1/20 del volumen de cultivo original. Las células se rompieron mediante sonicación (pulsos 3 veces por 1 minuto) y se centrifugaron durante 30 minutos a 15.000 rpm a 4ºC). Las proteínas etiquetadas con His se purificaron a partir de los sobrenadantes utilizando The QiaExpressionist (Qiagen). Los análisis de proteínas purificadas por cromatografía de afinidad con Ni-NTA se siguieron por SDS-PAGE y análisis de transferencia Western con anticuerpos monoclonales específicos contra la etiqueta Hexa-histidina (Santa Cruz Biotech Inc.). La transferencia Western específica a etiqueta Hexahistidina mostró que solo la construcción 2 daba como resultado la sobreexpresión de una proteína con el tamaño correcto de aproximadamente 55 kDa (Figura 5, carril 2). La secuencia de aminoácidos deducida de las proteínas de fusión $AcrA^{Cff}$-GlycoTag-His N (construcción 1), C (construcción 2) e interdominios (construcción 3) se muestran en la Figura 6A, 6B y 6C, respectivamente.

Ejemplo 2: Expresión de la construcción 2 de GlycoTag/AcrA en BL21 de E. coli (pgl+)

Expresión en E. coli BL21 en presencia de la maquinaria de glicosilación de C. jejuni localizada sobre el plásmido pACYC184 (pACYC (pgl-Cj)) (Wacker M et al., 2002: N-linked glycosylation in Campylobacter jejuni and its functional transfer into E. coli. Science, 298(5599): 1790-1793) dio como resultado la expresión periplásmica soluble de la proteína de fusión AcrA-GlycoTag-His de terminal C. La proteína de fusión se purificó por cromatografía de afinidad con Ni-NTA y se examinó por transferencia de Western con anticuerpos monoclonales específicos contra la etiqueta de Hexahistidina (Santa Cruz Biotechnology Inc.) y antisuero específico de N-glicano de C. jejuni (hR6). La Figura 7B y 7C muestran las transferencias Western con hR6 y anti-Hexahistidina (anti-His). Se produce una mezcla de ocupación del sitio, ya que observamos proteínas de fusión con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 N-glicanos unidos. Como se muestra en la Figura 7D, pudimos detectar una glicoproteína quimérica con 11 heptasacáridos de C. jejuni unidos (2 sitios naturales de $AcrA^{Cff}$, 9 sitios de péptido GlycoTag). Este resultado fue imprevisto porque se propuso previamente que una conformación proteica específica mejoraría la eficacia de la glicosilación, mientras que, en el ejemplo actual, los sequones de glicosilación ligada a N (DLNNT) se separaron solo por dos aminoácidos (KI) en el péptido GlycoTag.

Ejemplo 3: Preparación de proteínas de fusión GlycoTag/toxoide

La secuencia GlycoTag de la SEQ ID NO: 10, preparada como se describe en el Ejemplo 1, se fusionó al terminal N y al terminal C de los productos del gen toxoide inmunoestimulante de Bordetella pertussis (ptxA, terminal N, nt 1-537), Clostridium tetani (tet, terminal C, nt 2566-3945) y Corynebacterium diphtheriae NCTC 13129 (tox_{Cd}, nt 79-654) (Figura 8A). Los productos de PCR se generaron con los siguientes oligonucleótidos específicos del gen de toxoide, mientras que se introdujeron sitios de restricción (NcoI, XhoI):

ptxA-NcoI-1	5’ AATATATACCATGGGTTGCACTCGGGCAATTCG-3 [SEQ ID NO: 11]
ptxA-XhoI-2	5’-ATATATCTCGAGCGTTACCCTGCGGATGTTTTCGG-3’ [SEQ ID NO: 12]
tet-NcoI-1	5’- TATATGGCCATGGCAACACCAATTCCATTTTCTTA TTCTAAAAATCTGG-3 [SEQ ID NO: 13]
tet-XhoI-2	5’- TTAAACTCGAGATCATTTGTCCATCCTTCATCTGTAGG TACAAAGTACC-3’ [SEQ ID NO: 14]
tox-NcoI-1	5’-ATATATATCCATGGCTGCTGATGATGTTGTTGATTC-3’ [SEQ ID NO: 15]
tox-XhoI-2	5’-ATATACTCGAGTCGCCTGACACGATTTCCTGCACAGG-3’ [SEQ ID NO: 16]

Un plásmido descrito por Aminian et al. (2007) sirvió como plantilla para la reacción de PCR (Aminian et al., 2007: Expression and purification of a trivalent pertussis toxin-diphtheria toxin-tetanus toxin fusion protein in Escherichia coli. Protein Expr Purif, 51(2): 170-178). Los productos de PCR obtenidos se introdujeron en el plásmido que expresa las proteínas de fusión GlycoTag $AcrA^{Cff}$-His de terminal N o terminal C. Por lo tanto, el sitio de restricción XhoI más cercano a la secuencia que codifica Hexa-histidina y el sitio NcoI más cercano a la secuencia que codifica el péptido líder pelB se eliminaron mediante mutagénesis de cambio rápido utilizando el kit de mutagénesis QuikChange® (Stratagene) con los siguientes oligonucleótidos:

QC-XhoI-Del-1	5’- GCAATTAAAAAAAGAGATCGAGCACCACCACCACCACCAC TGAG-3’ [SEQ ID NO: 17]
QC-XhoI-Del-2	5’-CTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCGATCTCTTTTTTTAATTGC-3’ [SEQ ID NO: 18]
QC-NcoI-Del-1	5’- GCTGCCCAGCCGGCGATGGCGATGGTTATCATAAAAAATTTC AAG-3’ [SEQ ID NO: 19]

QC-NcoI-Del-1	5'- CTTGAAATTTTTTATGATAACCATCGCCATCGCCGGCTGGG CAGC-3' [SEQ ID NO: 20]

Los plásmidos que codifican cualquiera de las proteínas de fusión $AcrA^{Cff}$-GlycoTag-His de terminal N o $AcrA^{Cff}$-GlycoTag-His de terminal C sirvieron como plantillas.

Posteriormente, la secuencia de codificación de la proteína $AcrA^{Cff}$ se intercambió por los genes de la toxina amplificada por PCR (como se describió anteriormente) y se insertaron a través de NcoI-XhoI para crear las construcciones de fusión de GlycoTag-toxina etiquetada con Hexa-histidina de terminal N o C.

La expresión de la proteína de fusión, la secreción en el espacio periplásmico de E. coli y la N-glicosilación se analizaron como se describió anteriormente. La expresión, la purificación de la etiqueta de afinidad (véase anteriormente) y la glicosilación en el sistema de glicosilación de la proteína de E. coli heteróloga (véase anteriormente) se podrían demostrar para la construcción pelB-$toxC_{Cd}$-GlycoTag-HexaHistidina de terminal C (Figuras 8C y 8D). De nuevo, se produce una mezcla de ocupación del sitio, ya que se observaron proteínas de fusión con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 N-glicanos unidos (Figuras 8C y 8D). Curiosamente, parece que el péptido transportador de N-glicano induce la formación de dímeros en la fusión aumentando la valencia de la construcción.

Ejemplo 4: Preparación de dos péptidos GlycoTag fusionados a una proteína toxoide.

Se unió un segundo péptido GlycoTag de la SEQ ID NO: 10 a la proteína de fusión $ToxC_{Cd}$ preparada en el Ejemplo 3 para crear una proteína de fusión $ToxC_{Cd}$-$(GlycoTag)_2$ (Figura 9A). Por lo tanto, se insertó un fragmento de ADN purificado en gel de 258 pb obtenido después de la digestión con XhoI del plásmido que codifica la proteína de fusión pelB-$AcrA^{Cff}$-GlycoTag-His de terminal C en el plásmido que codifica la proteína de fusión pelB-ToxCcd-GlycoTag-His de terminal C digerida con XhoI. La orientación de la segunda secuencia de ADN de codificación de Glyco-Tag se verificó por secuenciación de ADN con la hibridación del oligonucleótido en la secuencia de ADN del plásmido que codifica Hexa-histidina. La expresión y glicosilación con el N-glicano de C. jejuni (en presencia del plásmido que codifica la maquinaria de glicosilación de la proteína C. jejuni) y la cromatografía de afinidad con Ni-NTA se realizó como se describió anteriormente. Los análisis por transferencia Western con antisuero específico de N-glicano (hR6) dieron como resultado una proteína con hasta 18 N-glicanos de C. jejuni unidos (Figura 9B). Sin embargo, se produce una mezcla de ocupación del sitio, ya que observamos proteínas de fusión con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18. N-glicanos unidos.

Ejemplo 5: Preparación de proteínas de fusión de GlycoTag/anticuerpos

La secuencia que codifica el péptido GlycoTag de la SEQ ID NO: 10, preparada como se describe en el Ejemplo 1, se fusionó en el terminal C y terminal N de un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) que reconoce el receptor DEC-205 de células dendríticas (DC) y que se puede expresar en BL21 de E. coli (Figura 8B) como se describió anteriormente (Wang WW et al.: 2009: A versatile bifunctional dendritic cell targeting vaccine vector. Mol Pharm, 6(1): 158-172). Por lo tanto, se generó un producto de PCR con oligonucleótidos específicos (Ab-1433-XhoI, 5'-ATATCTCGAGGCGGCCGCAAGCTGAGGAGACTGTGACCATGACTCC-3' [SEQ ID NO: 21], pET-PstI 5'-AATTCTGCAGTAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGG-3' [SEQ ID NO: 22] junto con el plásmido pWET7; Ab-1433-NcoI, 5'-ATATATATCCATGGGAGGTGGCGGATCAGAAGTGAAGC-3' [SEQ ID NO: 23] y pET-KpnI ATATGGTACCTTAGCAGCCGGATCTCAGTGG-3' [SEQ ID NO: 24] junto con el plásmido pWET5) que amplifican el gen scFv-DEC205 del plásmido pWET7 (para crear la fusión scFvDEC205-GlycoTag de terminal C) y del plásmido pWET5 (para crear la fusión scFvDEC205-GlycoTag de terminal N) (Wang WW et al., 2009: A versatile bifunctional dendritic cell targeting vaccine vector. Mol Pharm, 6(1): 158-172). Se aplicó una estrategia similar a aquella descrita anteriormente para la creación de las proteínas de fusión toxoide-GlycoTag para intercambiar la secuencia de ADN que codifica $AcrA^{Cff}$ con la secuencia de ADN que codifica scFvDEC205. Podríamos expresar (como se describió anteriormente), la purificación por afinidad-etiqueta (como se describió anteriormente), y la glicosilación de la construcción pelB-scFvDEC205-GlycoTag-HexaHistidina de terminal C en el sistema de glicosilación de proteína de E. coli heteróloga (Figuras 8E y 8F). De nuevo, se produce una mezcla de ocupación del sitio, ya que observamos proteínas de fusión con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 N-glicanos unidos.

El propósito de dirigir el péptido GlycoTag N-glicosilado directamente a las células dendríticas (DC) es reducir la cantidad de antígeno requerida y también eliminar el requerimiento de coadyuvante para la estimulación inmunitaria. Las DC son las células presentadoras de antígenos del sistema inmunitario que desempeñan una función crítica en las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, especialmente en la sensibilización y activación de la inmunidad de las células T y las células B.

Ejemplo 6: Inmunización de ratones con proteínas de fusión GlycoTag

Seis grupos cada uno con cinco hembras C57BL/6 se inmunizaron con proteínas de fusión GlycoTag purificadas tal como se establece en la Tabla 1.

Tabla 1

Grupo	Material de inmunización	Día 0	Día 12	Día 21
1	Control	PBS	PBS	Suero (Humoral)
2	DEC205-GlycoTag y Anti-CD40 mAb glicosilados	1 µg 25 µg	1 µg 0	Suero (Humoral)
3	Acr^{Cff}-GlycoTag y Anti-CD40 mAb glicosilados	1 µg 25 µg	1 µg	Suero (Humoral)
4	$ToxC_{Cd}$-GlycoTag y Anti-CD40 mAb glicosilados	1 µg 25 µg	1 µg 0	Suero (Humoral)
5	Acr^{Cff} y Anti-CD40 mAb glicosilados	1 µg 25 µg	1 µg 0	Suero (Humoral)
6	$AcrA^{Cff}$ y Anti-CD40 mAb no glicosilados	1 µg 25 µg	1 µg 0	Suero (Humoral)

La respuesta humoral (anticuerpo) seguida en suero sanguíneo de ratón (aislado utilizando el procedimiento estándar) de los grupos 1 a 6 mostró que los anticuerpos específicos a N-glicano se produjeron en los grupos 2, 3, 4 y 5 en el orden 2> 4> 3> 5. No se observó respuesta humoral contra el N-glicano en los grupos 1 y 6 (Figura 10).

Ejemplo 7: Inmunización de ratones con GlycoTag purificado

Se inmunizaron siete grupos, cada uno con cinco ratones hembras C57BL/6, con GlycoTag purificado o proteínas de fusión de GlycoTag purificado como se establece en la Tabla 2.

Tabla 2

	Material de inmunización	Día 0 Freund's completo	Día 12 Freund's incompleto	Día 21	Día 28 Freund's incompleto	Día 35
Gr 1	control	PBS	PBS	Suero (Humoral)	PBS	Suero (Humoral)
Gr 2	GlycoTag no glicosilado	1 µg	1 µg	Suero (Humoral)	1 µg	Suero (Humoral)
Gr 3	GlycoTag glicosilado	2 µg = 1 µg (azúcar)	2 µg = 1 µg (azúcar)	Suero (Humoral)	2 µg = 1 µg (azúcar)	Suero (Humoral)
Gr 4	$ToxC_{Cd}$-GlycoTag no glicosilado	30 µg	30 µg	Suero (Humoral)	30 µg	Suero (Humoral)
Gr 5	$ToxC_{Cd}$-GlycoTag-(app. 3-9 glicanos de Cj) glicosilado	7 µg = 1 µg (azúcar)	7 µg = 1 µg (azúcar)	Suero (Humoral)	7 µg = 1 µg (azúcar)	Suero (Humoral)
Gr 6	$ToxC_{Cd}$-$(GlycoTag)_2$ no glicosilado	3.5 µg	3.5 µg	Suero (Humoral)	3.5 µg	Suero (Humoral)
Gr 7	$ToxC_{Cd}$-$(GlycoTag)_2$ glicosilado (aproximadamente 5-18 glicanos de Cj)	3.5 µg = 1 (azúcar) µg	3.5 µg = 1 µg (azúcar)	Suero (Humoral)	3.5 mg = 1 mg (azúcar)	Suero (Humoral)

La respuesta humoral (anticuerpo) seguida en suero sanguíneo de ratón (aislado utilizando el procedimiento estándar) de los grupos 1 a 6 del día 21 (Figura 11A) y del día 35 (Figura 11B) mostró que se produjeron anticuerpos específicos contra N-glicano en los grupos 3, 5 y 7 en el orden 3> 5 = 7. No se observó una respuesta humoral significativa contra el N-glicano en los grupos 1, 2, 4 y 6.

Curiosamente, estos resultados demuestran que el uso de GlycoTag solo indujo una respuesta de anticuerpos más fuerte que cuando se conjugó con un toxoide.

Ejemplo 8: Inmunización de pollo con proteínas de fusión de GlycoTag.

Se inmunizaron ocho grupos, cada uno con ocho pollos con proteínas de fusión GlycoTag purificadas de la siguiente manera: el día 0, hisopos cecales del 10% de todas las aves (5 aves se seleccionaron al azar) no mostraron colonización con Campylobacter cuando se colocaron en placas de agar Karamali selectivas después de un período de incubación de 2 días bajo condiciones microaeróbicas. El día 7, se tomó un presangrado de 500 µl de cada pollo seguido del primer tratamiento antimicrobiano con 5 µg de antígeno en un volumen total de 300 µl para cada ave (Tabla 3) que se administró por vía intramuscular (IM) al inyectar 2 veces 150 µl en diferentes sitios (utilizando el adyuvante completo de Freund en una relación de 1:1 con el antígeno que se preparó en PBS estéril) o por administración oral (O). En el día 21, se llevó a cabo una prueba de sangrado seguida del segundo tratamiento antimicrobiano con la misma formulación de antígeno pero reemplazando el adyuvante completo de Freund con adyuvante incompleto de Freund. En el día 28, los pollos dentro de los grupos 2-8 se sometieron a alimentación forzada (inoculada) de Campylobacter jejuni (células 1.5x10*8 preparadas en PBS estéril). En el día 35, se sacrificaron los pollos, se tomaron muestras de sangre de cada ave (sangrado final) y se determinaron los niveles de colonización al analizar la cantidad de células de Campylobacter en el ciego de cada pollo mediante placas de diluciones en serie de 10 veces (10*-2 a 10*-10) del contenido cecal en placas de agar selectivas de Karmali. Después de un período de incubación de 2 días bajo condiciones microaeróbicas, se registró la formación de colonias de Campylobacter (Figura 12A). Se obtuvieron niveles reducidos de colonización de Campylobacter jejuni después de la vacunación con ToxC-GT1, 1-9 C. jejuni (Cj) -glicanos (IM) y microencapsulado (MC) ToxC-GT1, 1-9Cj-glicanos (O). La respuesta humoral (anticuerpo) seguida en sueros

sanguíneos (aislada mediante procedimientos estándar) mostró que los anticuerpos específicos de N-glicano se produjeron en pollos de los grupos 4 y 5. No se observó respuesta humoral contra el N-glicano en sueros combinados de pollo del grupo 1 (Figura 12B)

Tabla 3

	Tratamiento antimicrobiano (5 µg de antígeno)	Inoculación con Campylobacter (1.5x10*8 cfu)
Grupo 1	PBS	no
Grupo 2	PBS	si
Grupo 3	ToxC-GT1 (sin glicano) (IM)	si
Grupo 4	ToxC-GT1, 1-9Cj-glicanos (IM)	si
Grupo 5	ToxC-GT1 microencapsulado (MC) , aproximadamente 1-9 Cj-glicanos (O)	si
Grupo 6	ToxC-2GlycoTags, aproximadamente 5-18 Cj glicanos (IM)	si
Grupo 7	ToxC-GT1, aproximadamente 1-9 Cj-glicanos (O)	si
Grupo 8	Microcápsulas, sin proteína (O)	si

Se prepararon antígenos microencapsulados (MC) utilizando nanopartículas basadas en quitosano (CS) mediante complejación de polielectrolito de CS cargado positivamente con el polianión tripolifosfato (TPP) como se describe (Makhlof A., Tozuka Y., and Takeuchi H., 2011: Design and evaluation of novel pH-sensitive chitosan nanoparticles for oral insulin delivery, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 42(5), 445-451).

Ejemplo 9: Inmunización dependiente de dosis de pollo con proteína de fusión de GlycoTag.

Se inmunizaron ocho grupos cada uno con ocho pollos con la ToxC-GT1 de fusión de GlycoTag purificada que porta 1-9Cj-glicanos mediante inyección intramuscular de la siguiente manera: se inmunizaron 8 grupos cada uno con 8 pollos con proteínas de fusión GlycoTag purificadas como se describe en (Tabla 4) El día 0, hisopos cecales del 10% de todas las aves (5 aves se seleccionaron al azar) no mostraron colonización con Campylobacter cuando se sembraron en placas de agar Karamali después de un período de incubación de 2 días bajo condiciones microaeróbicas. El día 7, se tomó un presangrado de 500 µl de cada pollo seguido del primer tratamiento antimicrobiano del antígeno en un volumen total de 300 µl por cada ave que se administró por vía intramuscular (IM) al inyectar 2 veces 150 µl en diferentes sitios (utilizando el adyuvante completo de Freund en una relación 1:1 con el antígeno preparado en PBS estéril). En el día 21, se realizó una prueba de sangrado seguida del segundo tratamiento antimicrobiano con la misma formulación de antígeno, pero reemplazando el adyuvante completo de Freund con adyuvante incompleto de Freund. En el día 28, los pollos dentro de los grupos 2 a 8 se sometieron a alimentación forzada (inoculada) con células de tipo silvestre de Campylobacter jejuni (10*2 o 10*6). En el día 35, se sacrificaron los pollos, se tomaron muestras de sangre de cada ave (sangrado final) y se determinaron los niveles de colonización al analizar la cantidad de células de Campylobacter en el ciego de cada pollo al colocar en placas diluciones en serie de 10 veces (10*-2 a 10*-10) del contenido cecal en placas de agar selectivas de Karmali. Después de un período de incubación de 2 días bajo condiciones microaeróbicas, se registró la formación de colonias de Campylobacter (Figura 13).

Tabla 4

	Tratamiento antimicrobiano	Cantidad de antígeno (µg)	Inoculación con células de *Campylobacter jejuni* (cfu)
Grupo 1	PBS	-	-
Grupo 2	PBS	-	10*2
Grupo 3	PBS	-	10*6
Grupo 4	ToxC-GT1, 1-9 Cj-glicanos (IM)	5	10*2
Grupo 5	ToxC-GT1, 1-9 Cj-glicanos (IM)	100	10*2
Grupo 6	ToxC-GT1, 1-9 Cj-glicanos (IM)	5	10*6
Grupo 7	ToxC-GT1, 1-9 Cj-glicanos (IM)	100	10*6
Grupo 8	ToxC-GT1 (sin glicano) (IM)	100	10*6

Se obtuvieron niveles de colonización reducidos de Campylobacter después de la vacunación con ToxC-GT1, 1-9Cj-glicanos (IM) en una forma dependiente de dosis de inoculación con Campylobacter).

Ejemplo 10: Preparación de la proteína de fusión purificada MalE-GlycoTag

Se amplificó un fragmento de PCR que contenía el ADN que codifica el péptido GlycoTag (SEQ ID NO: 10) con los oligonucleótidos CS492 (5'-AAAATAAATATAGGACAACCGGTTCAGG -3' [SEQ ID NO: 25]) y CS 491 (5'-TATCTCGAGTCACTCTTTTTTTAATTGCG-3' [SEQ ID NO: 26]) utilizando el plásmido AcrA^{Cff}-GlycoTag-His como plantilla, con el sitio XhoI eliminado utilizando el Kit de mutagénesis de cambio rápido (Stratagene). El producto de PCR se digirió con XhoI y se ligó con el plásmido p2x digerido con SalI (New England Biotech). La orientación correcta de la inserción se confirmó mediante la secuencia de los productos con CS491.

La transcripción de la proteína de fusión MalE-GlycoTag del promotor ptac inducible por IPTG localizado sobre el plásmido pMAL-p2X (New England Biolabs) en E. coli da como resultado la expresión periplásmica de una proteína de fusión MalE-GlycoTag (SEQ ID NO: 27).

Después de la sobreexpresión en E. coli, la proteína de fusión MalE-GlycoTag se puede purificar utilizando una combinación de i) cromatografía de afinidad de amilosa; ii) división proteolítica de la proteína de fusión MalE-GlycoTag (por ejemplo, con factor Xa); y/o iii) cromatografía de exclusión por tamaño. En todos los casos, el péptido GlycoTag se obtiene en forma pura.

Ejemplo 11: Preparación de GlycoTag utilizando una proteína de fusión MalE-GlycoTag-His

Se amplificó un fragmento de PCR que contenía el ADN que codifica el péptido GlycoTag (SEQ ID NO: 10) con los oligonucleótidos CS492 (5'-AAAATAAATATAGGACAACCGGTTCAGG -3' [SEQ ID NO: 28]) y CS 494 (5'-AATTTAAGCTTTGTTAGCAGCCGGATCTCAGTGG-3' [SEQ ID NO: 29]) utilizando el plásmido AcrACff-GT-His- (XhoI eliminado por mutagénesis de cambio rápido) como plantilla. El producto de PCR se digirió con XhoI y HindIII y se ligó con el plásmido pMAL-p2X digerido con SalI-HindIII.

La transcripción de la proteína de fusión MalE-GlycoTag-His del promotor ptac inducible por IPTG localizado sobre el plásmido pMAL-p2x en E. coli da como resultado la expresión periplásmica de una proteína de fusión MalE-GlycoTag-His (SEQ ID NO: 30, Figura 14)

Después de la sobreexpresión en E. coli en presencia o ausencia del operón de glicosilación de Campylobacter jejuni, la proteína de fusión MalE-GlycoTag se puede purificar utilizando una combinación de i) cromatografía de afinidad de amilosa; ii) división proteolítica de la proteína de fusión MalE-GlycoTag (por ejemplo, con factor Xa, Figura 15); y/o iii) cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de afinidad con Ni-NTA o electroelución después de la separación en un gel. En todos los casos, el péptido GlycoTag se obtiene en forma pura.

Ejemplo 12: GlycoTag como vacuna

El péptido GlycoTag se puede utilizar como un péptido portador de oligosacáridos en estudios de inmunogenicidad frente al oligosacárido unido. El GlycoTag glicosilado se puede fusionar a una proteína inmunoestimulante (toxina) que eliminará la necesidad de un adyuvante adicional. El péptido GlycoTag glicosilado se puede administrar en combinación con el adyuvante preferido/estandarizado para diversas especies/aplicaciones. Si es necesario, se puede obtener el péptido GlycoTag puramente glicosilado después de la digestión química o proteolítica de múltiplos de GlycoTag glicosilado que está presente como una mezcla de péptido GlycoTag con ninguno o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 azúcares unidos (como se ve en la Figura 7D).

La glicosilación del péptido GlycoTag proporciona protección contra la división química o proteolítica. El oligosacárido que está unido a las repeticiones de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) evita la división por la proteasa tripsina. Esto se ha confirmado al observar que se dividió el péptido GlycoTag no glicosilado o incompletamente glicosilado, mientras que la porción glicosilada del péptido GlycoTag permaneció intacta, después de exposición a proteasa (resultados no mostrados).

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente mencionadas en esta Especificación son indicativas del nivel de experticia de los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención.

La invención que se describe de este modo, será obvia ya que la misma puede variar de muchas maneras. Todas las modificaciones que serían obvias para un experto en la técnica se pretenden incluir dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Szymanski, Christine
Nothaft, Harald

<120> PÉPTIDO QUE CONTIENE MÚLTIPLES SEQUONES DE GLICOSILACIÓN LIGADA A N
<130> PPCT21583
<150> US 61/379,896
<151> 2010-09-03
<160> 31
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 7
<212> PRT
<213> Campylobacter jejuni
<400> 1

Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr
1 5

<210> 2
<211> 264
<212> ADN
<213> Campylobacter jejuni
<400> 2

ctcgagttca taaaaaattt caagcaacat gaaaaaatta agatagatct taataataca 60
aagatagatc ttaataatac aaagatagat cttaataata caaagataga tcttaataat 120
acaaagatag atcttaataa tacaaagata gatcttaata atacaaagat agatcttaat 180
aatacaaaga tagatcttaa taatacaaag atagatctta ataatacaaa gatagaatta 240
tcgcaattaa aaaaagagct cgag 264

<210> 3
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 3

atggccatgg ataataaaaa atcagcc 27

<210> 4
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 4

tttctcgagt ttgcttcctt tggcatcatt tatcg 35

<210> 5
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 5

aaactcgagt tcataaaaaa tttcaagc
28

<210> 6
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 6

atatctcgag ctctttttt aattgcg
27

<210> 7
<211> 468
<212> PRT
<213> Camplyobacter fetus fetus/Campylobacter jejuni
<400> 7

```
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1               5                  10                  15
Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Asp Asn Lys Lys Ser Ala Ala Gln Gln
            20                  25                  30
Gln Ile Pro Pro Met Pro Val Thr Val Met Gln Ala Lys Met Gly Asp
        35                  40                  45
Ile Pro Ile Val Leu Ser Phe Asn Gly Gln Thr Val Ser Asp Met Asp
    50                  55                  60
Val Val Leu Lys Ala Lys Val Ala Gly Thr Ile Glu Lys Gln Phe Phe
65                  70                  75                  80
Lys Ala Gly Ala Ser Val Lys Glu Gly Asp Lys Leu Tyr Gln Ile Asp
                85                  90                  95
Glu Ala Lys Tyr Arg Ala Ala Tyr Asp Ser Ala Phe Ala Asn Leu Gln
            100                 105                 110
Val Ser Gln Ala Asn Leu Lys Asn Ala Glu Ser Asp Phe Asp Arg Ala
        115                 120                 125
Lys Lys Leu Gln Glu Lys Ser Ala Ile Ser Gln Lys Glu Tyr Asp Ala
    130                 135                 140
Ala Leu Ala Ala Tyr Glu Ser Ala Lys Ala Ser Val Leu Ala Ser Lys
145                 150                 155                 160
Ala Asn Val Gln Thr Ala Lys Ile Asp Leu Asp Tyr Ser Thr Val Thr
                165                 170                 175
Ala Pro Phe Ser Gly Val Leu Gly Asp Thr Leu Lys Asp Val Gly Ser
            180                 185                 190
Tyr Val Ser Ser Ser Asp Ala Asp Leu Val Arg Leu Thr Lys Leu Asn
        195                 200                 205
Pro Ile Phe Val Lys Phe Gly Ile Ser Asp Val Asp Lys Leu Asn Ile
    210                 215                 220
Ala Gln Lys Thr Arg Thr Lys Glu Trp Glu Gln Leu Asn Ser Leu Val
225                 230                 235                 240
Thr Leu Ser Met Gln Asn Gly Asp Tyr Asn Gly Thr Leu Thr Phe Ile
                245                 250                 255
Asp Asn Val Ile Asp Glu Gly Ser Gly Thr Val Asn Ala Lys Ala Met
            260                 265                 270
Phe Glu Asn Asn Ser Thr Gln Ile Arg Pro Gly Ile Phe Ala Ser Val
        275                 280                 285
Asn Val Tyr Gly Phe Tyr Gln Lys Asn Gly Phe Lys Ile Pro Gln Val
    290                 295                 300
Ala Ile Leu Gln Asp Leu Ala Ser Pro Phe Val Tyr Thr Leu Lys Asp
305                 310                 315                 320
Gly Lys Val Ala Lys Asn Pro Ile Lys Ile Val Ser Gln Asp Ser Thr
                325                 330                 335

Ser Ala Val Ile Ser Ser Gly Ile Asn Asp Gly Asp Leu Ile Ile Met
            340                 345                 350
Asp Asn Phe Lys Lys Ile Asn Ile Gly Gln Pro Val Gln Ala Ile Asn
        355                 360                 365
Asp Ala Lys Gly Ser Lys Leu Glu Phe Ile Lys Asn Phe Lys Gln His
    370                 375                 380
Glu Lys Ile Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn
385                 390                 395                 400
Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys
                405                 410                 415
Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp
            420                 425                 430
Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn
        435                 440                 445
Asn Thr Lys Ile Glu Leu Ser Gln Leu Lys Lys Glu Leu Glu His His
    450                 455                 460
His His His His
465
```

<210> 8
<211> 469
<212> PRT
<213> Camplyobacter fetus fetus/Campylobacter jejuni
<400> 8

```
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1               5                  10                  15
Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Val Ile Ile Lys Asn Phe Lys Gln His
            20                  25                  30
Glu Lys Ile Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn
        35                  40                  45
Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys
    50                  55                  60
Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp
65                  70                  75                  80
Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn
                85                  90                  95
Asn Thr Lys Ile Glu Leu Ser Gln Leu Lys Lys Glu Pro Met Asp Asn
            100                 105                 110
Lys Lys Ser Ala Ala Gln Gln Gln Ile Pro Pro Met Pro Val Thr Val
        115                 120                 125
Met Gln Ala Lys Met Gly Asp Ile Pro Ile Val Leu Ser Phe Asn Gly
    130                 135                 140
Gln Thr Val Ser Asp Met Asp Val Val Leu Lys Ala Lys Val Ala Gly
145                 150                 155                 160
Thr Ile Glu Lys Gln Phe Phe Lys Ala Gly Ala Ser Val Lys Glu Gly
                165                 170                 175
Asp Lys Leu Tyr Gln Ile Asp Glu Ala Lys Tyr Arg Ala Ala Tyr Asp
            180                 185                 190
Ser Ala Phe Ala Asn Leu Gln Val Ser Gln Ala Asn Leu Lys Asn Ala
        195                 200                 205
Glu Ser Asp Phe Asp Arg Ala Lys Lys Leu Gln Glu Lys Ser Ala Ile
    210                 215                 220
Ser Gln Lys Glu Tyr Asp Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Glu Ser Ala Lys
225                 230                 235                 240
Ala Ser Val Leu Ala Ser Lys Ala Asn Val Gln Thr Ala Lys Ile Asp
                245                 250                 255
Leu Asp Tyr Ser Thr Val Thr Ala Pro Phe Ser Gly Val Leu Gly Asp
            260                 265                 270
Thr Leu Lys Asp Val Gly Ser Tyr Val Ser Ser Ser Asp Ala Asp Leu
        275                 280                 285
Val Arg Leu Thr Lys Leu Asn Pro Ile Phe Val Lys Phe Gly Ile Ser
```

```
    290                 295                 300
Asp Val Asp Lys Leu Asn Ile Ala Gln Lys Thr Arg Thr Lys Glu Trp
305                 310                 315                 320
Glu Gln Leu Asn Ser Leu Val Thr Leu Ser Met Gln Asn Gly Asp Tyr
                325                 330                 335
Asn Gly Thr Leu Thr Phe Ile Asp Asn Val Ile Asp Glu Gly Ser Gly
            340                 345                 350
Thr Val Asn Ala Lys Ala Met Phe Glu Asn Asn Ser Thr Gln Ile Arg
        355                 360                 365
Pro Gly Ile Phe Ala Ser Val Asn Val Tyr Gly Phe Tyr Gln Lys Asn
    370                 375                 380
Gly Phe Lys Ile Pro Gln Val Ala Ile Leu Gln Asp Leu Ala Ser Pro
385                 390                 395                 400
Phe Val Tyr Thr Leu Lys Asp Gly Lys Val Ala Lys Asn Pro Ile Lys
                405                 410                 415
Ile Val Ser Gln Asp Ser Thr Ser Ala Val Ile Ser Ser Gly Ile Asn
            420                 425                 430
Asp Gly Asp Leu Ile Ile Met Asp Asn Phe Lys Lys Ile Asn Ile Gly
        435                 440                 445
Gln Pro Val Gln Ala Ile Asn Asp Ala Lys Gly Ser Lys Leu Glu His
    450                 455                 460
His His His His His
465
```

<210> 9
<211> 467
<212> PRT
<213> Camplyobacter fetus fetus/Campylobacter jejuni
<400> 9

```
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1               5                  10                  15
Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Asp Asn Lys Lys Ser Ala Ala Gln Gln
            20                  25                  30
Gln Ile Pro Pro Met Pro Val Thr Val Met Gln Ala Lys Met Gly Asp
        35                  40                  45
Ile Pro Ile Val Leu Ser Phe Asn Gly Thr Val Ser Asp Met Asp Val
    50                  55                  60
Val Leu Lys Ala Lys Val Ala Gly Thr Ile Glu Lys Gln Phe Phe Lys
65                  70                  75                  80
Ala Gly Ala Ser Val Lys Glu Gly Asp Lys Leu Tyr Gln Ile Asp Glu
                85                  90                  95
Ala Lys Tyr Arg Ala Ala Tyr Asp Ser Ala Phe Ala Asn Leu Gln Val
            100                 105                 110
Ser Gln Ala Asn Leu Lys Asn Ala Glu Ser Asp Phe Asp Arg Ala Lys
        115                 120                 125
Lys Leu Gln Glu Lys Ser Ala Ile Ser Gln Lys Glu Tyr Asp Ala Ala
    130                 135                 140
Leu Ala Ala Tyr Glu Ser Ala Lys Ala Ser Phe Ile Lys Asn Phe Lys
145                 150                 155                 160
Gln His Glu Lys Ile Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu
                165                 170                 175
Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn
            180                 185                 190
Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys
        195                 200                 205
Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp
    210                 215                 220
Leu Asn Asn Thr Lys Ile Glu Leu Ser Gln Leu Lys Lys Glu Ala Ser
225                 230                 235                 240
Val Leu Ala Ser Lys Ala Asn Val Gln Thr Ala Lys Ile Asp Leu Asp
                245                 250                 255
```

```
Tyr Ser Thr Val Thr Ala Pro Phe Ser Gly Val Leu Gly Asp Thr Leu
            260                 265                 270
Lys Asp Val Gly Ser Tyr Val Ser Ser Ser Asp Ala Asp Leu Val Arg
        275                 280                 285
Leu Thr Lys Leu Asn Pro Ile Phe Val Lys Phe Gly Ile Ser Asp Val
    290                 295                 300
Asp Lys Leu Asn Ile Ala Gln Lys Thr Arg Thr Lys Glu Trp Glu Gln
305                 310                 315                 320
Leu Asn Ser Leu Val Thr Leu Ser Met Gln Asn Gly Asp Tyr Asn Gly
                325                 330                 335
Thr Leu Thr Phe Ile Asp Asn Val Ile Asp Glu Gly Ser Gly Thr Val
            340                 345                 350
Asn Ala Lys Ala Met Phe Glu Asn Asn Ser Thr Gln Ile Arg Pro Gly
        355                 360                 365
Ile Phe Ala Ser Val Asn Val Tyr Gly Phe Tyr Gln Lys Asn Gly Phe
    370                 375                 380
Lys Ile Pro Gln Val Ala Ile Leu Gln Asp Leu Ala Ser Pro Phe Val
385                 390                 395                 400
Tyr Thr Leu Lys Asp Gly Lys Val Ala Lys Asn Pro Ile Lys Ile Val
                405                 410                 415
Ser Gln Asp Ser Thr Ser Ala Val Ile Ser Ser Gly Ile Asn Asp Gly
            420                 425                 430
Asp Leu Ile Ile Met Asp Asn Phe Lys Lys Ile Asn Ile Gly Gln Pro
        435                 440                 445
Val Gln Ala Ile Asn Asp Ala Lys Gly Ser Lys Leu Glu His His His
    450                 455                 460
His His His
465
```

<210> 10
<211> 63
<212> PRT
<213> Campylobacter jejuni
<400> 10

```
Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile
1               5                   10                  15
Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu
            20                  25                  30
Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn
        35                  40                  45
Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr
    50                  55                  60
```

<210> 11
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 11

```
aatatatacc atgggttgca ctcgggcaat tcg
33
```

<210> 12

<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 12

atatatctcg agcgttaccc tgcggatgtt ttcgg
35

<210> 13
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 13

tatatggcca tggcaacacc aattccattt tcttattcta aaaatctgg
49

<210> 14
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 14

ttaaactcga gatcatttgt ccatccttca tctgtaggta caaagtacc
49

<210> 15
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 15

atatatatcc atggctgctg atgatgttgt tgattc
36

<210> 16
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 16

atatactcga gtcgcctgac acgatttcct gcacagg
37

<210> 17
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 17

gcaattaaaa aaagagatcg agcaccacca ccaccaccac tgag
44

<210> 18
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 18

ctcagtggtg gtggtggtgg tgctcgatct ctttttttaa ttgc
44

<210> 19
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 19

gctgcccagc cggcgatggc gatggttatc ataaaaaatt tcaag
45

<210> 20
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 20

cttgaaattt tttatgataa ccatcgccat cgccggctgg gcagc
45

<210> 21
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 21

atatctcgag gcggccgcaa gctgaggaga ctgtgaccat gactcc
46

<210> 22
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 22

aattctgcag taattttgtt taactttaag aagg
34

<210> 23
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador
<400> 23

atatatatcc atgggaggtg gcggatcaga agtgaagc
38

<210> 24
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 24

atatggtacc ttagcagccg gatctcagtg g
31

<210> 25
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 25

aaaataaata taggacaacc ggttcagg
28

<210> 26
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 26

tatctcgagt cactcttttt ttaattgcg
29

<210> 27
<211> 506
<212> PRT
<213> Campylobacter jejuni/Mus musculus
<400> 27

```
Met Lys Ile Lys Thr Gly Ala Arg Ile Leu Ala Leu Ser Ala Leu Thr
1               5                  10                  15
Thr Met Met Phe Ser Ala Ser Ala Leu Ala Lys Ile Glu Glu Gly Lys
            20                  25                  30
Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu
        35                  40                  45
Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr Gly Ile Lys Val Thr Val Glu
    50                  55                  60
His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly
65                  70                  75                  80
Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr
                85                  90                  95
Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln
            100                 105                 110
Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys
        115                 120                 125
Leu Ile Ala Tyr Pro Ile Ala Val Glu Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Asn
    130                 135                 140
Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro Pro Lys Thr Trp Glu Glu Ile Pro Ala
145                 150                 155                 160
Leu Asp Lys Glu Leu Lys Ala Lys Gly Lys Ser Ala Leu Met Phe Asn
                165                 170                 175
Leu Gln Glu Pro Tyr Phe Thr Trp Pro Leu Ile Ala Ala Asp Gly Gly
            180                 185                 190
Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn Gly Lys Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly
        195                 200                 205
Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys Ala Gly Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu
    210                 215                 220
Ile Lys Asn Lys His Met Asn Ala Asp Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu
225                 230                 235                 240
Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu Thr Ala Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp
                245                 250                 255
Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys Val Asn Tyr Gly Val Thr Val
```

```
                260                 265                 270
Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln Pro Ser Lys Pro Phe Val Gly Val Leu
        275                 280                 285
Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu
    290                 295                 300
Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn
305                 310                 315                 320
Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala Leu Lys Ser Tyr Glu Glu Glu
                325                 330                 335
Leu Ala Lys Asp Pro Arg Ile Ala Ala Thr Met Glu Asn Ala Gln Lys
            340                 345                 350
Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln Met Ser Ala Phe Trp Tyr Ala
        355                 360                 365
Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp
    370                 375                 380
Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr Asn Ser Ser Ser Asn Asn Asn Asn
385                 390                 395                 400
Asn Asn Asn Asn Asn Asn Leu Gly Ile Glu Gly Arg Ile Ser Glu Phe
                405                 410                 415
Gly Ser Ser Arg Val Glu Phe Ile Lys Asn Phe Lys Gln His Glu Lys
            420                 425                 430
Ile Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys
        435                 440                 445
Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp
    450                 455                 460
Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn
465                 470                 475                 480
Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr
                485                 490                 495
Lys Ile Glu Leu Ser Gln Leu Lys Lys Glu
            500                 505
```

<210> 28
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 28

```
aaaataaata taggacaacc ggttcagg
28
```

<210> 29
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 29

```
aatttaagct ttgttagcag ccggatctca gtgg
34
```

<210> 30
<211> 514
<212> PRT

<213> Campylobacter jejuni/Mus musculus
<400> 30

```
Met Lys Ile Lys Thr Gly Ala Arg Ile Leu Ala Leu Ser Ala Leu Thr
1               5                  10                  15
Thr Met Met Phe Ser Ala Ser Ala Leu Ala Lys Ile Glu Glu Gly Lys
            20                  25                  30
```

```
Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu
        35                  40                  45
Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr Gly Ile Lys Val Thr Val Glu
    50                  55                  60
His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly
65                  70                  75                  80
Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr
                85                  90                  95
Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln
            100                 105                 110
Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys
        115                 120                 125
Leu Ile Ala Tyr Pro Ile Ala Val Glu Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Asn
    130                 135                 140
Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro Pro Lys Thr Trp Glu Glu Ile Pro Ala
145                 150                 155                 160
Leu Asp Lys Glu Leu Lys Ala Lys Gly Lys Ser Ala Leu Met Phe Asn
                165                 170                 175
Leu Gln Glu Pro Tyr Phe Thr Trp Pro Leu Ile Ala Ala Asp Gly Gly
            180                 185                 190
Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn Gly Lys Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly
        195                 200                 205
Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys Ala Gly Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu
    210                 215                 220
Ile Lys Asn Lys His Met Asn Ala Asp Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu
225                 230                 235                 240
Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu Thr Ala Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp
                245                 250                 255
Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys Val Asn Tyr Gly Val Thr Val
            260                 265                 270
Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln Pro Ser Lys Pro Phe Val Gly Val Leu
        275                 280                 285
Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu
    290                 295                 300
Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn
305                 310                 315                 320
Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala Leu Lys Ser Tyr Glu Glu Glu
                325                 330                 335
Leu Ala Lys Asp Pro Arg Ile Ala Ala Thr Met Glu Asn Ala Gln Lys
            340                 345                 350
Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln Met Ser Ala Phe Trp Tyr Ala
        355                 360                 365
Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp
    370                 375                 380
Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr Asn Ser Ser Ser Asn Asn Asn Asn
385                 390                 395                 400
Asn Asn Asn Asn Asn Asn Leu Gly Ile Glu Gly Arg Ile Ser Glu Phe
                405                 410                 415
Gly Ser Ser Arg Val Glu Phe Ile Lys Asn Phe Lys Gln His Glu Lys
            420                 425                 430
Ile Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys
        435                 440                 445
Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp
    450                 455                 460
Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn
465                 470                 475                 480
Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr
                485                 490                 495
Lys Ile Glu Leu Ser Gln Leu Lys Lys Glu Ile Glu His His His His
            500                 505                 510
His His
```

<210> 31

<211> 150
<212> PRT
<213> Campylobacter jejuni
<400> 31

```
Met Gln Arg Phe Lys Lys Trp Phe Leu Ser Ile Ile Lys Asn Phe Lys
1               5                  10                  15
Gln His Glu Lys Ile Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu
            20                  25                  30
Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn
        35                  40                  45
Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys
    50                  55                  60
Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp Leu Asn Asn Thr Lys Ile Asp
65                  70                  75                  80
Leu Asn Asn Thr Lys Ile Glu Leu Ser Gln Leu Lys Lys Glu His Tyr
                85                  90                  95
Lys Val Leu Asp Phe His Leu Arg Lys Ile Thr Pro Gln Ala Phe Leu
            100                 105                 110
Glu Ile Val Glu Ile His Leu Ala Glu Ser Cys Asn Leu Asn Cys Phe
        115                 120                 125
Gly Cys Asn His Phe Ser Gln Ile Ala Glu Lys Glu Phe Pro Asp Ile
    130                 135                 140
Glu Ile Phe Lys Lys Asp
145                 150
```

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que comprende por lo menos dos repeticiones, preferiblemente nueve repeticiones, de la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 1, en el que las repeticiones de la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 1 son contiguas o separadas por no más de 6 aminoácidos, en el que el péptido se glicosila en por lo menos una de las repeticiones de la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 1.

2. El péptido de la reivindicación 1, en el que el péptido comprende adicionalmente un péptido de señal que permite la secreción periplásmica.

3. Una proteína quimérica que comprende por lo menos un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y un segundo péptido o una proteína, en la que el segundo péptido o proteína preferiblemente comprende un péptido o proteína derivada de, o nativa para, un Campylobacter, o es AcrA, una toxina, toxoide, un anticuerpo o una proteína periplásmica.

4. Un método para producir una proteína quimérica que comprende múltiples sitios de glicosilación, que comprende:

diseñar por ingeniería un gen quimérico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido que comprende por lo menos dos repeticiones, preferiblemente nueve repeticiones, de la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 1, en la que las repeticiones de la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 1 son contiguas o separadas por no más de 6 aminoácidos, en la que el péptido puede comprender adicionalmente un péptido de señal que permite secreción periplásmica, dicha secuencia de ácidos nucleicos se liga operablemente, directamente o a través de un polinucleótido ligador, a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un segundo péptido o una proteína, cuyo segundo péptido o proteína es preferiblemente AcrA, una toxina, un toxoide, un anticuerpo o una proteína periplásmica; y
expresar el gen quimérico en un anfitrión.

5. El método de la reivindicación 4, en el que la segunda proteína comprende un anticuerpo.

6. El método de la reivindicación 4, en el que la segunda proteína o péptido se deriva de, o es nativo para, un Campylobacter.

7. La proteína quimérica de la reivindicación 3 o el método de la reivindicación 4, en el que la toxina o toxoide se deriva de Bordetella pertussis, Clostridium tetani, o Corynebacterium diphtheriae y en la que el anticuerpo dirige una célula dendrítica.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en el que el anfitrión es E. coli.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 4-8, que comprende adicionalmente glicosilar la proteína quimérica con una pluralidad de glicanos ligados a N, en el que los glicanos ligados a N se derivan preferiblemente de C. jejuni.

10. Uso del péptido definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para exhibir N-glicanos de origen eucariótico, bacteriano y/o arqueano.

11. Uso del péptido definido en la reivindicación 1 o la proteína quimérica definida en la reivindicación 3 como un portador de glicano, por ejemplo, en una vacuna, opcionalmente en combinación con una segunda proteína o péptido, o la proteína quimérica definida en la reivindicación 3 para la preparación de una vacuna o producto farmacéutico.

12. Una vacuna que comprende un péptido como se define en la reivindicación 1 o una proteína quimérica como se define en la reivindicación 3, en la que la vacuna es para:

vacunación contra un patógeno humano zoonótico, tal como Campylobacter upsaliensis en gatos y perros, Campylobacter coli en cerdos o Campylobacter jejuni en pollos; Diarrea de Viajero provocada por Campylobacter jejuni; o Campylobacter rectus; o
vacunación de vacas u ovejas para prevenir infertilidad y abortos provocados por Campylobacter fetus venerealis o Campylobacter fetus fetus.

13. Un método para diagnosticar una infección bacteriana en un sujeto que comprende:

(i) poner en contacto una muestra que se ha obtenido del sujeto con péptidos como se define en la reivindicación 1, en la que los glicanos son representativos de glicanos presentes sobre antígenos bacterianos; y

(ii) detectar complejos de unión formados mediante la unión de los péptidos como se define en la reivindicación 1 mediante los anticuerpos específicos para antígenos bacterianos, en los que la presencia de complejos de unión es indicativa de infección bacteriana en el sujeto,

y en el que los antígenos bacterianos son preferiblemente de Bordetella pertussis; Clostridium tetani; Corynebacterium diphtheriae; un patógeno humano zoonótico, tal como Campylobacter upsaliensis, Campylobacter coli o Campylobacter jejuni; Campylobacter rectus; Campylobacter fetus venerealis o Campylobacter fetus fetus.

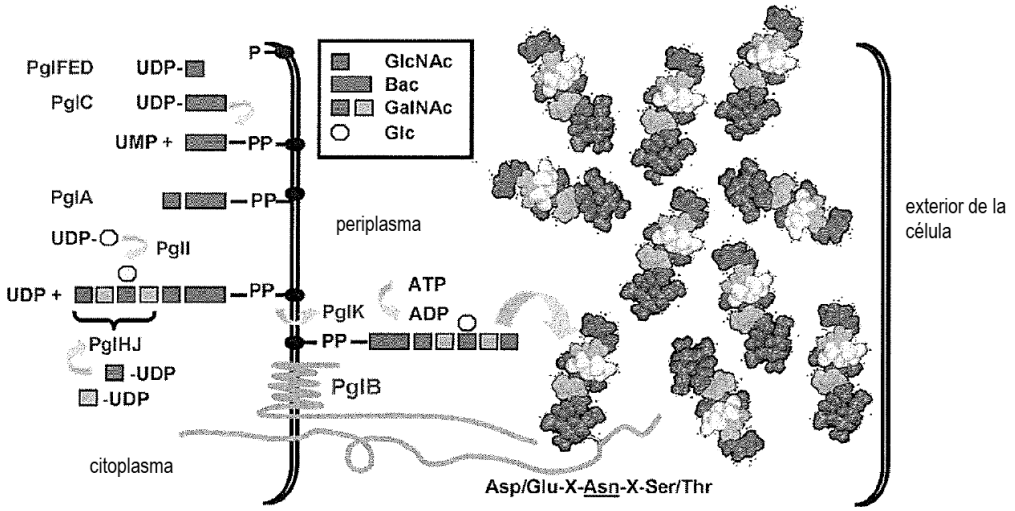
14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que los péptidos como se define en la reivindicación 1 se inmovilizan sobre un soporte sólido, en el que el soporte sólido preferiblemente es la superficie de una placa de microtitulación, perlas de polímero, perlas de agarosa, perlas paramagnéticas, o membranas.

15. Un kit de inmunoensayo para diagnosticar una infección bacteriana en un sujeto, el kit que comprende:

(a) una mezcla de uno o más péptidos como se define en la reivindicación 1, en la que cada péptido comprende por lo menos un glicano que es un antígeno bacteriano; y

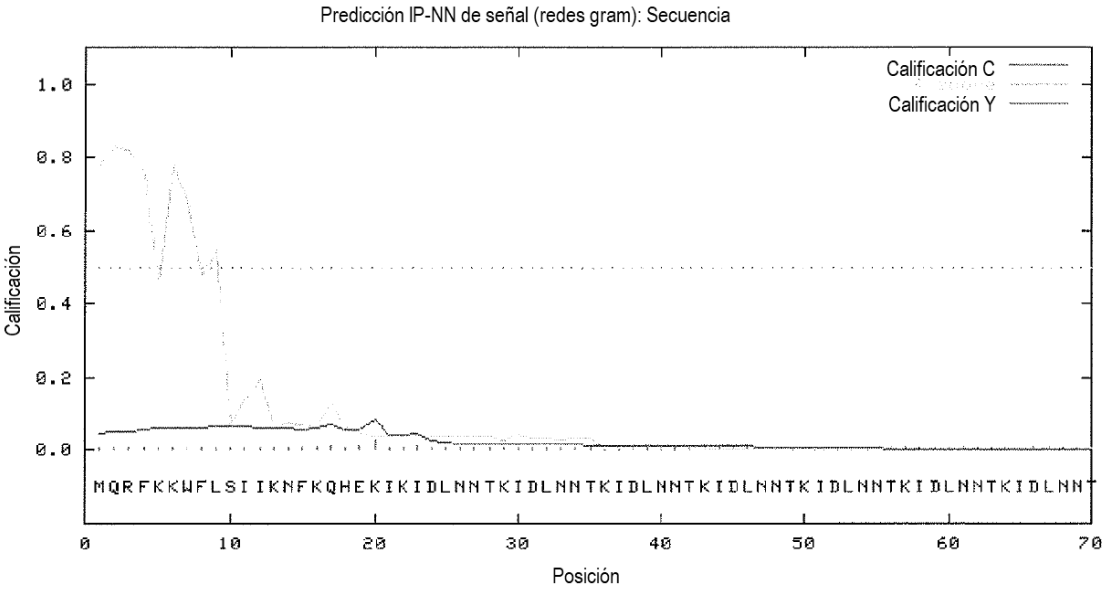
(b) instrucciones para poner en contacto dicha mezcla con una muestra biológica del sujeto y monitorizar la formación de complejos de unión formados mediante la unión de los péptidos como se define en la reivindicación 1 mediante anticuerpos en la muestra que son específicos para antígenos bacterianos.

FIGURA 1



TÉCNICA ANTERIOR

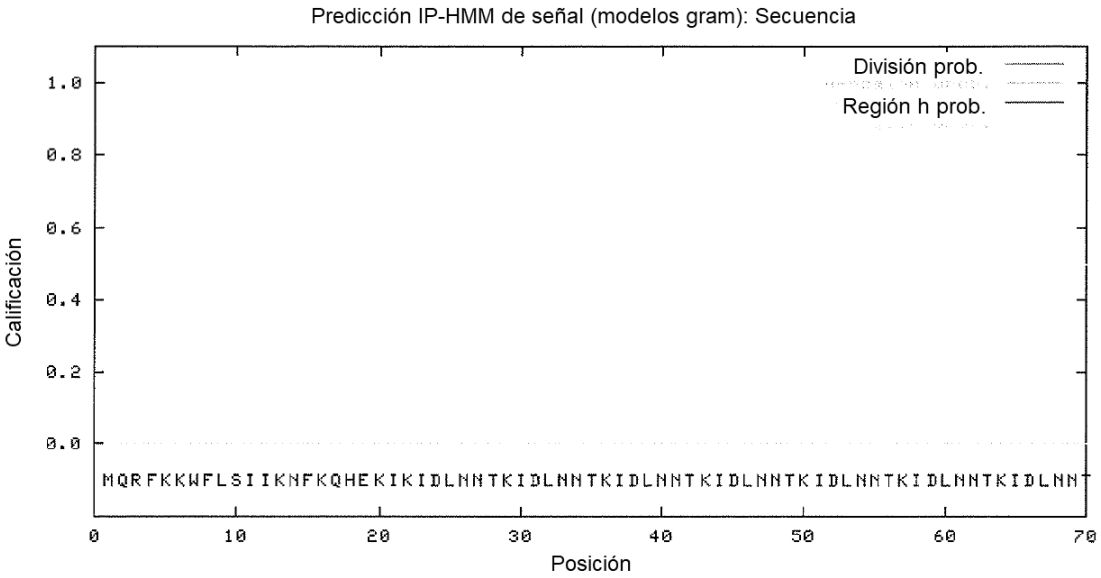
FIGURA 2A



>Secuencia:
MQRFKKWFLSIIKNFKQHEKIKIDLNNTKIDLNNTKIDLNNTKIDLNNTKIDLNNTKIDL
NNTKIDLNNT Longitud = 70

#	Medición	Posición	Valor	Corte	Péptido de señal?
Máximo	C	20	0.028	0.52	NO
Máximo	Y	20	0.084	0.33	NO
Máximo	S	2	0.831	0.92	NO
Media	S	1-19	0.369	0.49	NO
	D	1-19	0.227	0.44	NO

FIGURA 2B



>Secuencia
MQRFKKWFLSIIKNFKQHEKIKIDLNNTKIDLNNTKIDLNNTKIDLNNTKIDLNNTKIDL
NNTKIDLNNT longitud = 70
Predicción: Proteína no secretora
Probabilidad de péptido de señal: 0.000
Probabilidad de sitio de división máxima: 0.000 entre pos. 19 y 20

FIGURA 3

^{1}MQRFKKWFLSI**IKNFKQHEKI**[KIDLNNT]** **[KIDLNNT]** **[KIDLNNT]** **[KIDLNNT]** **[KIDLNNT]** **[KIDLNNT]** **[KIDLNNT]** **[KIDLNNT]** **[KIDLNNT]**KIELSQLKKE**HY
KVLDFHLRKITPQAFLEIVEIHLAESCNLNCFGCNHFSQIAEKEFPDIEIFKKD^{150}

FIGURA 4

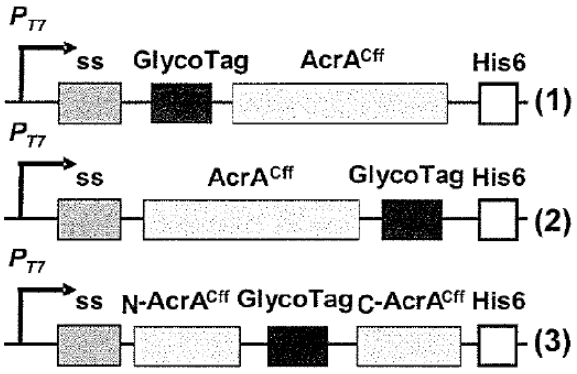


FIGURA 5

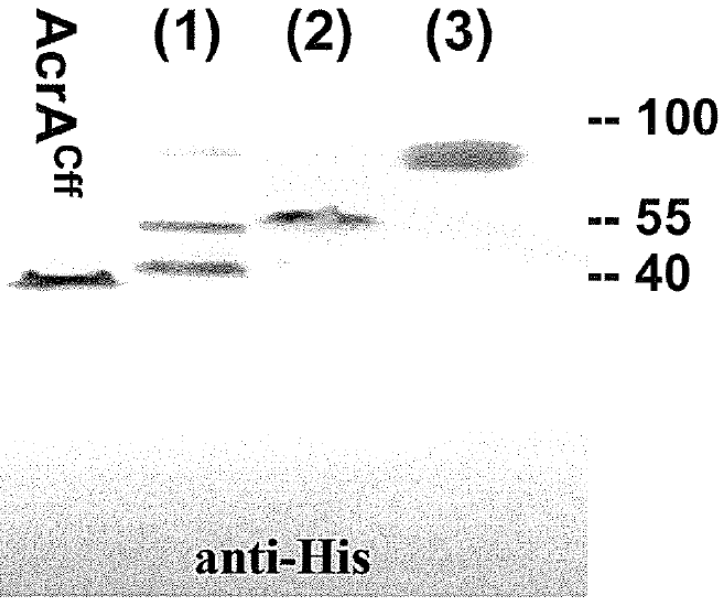


FIGURA 6A

*MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA*MDNKKSAAQQQIPPMPVTVMQAKMGDIPIVLSFNG
QTVSDMDVVLKAKVAGTIEKQFFKAGASVKEGDKLYQIDEAKYRAAYDSAFANLQVS
QANLKNAESDFDRAKKLQEKSAISQKEYDAALAAYESAKASVLASKANVQTAKIDLD
YSTVTAPFSGVLGDTLKDVGSYVSSSDADLVRLTKLNPIFVKFGISDVDKLNIAQKT
RTKEWEQLNSLVTLSMQNG**DYNGT**LTFIDNVIDEGSGTVNAKAMF**ENNST**QIRPGIF
ASVNVYGFYQKNGFKIPQVAILQDLASPFVYTLKDGKVAKNPIKIVSQDSTSAVISS
GINDGDLIIMDNFKKINIGQPVQAINDAKGSKLEFIKNFKQHEKIKI**DLNNT**KI**DLN**
NTKI**DLNNT**KI**DLNNT**KI**DLNNT**KI**DLNNT**KI**DLNNT**KI**DLNNT**KI**DLNNT**KIELSQ
LKKE*LEHHHHHH*

FIGURA 6B

*MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA*MVIIKNFKQHEKIKI**DLNNT**KI**DLNNT**KI**DLNNT**K
I**DLNNT**KI**DLNNT**KI**DLNNT**KI**DLNNT**KI**DLNNT**KI**DLNNT**KIELSQLKKEPMDNKK
SAAQQQIPPMPVTVMQAKMGDIPIVLSFNGQTVSDMDVVLKAKVAGTIEKQFFKAGA
SVKEGDKLYQIDEAKYRAAYDSAFANLQVSQANLKNAESDFDRAKKLQEKSAISQKE
YDAALAAYESAKASVLASKANVQTAKIDLDYSTVTAPFSGVLGDTLKDVGSYVSSSD
ADLVRLTKLNPIFVKFGISDVDKLNIAQKTRTKEWEQLNSLVTLSMQNG**DYNGT**LTF
IDNVIDEGSGTVNAKAMF**ENNST**QIRPGIFASVNVYGFYQKNGFKIPQVAILQDLAS
PFVYTLKDGKVAKNPIKIVSQDSTSAVISSGINDGDLIIMDNFKKINIGQPVQAIND
AKGSK*LEHHHHHH*

FIGURA 6C

*MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA*MDNKKSAAQQQIPPMPVTVMQAKMGDIPIVLSFNG
TVSDMDVVLKAKVAGTIEKQFFKAGASVKEGDKLYQIDEAKYRAAYDSAFANLQVSQ
ANLKNAESDFDRAKKLQEKSAISQKEYDAALAAYESAKASFIKNFKQHEKIKI**DLNN**
TKI**DLNNT**KI**DLNNT**KI**DLNNT**KI**DLNNT**KI**DLNNT**KI**DLNNT**KI**DLNNT**KI**DLNNT**
KIELSQLKKEASVLASKANVQTAKIDLDYSTVTAPFSGVLGDTLKDVGSYVSSSDAD
LVRLTKLNPIFVKFGISDVDKLNIAQKTRTKEWEQLNSLVTLSMQNG**DYNGT**LTFID
NVIDEGSGTVNAKAMF**ENNST**QIRPGIFASVNVYGFYQKNGFKIPQVAILQDLASPF
VYTLKDGKVAKNPIKIVSQDSTSAVISSGINDGDLIIMDNFKKINIGQPVQAINDAK
GSKLE*HHHHHH*

FIGURA 7A

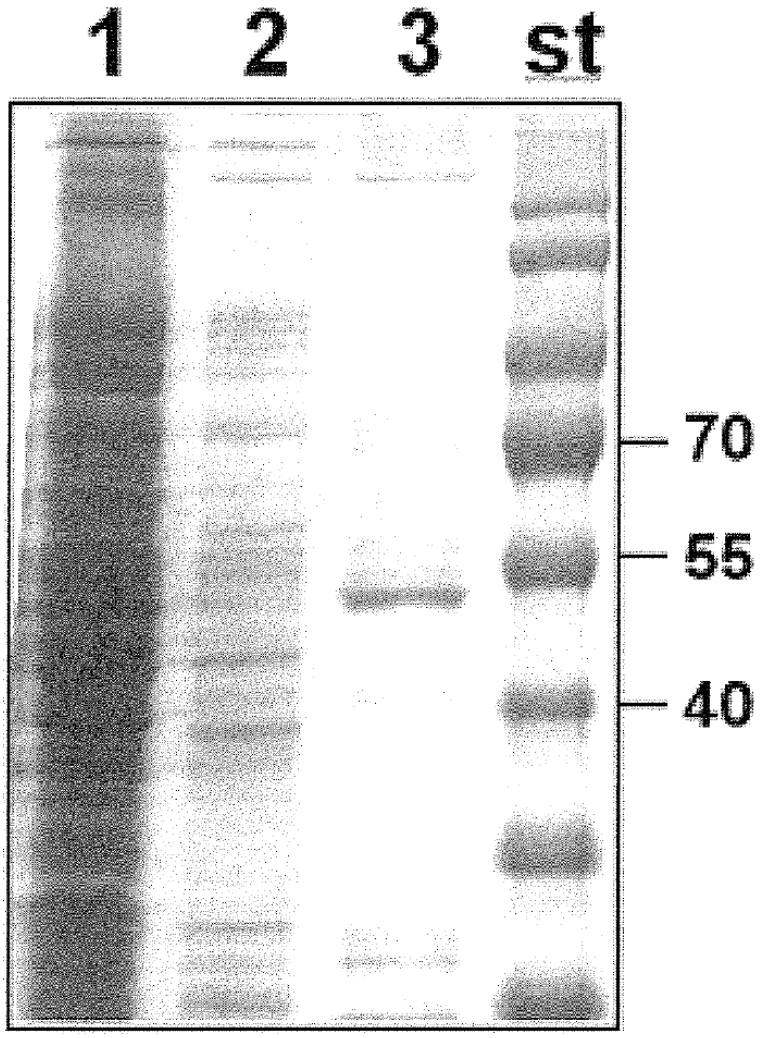


FIGURA 7B

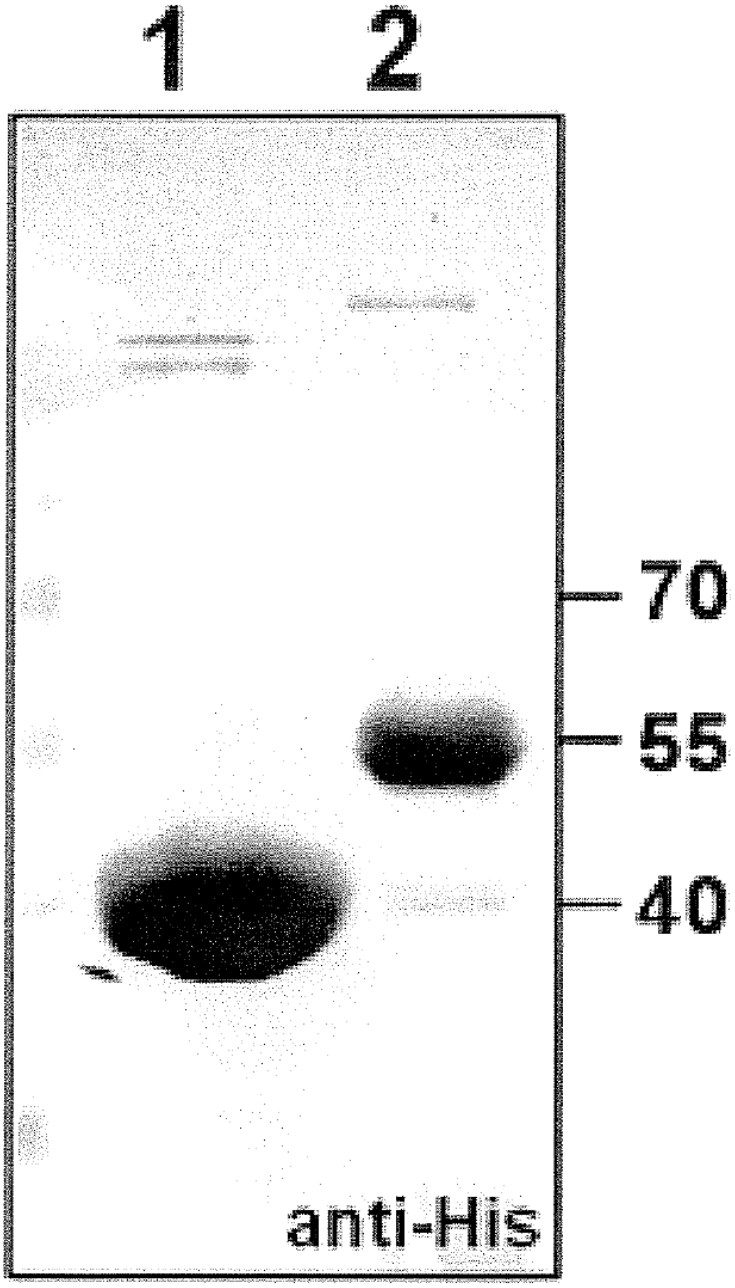


FIGURA 7C

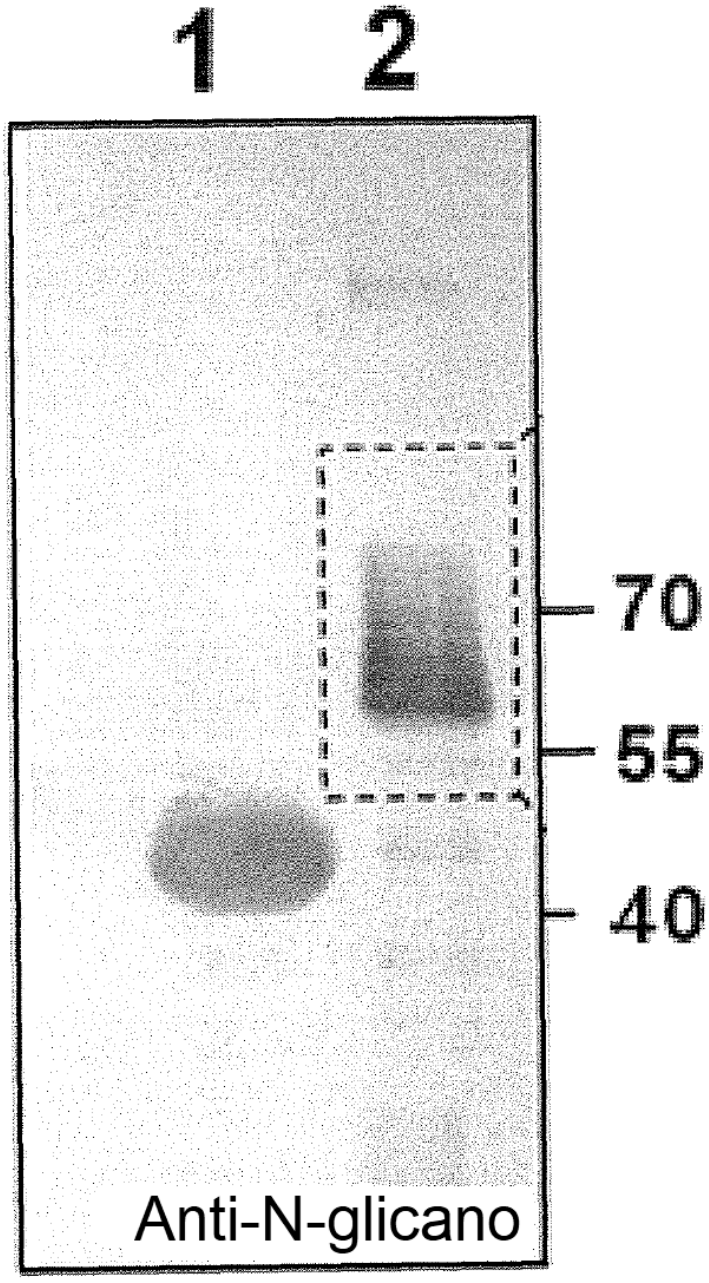


FIGURA 7D

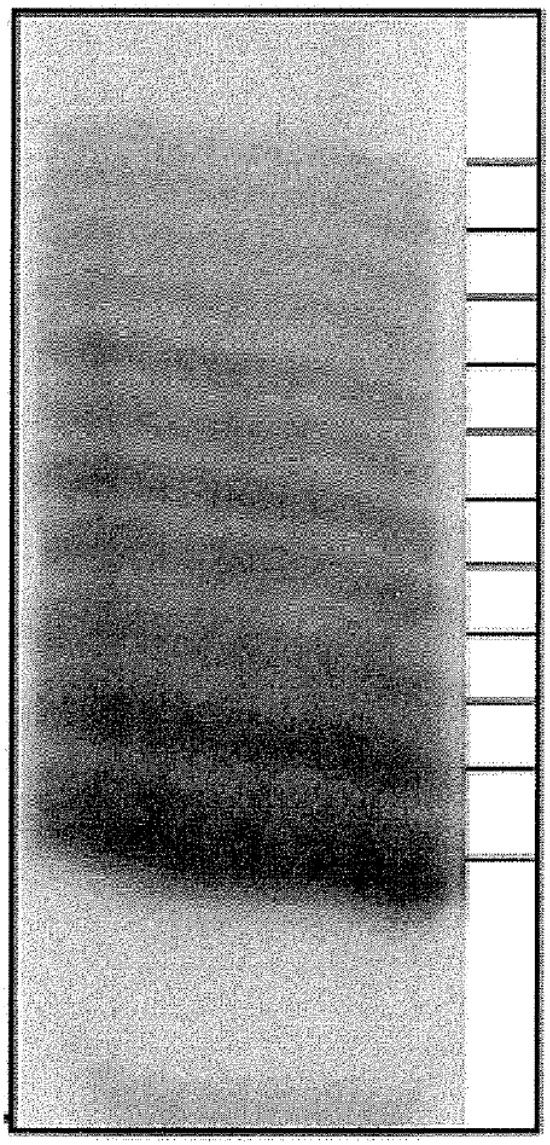


FIGURA 8A

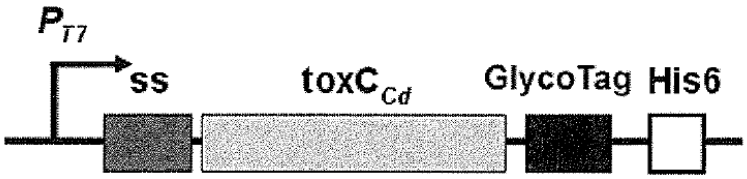


FIGURA 8B

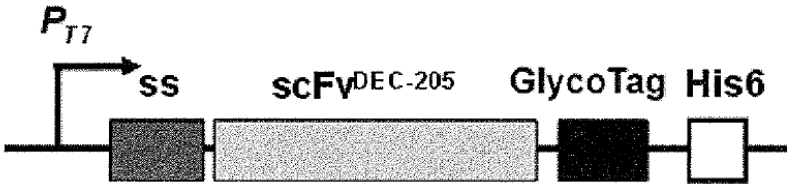


FIGURA 8C

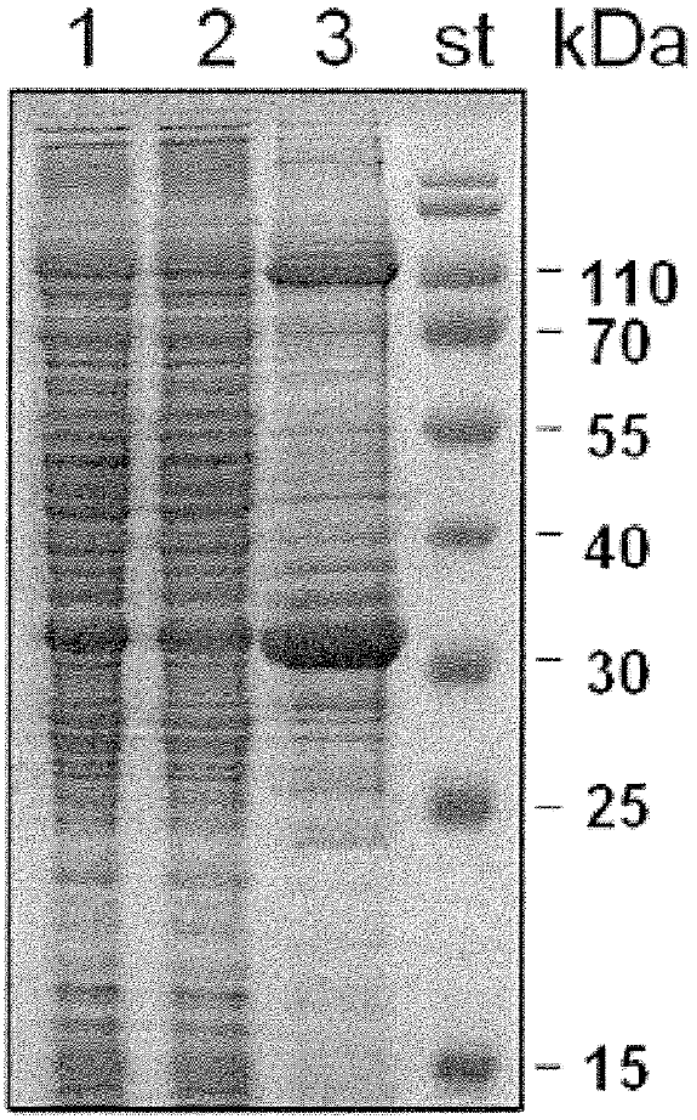


FIGURA 8D

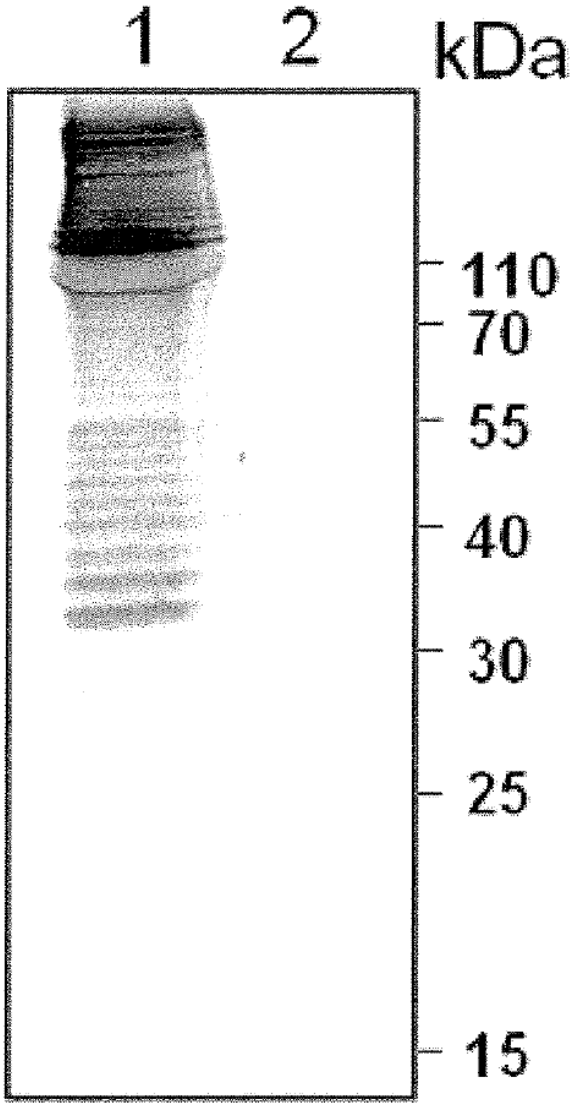


FIGURA 8E

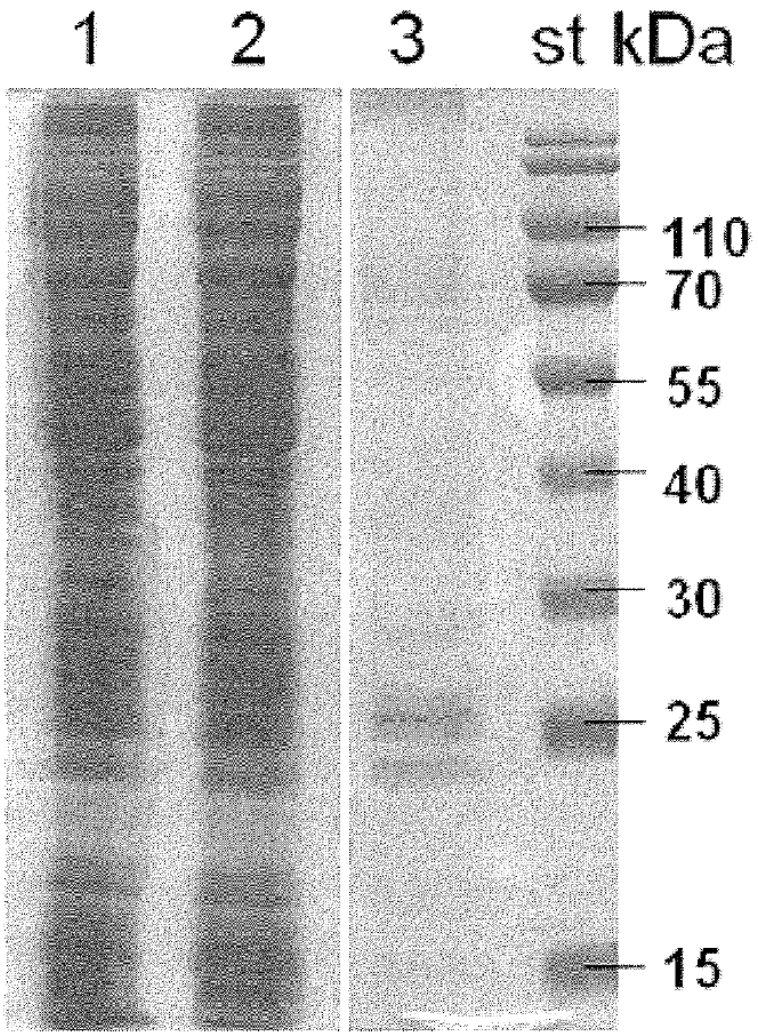


FIGURA 8F

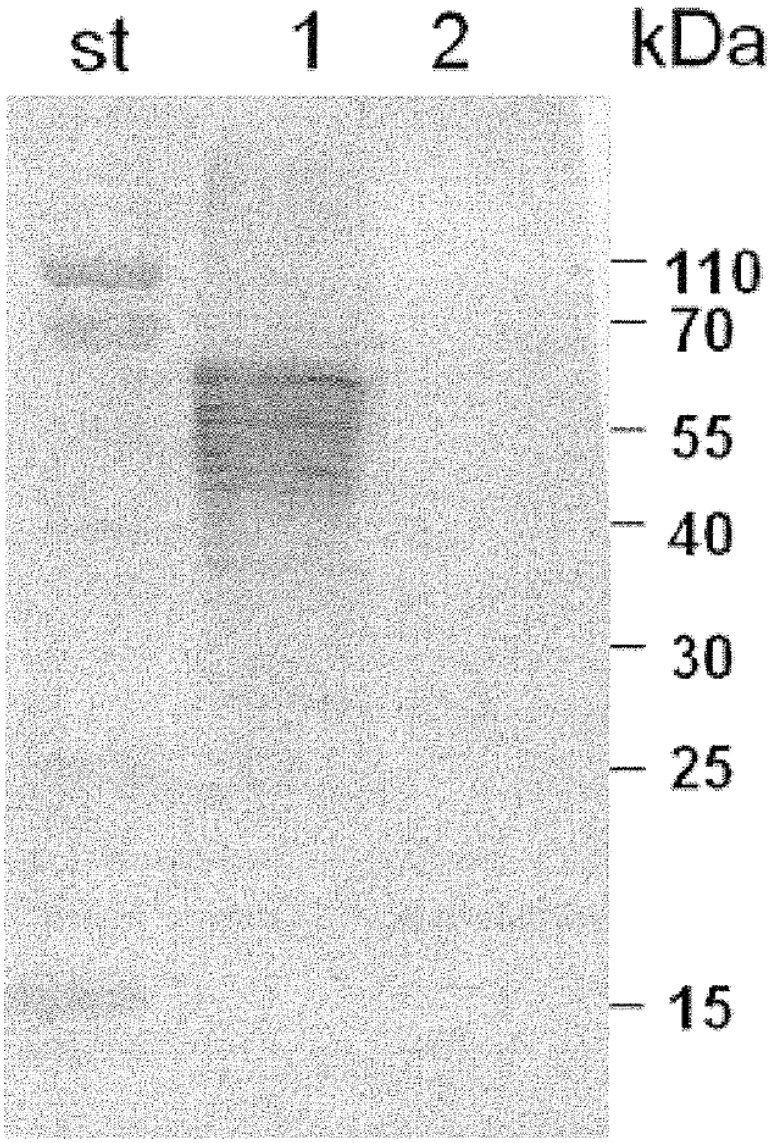


FIGURA 9A

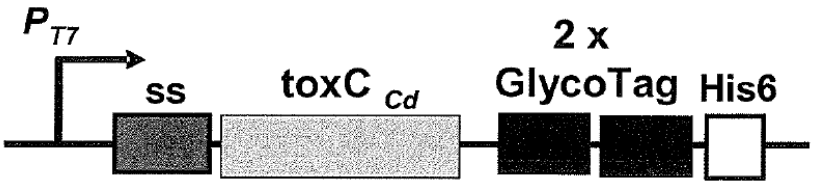


FIGURA 9B

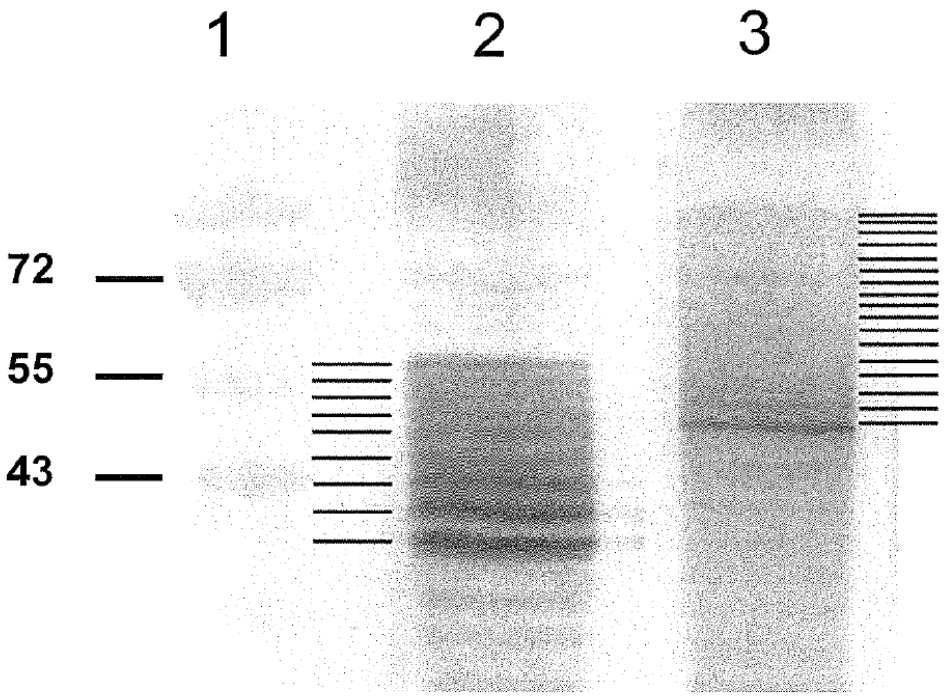


FIGURA 10

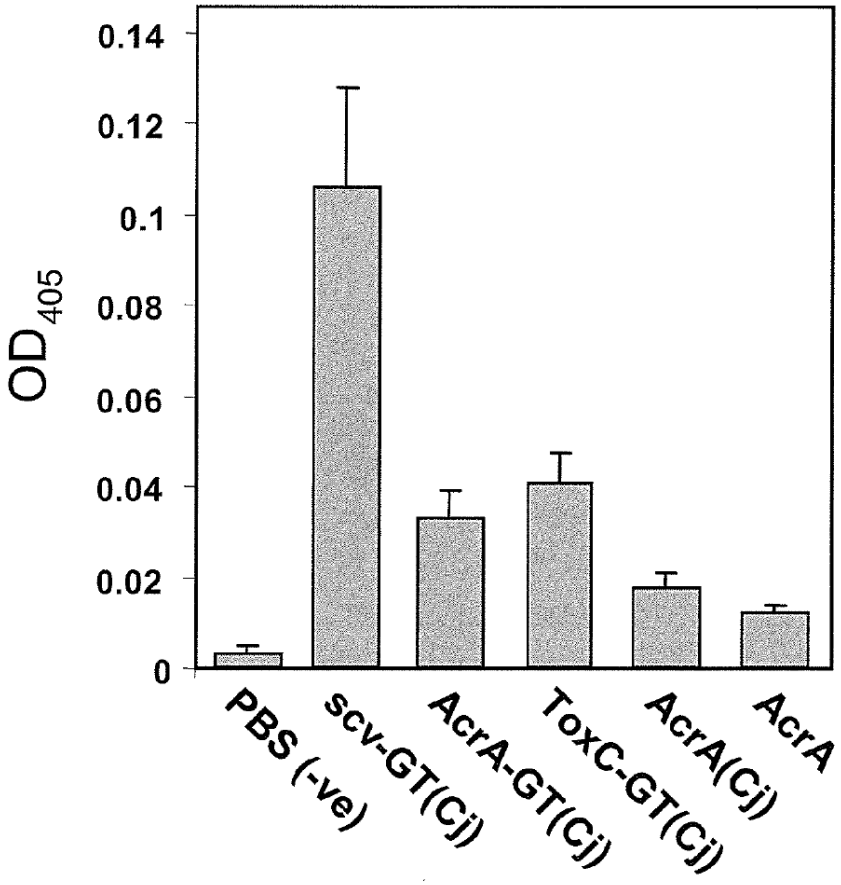

0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
OD405
PBS (-ve)
scv-GT(Cj)
AcrA-GT(Cj)
ToxC-GT(Cj)
AcrA(Cj)
AcrA

FIGURA 11A

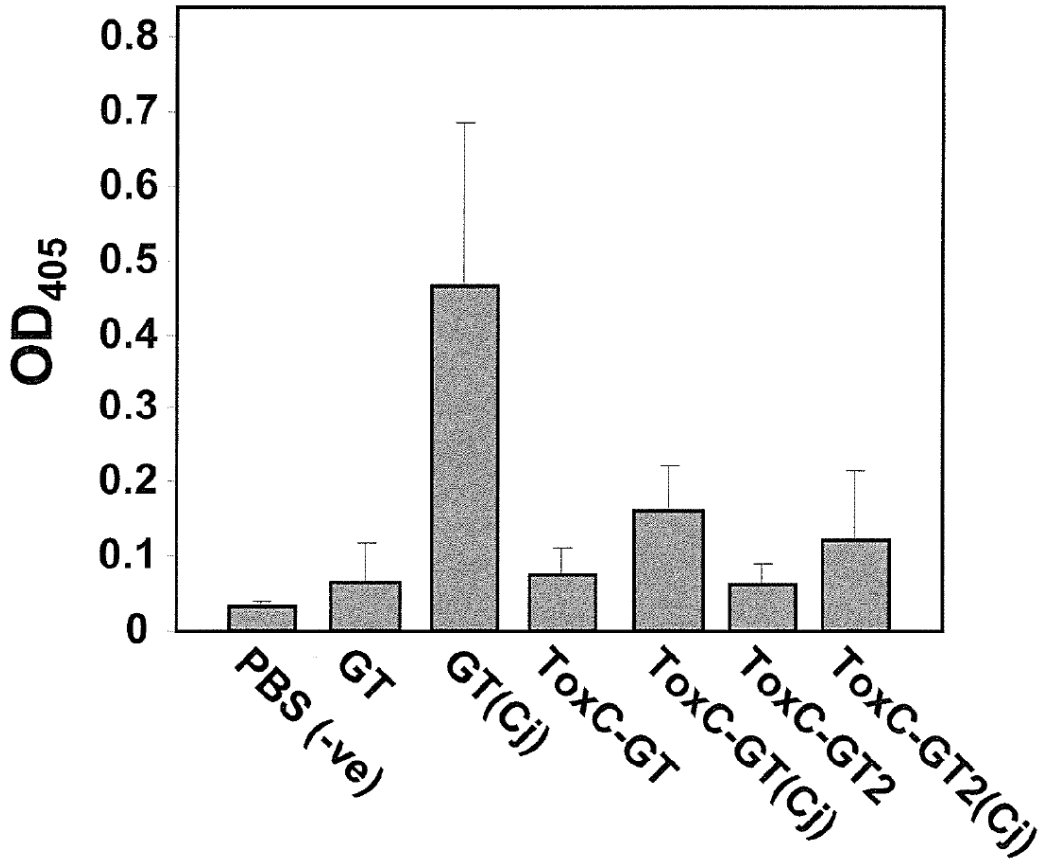

0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
OD405
PBS (-ve)
GT
GT(Cj)
ToxC-GT
ToxC-GT(Cj)
ToxC-GT2
ToxC-GT2(Cj)

FIGURA 11B

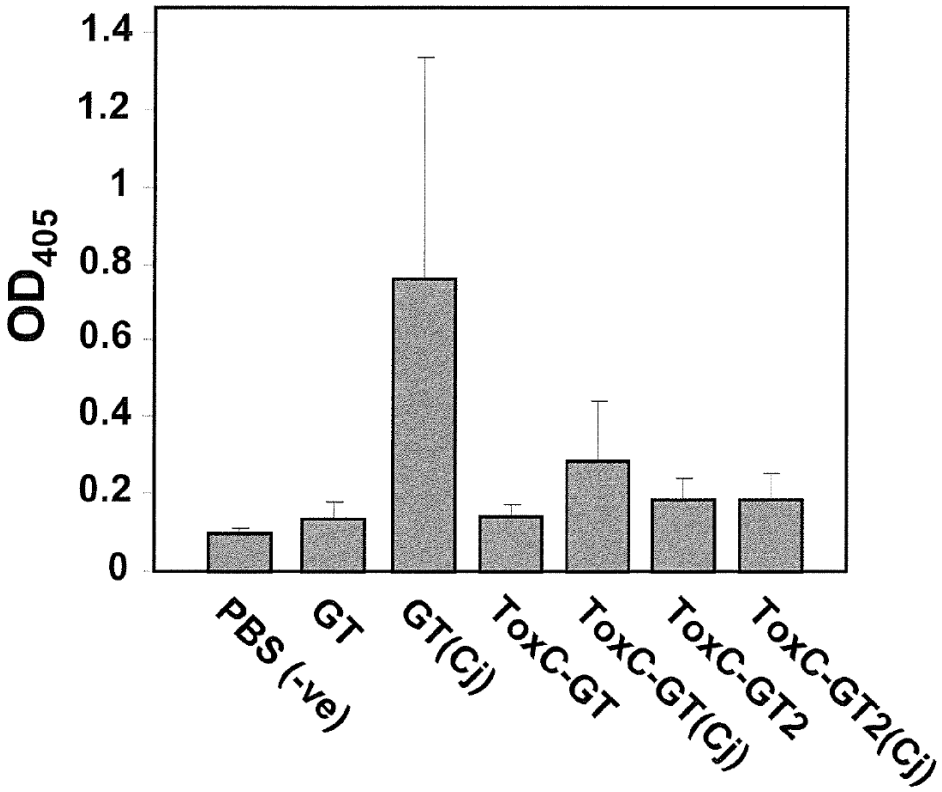

1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
OD405
PBS (-ve)
GT
GT(Cj)
ToxC-GT
ToxC-GT(Cj)
ToxC-GT2
ToxC-GT2(Cj)

FIGURA 12A

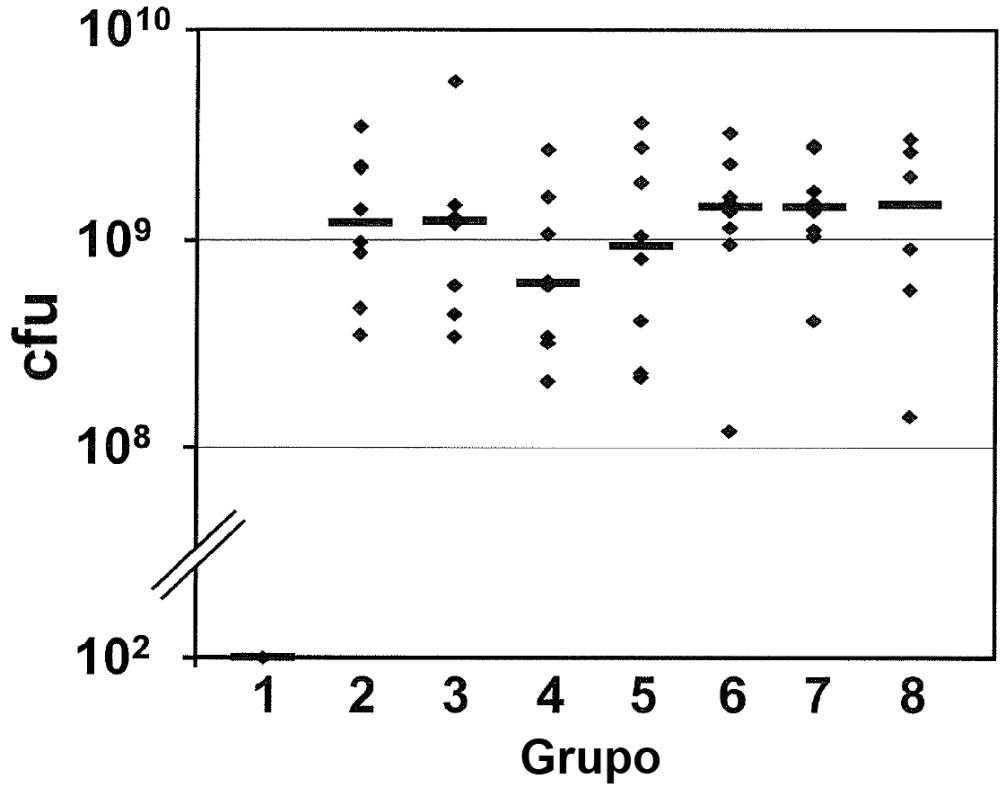


FIGURA 12B

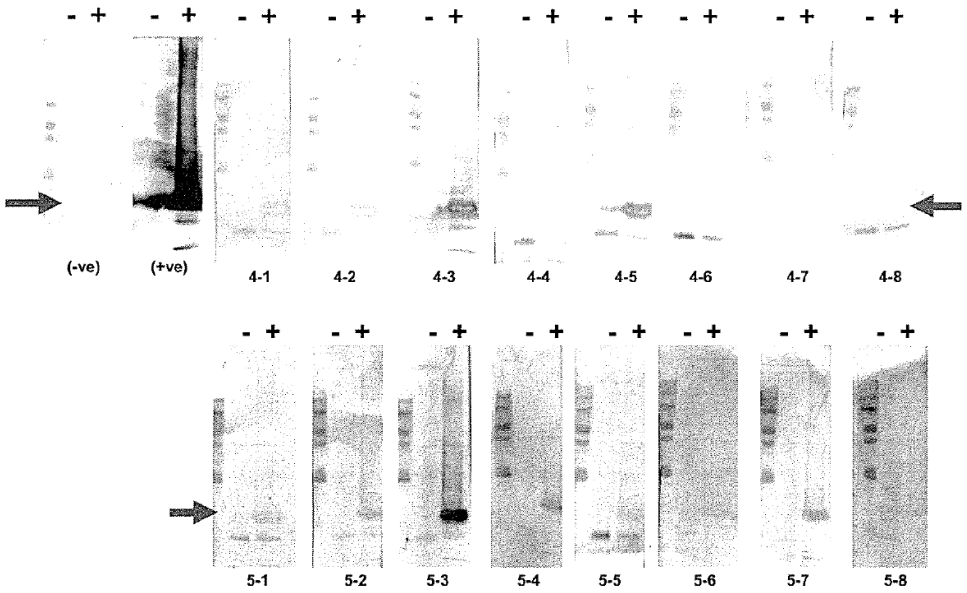


FIGURA 13

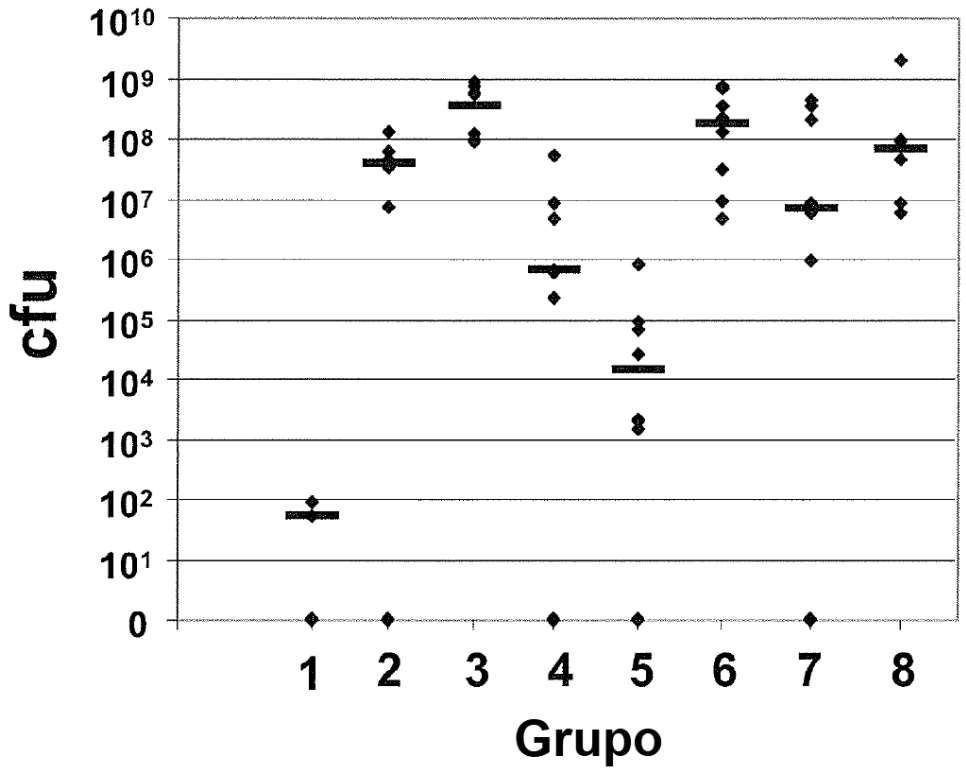


FIGURA 14

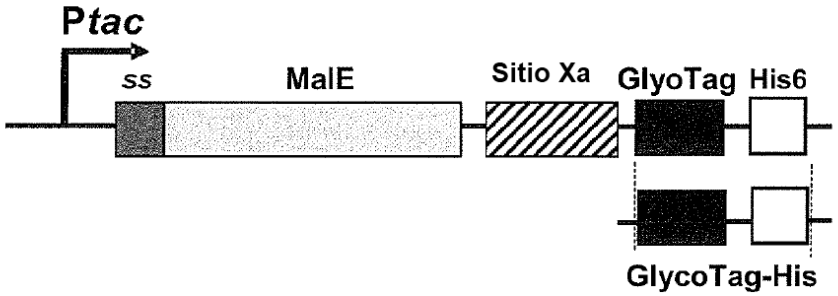
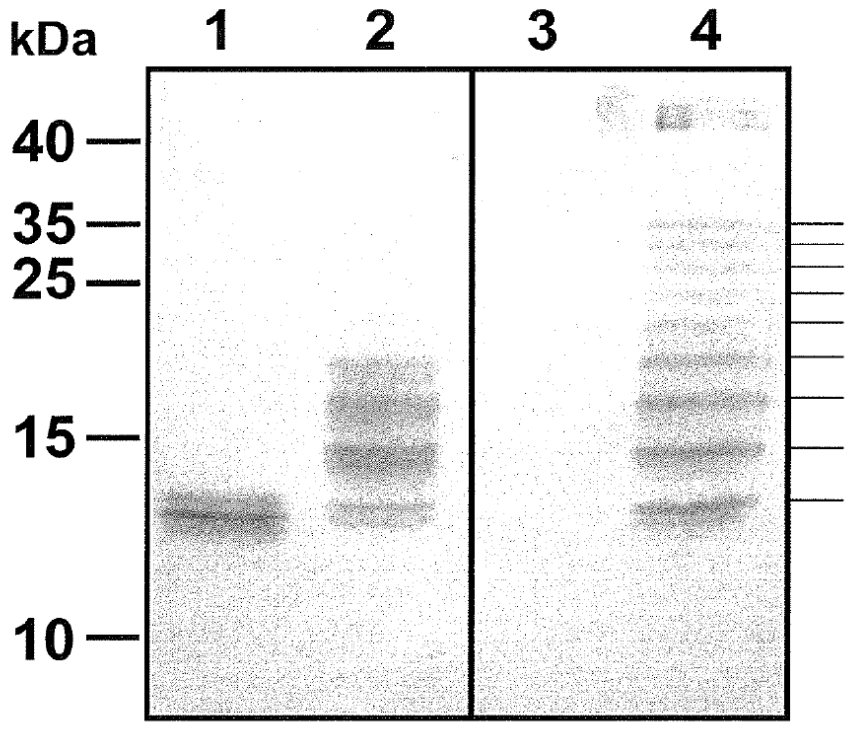



FIGURA 15