

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 369**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/106** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

**A61P 37/04** (2006.01)

**C12N 1/21** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2014 PCT/CA2014/050341**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2014 WO14161090**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2014 E 14778134 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 2991675**

54 Título: **Vacuna de Campylobacter**

30 Prioridad:

**05.04.2013 US 201361808875 P**

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

**08.04.2020**

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:

**INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E  
INVENCIONES, SLP**

ES 2 753 369 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Vacuna de *Campylobacter*

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a vacunas de *Campylobacter* para su uso en la vacunación de pollos contra *Campylobacter* como se define en las reivindicaciones. Más particularmente, las vacunas de *Campylobacter* utilizadas comprenden células de *Escherichia coli* que expresan el glucano heptasacárido de *Campylobacter jejuni* derivado de la vía de N-glucosilación.

**Antecedentes**

La bacteria Gram-negativa *Campylobacter* es la causa bacteriana más común de gastroenteritis humana en América del Norte y en muchos países industrializados. *Campylobacter* también es un importante patógeno transmitido por los alimentos en el ganado, incluidas las aves de corral, que se consideran una fuente importante de campilobacteriosis humana. Por lo tanto, el control en la granja de *Campylobacter* en aves de corral reduciría el riesgo de exposición humana a este patógeno y tendría un impacto significativo sobre la seguridad alimentaria y la salud pública.

*Campylobacter* es endémico en muchos países en desarrollo, principalmente debido a las malas condiciones sanitarias y al contacto humano cercano con los animales que son los reservorios del patógeno. Un informe de Katarzyna et al. Expert Rev. Vaccines 8: 625-645, 2009), sugiere que en los Estados Unidos, las infecciones por *Campylobacter* son la causa de 1,5 millones (datos de la Organización Mundial de la Salud) a 2,4 millones casos de enfermedades cada año (Datos de los Centros para el Control de Enfermedades de EE. UU.). Además, según la Organización Mundial de la Salud, aproximadamente el 1% de la población de Europa occidental se infecta anualmente por especies de *Campylobacter*. Las infecciones humanas están causadas principalmente por dos especies: *C. coli* y *C. jejuni*, que son responsables de más del 95% de los casos de campilobacteriosis. Las manifestaciones clínicas de las infecciones por *Campylobacter* pueden variar desde casos asintomáticos hasta gastroenteritis grave, acompañadas de diarrea mucosa, sanguinolenta o acuosa a veces duradera.

La publicación de Jun Lin "Novel Approaches for *Campylobacter* Control in Poultry" (FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE, Volumen 6, número 7, págs. 755-765, 2009), analiza varias estrategias para reducir la infección por *Campylobacter* en aves de corral. Lin sugiere tres estrategias generales para controlar *Campylobacter* en aves de corral a nivel de granja: (1) reducción de la exposición ambiental (medidas de bioseguridad), (2) un aumento en la resistencia del hospedador de las aves de corral para reducir el transporte de *Campylobacter* en el intestino (p. ej., exclusión competitiva, vacunación y selección genética del hospedador), y (3) el uso de alternativas antimicrobianas para reducir e incluso eliminar *Campylobacter* de los pollos colonizados (p. ej., terapia con bacteriófagos y tratamiento con bacteriocinas). Lin afirma además que, excepto por las medidas de bioseguridad, los otros enfoques de intervención no están disponibles comercialmente y todavía están en desarrollo.

La eliminación de estos patógenos del ganado puede servir como un medio para reducir la incidencia de infección en seres humanos y prevenir la propagación en animales de granja. La vacunación en las granjas también puede reducir el riesgo de contaminación humana por comer o manipular productos animales, así como la contaminación por la eliminación fecal de bacterias del estiércol del ganado. El tratamiento de la campilobacteriosis con antibióticos también se está volviendo cada vez más difícil a medida que la resistencia a antibióticos de *Campylobacter* a antibióticos previamente eficaces se está volviendo más común.

La glucosilación alguna vez se había considerado específicamente como un fenómeno eucariota, pero posteriormente se demostró que estaba muy extendida en los dominios Arquea y Bacteriano. Los enlaces O y N bacterianos se forman con una gama más amplia de azúcares que aquellos observados en las glucoproteínas eucariotas. Una vía de glucosilación general para proteínas en Bacterias se demostró por primera vez en *C. jejuni*. (Szymanski et al. Molecular Microbiology 32: 1022-1030, 1999). La maquinaria de glucosilación de *C. jejuni* se ha caracterizado e incluso se ha transferido con éxito a *E. coli* (Wacker et al. Science, 298: 1790-1793, 2002) y se demostró la N-glucosilación activa de proteínas (Young et al. J Biol Chem, 277: 42530-42539, 2002; Wacker et al. Science, 298: 1790-1793, 2002). El locus génico de *C. jejuni*, denominado *pgl* (para la glucosilación de proteínas), está implicado en la glucosilación de múltiples proteínas. Su silenciamiento mutacional da como resultado la pérdida de inmunogenicidad en múltiples proteínas, entre muchos fenotipos biológicos.

La Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. 2006/0165728 A1, actualmente Patente de EE. UU. N.º 7.598.354, identifica un heptasacárido específico y altamente inmunogénico que está presente en una pluralidad de glucoproteínas periplásmicas y expuestas sobre la superficie de *C. jejuni*. Este heptasacárido es común al menos a varias especies de *Campylobacter* y a numerosas cepas que son importantes como patógenos humanos y veterinarios (Nothhaft et al. Mol. Cell. Proteomics 11: 1203-1219, 2012). El heptasacárido tiene la siguiente fórmula (I): GalNAc- $\alpha$ 1,4-GalNAc- $\alpha$ 1,4-[Glc- $\beta$ -1,3]GalNAc- $\alpha$ 1,4-GalNAc- $\alpha$ 1,4-GalNAc- $\alpha$ 1,3-diNAcBac, en donde diNAcBac (también denominado di-N-acetilbacilosamina) es 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-glucopiranososa, GalNAc es N-acetilgalactosamina y Glc es glucosa. Este resto glucano es un componente de múltiples glucoproteínas. En *C. jejuni*, el N-

glucano es importante para la interacción de *C. jejuni* con las células hospedadoras. Las mutaciones en la maquinaria de glucosilación conducen a una disminución de la colonización de los tractos intestinales en ratones y pollos. En *C. jejuni*, el N-glucano es importante para la unión e invasión de células epiteliales humanas (Szymanski et al. Infect Immun 70: 2242-2244, 2002), para la colonización de los tractos intestinales de ratones y pollos (Kelly et al. J Bacteriol 188: 2427-2434, 2006; Szymanski et al. Infect Immun 70: 2242-2244, 2002; Hendrixson & DiRita, Mol Microbiol 52: 471-484, 2004; Karlyshev et al. Microbiology 150: 1957-1964, 2004), para la competencia natural en cepas con sistemas de secreción de tipo IV (Larsen et al. J Bacteriol 186: 6508-6514, 2004) y para la unión a la lectina de tipo C de macrófagos humanos, MGL (van Sorge et al, Cell Microbiol 11: 1768-1781,2009). Además, se demostró que los N-glucanos de la superficie de *Campylobacter* desempeñan funciones protectoras contra las proteasas intestinales de pollo, lo que da como resultado una mayor aptitud bacteriana (Alemka et al. Infect Immun 81: 1674-82, 2013).

La publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. 2012/0100177 describe una cepa de *Salmonella enterica* que comprende al menos un operón *pgl* de *C. jejuni* o un derivado funcional del mismo y que presenta al menos un N-glucano de *C. jejuni*, o un glucano derivado del mismo, en su superficie celular. Se supone que esta *S. enterica* recombinante es útil en una vacuna contra las infecciones por *Campylobacter*, particularmente en el ganado, talo como las aves de corral. Sin embargo, lamentablemente, publicaciones posteriores han demostrado que, si bien la *S. enterica* recombinante que expresa el N-glucano de *Campylobacter* en su superficie fue capaz de colonizar pollos sin causar enfermedad, no hubo una respuesta inmunitaria humoral detectable en los pollos vacunados contra el N-glucano de *Campylobacter* (Thommen " Campylobacter N-glycan presenting Salmonella Typhimurium: a new vaccine for broiler chickens?" Zurich Open Repository and Archive, University of Zurich, Dissertation, Facultad Vetsuisse, 2011). Además, no hubo reducción en la colonización por *C. jejuni* en los pollos vacunados tras la infección con una exposición a *C. jejuni*.

Thommen, I.N. (2011) Campylobacter N-glycan presenting Samonelly Typhimurium: a new vaccine for broiler chickens? Tesis, University of Zurich, Facultad Vetsuisse, enseña que la vacunación de pollos con *S. typhimurium* que expresa N-glucano de *Campylobacter* no induce una respuesta inmunitaria humoral detectable y no reduce la colonización por *C. jejuni* en la ceaca.

Nothaft, H. et al., Molecular & Cellular Proteomics (2012) 11:1203-1219 enseña la inmunización de conejos con *E. coli* modificada por ingeniería para expresar un N-glucano de *Campylobacter jejuni*.

Sigue existiendo la necesidad de una vacuna eficaz para prevenir y/o tratar las infecciones por *Campylobacter* en seres humanos y animales, en particular en ganado, más particularmente en aves de corral.

Esta información de antecedentes se proporciona con el propósito de dar a conocer información que el solicitante cree que es de posible relevancia para la presente invención. No se pretende admitir necesariamente, ni se debe interpretar, que cualquier información anterior constituye una técnica anterior contra la presente invención.

## Sumario

Un objeto de la presente invención es proporcionar una vacuna para su uso en la vacunación de pollo contra *Campylobacter*. La composición de la vacuna utilizada comprende bacterias modificadas por ingeniería para expresar al menos un N-glucano de *Campylobacter* sobre su superficie celular; y uno o más de un diluyente, excipiente, adyuvante o vehículo fisiológicamente aceptable. En determinadas realizaciones, la especie de *Campylobacter* es *C. jejuni*. Las bacterias pueden ser *Escherichia coli* o *Salmonella* y las bacterias modificadas por ingeniería expresan el heptasacárido de *C. jejuni* sobre su superficie.

En determinadas realizaciones, la composición de la vacuna comprende *E. coli* modificada por ingeniería viva, o células de *E. coli* modificadas por ingeniería vivas, atenuadas, inactivadas o destruidas. La composición puede comprender una suspensión de bacterias modificadas por ingeniería en un diluyente tamponado adecuado, tal como solución salina tamponada con fosfato, y puede formularse para administración oral o pulverización, por ejemplo. La composición de la vacuna también se puede formular para agregarla al pienso del ganado, aditivos para alimentos o agua, y para la administración a aves de corral, tal como pollos.

Se describe un método para vacunar a un animal contra *Campylobacter*, comprendiendo el método administrar a un animal una composición de vacuna como se describe en el presente documento que comprende bacterias modificadas por ingeniería para expresar al menos un N-glucano de *Campylobacter*, tal como *C. jejuni*, sobre su superficie celular; y uno o más de un diluyente, excipiente, adyuvante o vehículo fisiológicamente aceptable.

Se sabe que la expresión del N-glucano en *Salmonella* no induce una respuesta inmunitaria protectora. Sorprendentemente, los presentes inventores descubrieron que *E. coli*, que es una bacteria muy similar a *Salmonella* y que se habría esperado obtener resultados similares, induce una respuesta inmunitaria protectora en pollos cuando se expresa el N-glucano.

## Breve descripción de las figuras

Para una mejor comprensión de la presente invención, así como otros aspectos y características adicionales de la misma, se hace referencia a la siguiente descripción que se utilizará junto con los dibujos adjuntos, donde:

5 La Figura 1 muestra lisados celulares tratados con proteinasa K de *E. coli* a partir de polimerasa mutante de *E. coli*.

La Figura 2 muestra la estructura del lípido A-N-glucano y un experimento de RMN del componente Lípido A-N-glucano de *Campylobacter jejuni* purificado

10 La Figura 3 muestra un experimento FACS con la polimerasa mutante de *E. coli*.

Las figuras 4 A, B, C y D representan la vacunación y los experimentos de exposición como se describe en el Ejemplo 2 y

15 la Figura 5 A y B representan respuestas de anticuerpos específicos de N-glucano de IgY (IgG) de pollo (ELISA).

### Descripción detallada

#### Definiciones

20 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención.

25 Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, las forman en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen las referencias en plural salvo que el contexto indique claramente otra cosa.

30 Se entenderá que el término "que comprende", como se usa en el presente documento, significa que la siguiente lista no es exhaustiva y puede o no incluir cualquier otro elemento adecuado adicional, por ejemplo, una o más características, componentes y/o ingredientes adicionales según corresponda.

35 Las expresiones "glucano de *C. jejuni*", "heptasacárido de *C. jejuni*", "N-glucano heptasacárido", "*N-glucano de Campylobacter*", y "heptasacárido", se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un resto de glucano que está presente en una pluralidad de glucoproteínas expuestas en la superficie y oligosacáridos libres en múltiples cepas y especies de *Campylobacter*. Este glucano, en el caso de *C. jejuni* y como se ejemplifica en el presente documento, tiene la fórmula: GalNAc- $\alpha$  1,4-GalNAc- $\alpha$ 1,4-[Glc- $\beta$ -1,3] GalNAc- $\alpha$ 1,4-GalNAc- $\alpha$ 1,4-GalNAc- $\alpha$ 1,3-diNAcBac, en donde diNAcBac es 2, 4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-glucopiranososa. Estos términos pueden referirse a la glucosilación, ya sea por N-glucosilación o mediante el uso de azúcares derivados de la N-glucosilación u otras vías. El trabajo reciente de los presentes inventores ha demostrado que el N-glucano de *C. jejuni* y los oligosacáridos libres se conservan razonablemente en las especies termófilas de *Campylobacter* (Nothhaft et al. Cell. Proteomics 11: 1203-1219, 2012) y algunas especies producen un derivado de hexasacárido del heptasacárido, que carece de la ramificación de glucosa. El uso de estructuras alternativas de N-glucano y oligosacáridos libres descrito por (Nothhaft et al. Mol. Cell. Proteomics 11: 1203-1219, 2012) que están presentes en la especie de *Campylobacter* no termófila, tales como los descritos en la publicación PCT WO/2011/09773 3.

45 El término "antígeno" como se usa en el presente documento se refiere a una especie química o biológica que induce una respuesta inmunitaria en un animal o ser humano. En el sistema actualmente descrito, el antígeno comprende el heptasacárido de *Campylobacter jejuni*. La expresión "derivado de N-glucano", como se usa en el presente documento, se refiere a derivados del heptasacárido que inducen una respuesta inmunitaria en un animal similar a o mejor que la inducida por el propio heptasacárido. El N-glucano puede conjugarse con vehículos tales como proteínas (como se describe en la solicitud PCT Número WO 2012/027850) y lípidos (Nothhaft et al. Mol. Cell. Proteomics 11: 1203-1219, 2012, van Sorge et al. Cell Microbiol 11: 1768-1781,2009), por ejemplo, o repeticiones de sacáridos más cortas o más largas del heptasacárido en un polisacárido.

55 El término "vacuna" como se usa en el presente documento se refiere a una composición para mejorar la inmunidad en animales o seres humanos a ciertos microorganismos. Las vacunas actualmente descritas se pueden usar en una amplia variedad de animales, tal como, por ejemplo, aves, tales como aves de corral, así como mamíferos. Los microorganismos a los que se dirige la vacuna actualmente descrita son del género *Campylobacter*.

60 El término "*Campylobacter*", como se usa en el presente documento, se refiere a un género de bacteria que comprende cualquiera y todas las especies del género *Campylobacter*. Las diversas especies de *Campylobacter* de este género incluyen, pero sin limitación, *C. jejuni*, *C. hominis*, *C. rectus*, *C. lari*, *C. fetus*, *C. coli*, *C. upsaliensis*, *C. fetus subsp. venerealis*, *C. fetus subsp. fetus*, *C. peloridis*, *C. lari subsp. concheus*, *C. sputorum*, *C. gracilis*, *C. showae*, *C. lanienae*, *C. curvus*, *C. helveticus*, *C. hyointestinalis subsp. hyointestinalis*, *C. hyointestinalis subsp. lawsonii*, *C. mucosalis*, *C. sputorum* *bv. paraureolyticus*, *C. sputorum* *bv. fecalis*, *C. ureolyticus*, *C. insulaenigrae*, *C. concisus*, *C. subantarcticus*, *C. avium*, *C. cuniculorum*, y *C. volucris*.

La presente solicitud proporciona un glucano, y fragmentos inmunitariamente activos del mismo, que pueden usarse como vacunas contra la infección por *Campylobacter* en seres humanos y animales. Dichas vacunas pueden ser útiles para prevenir o neutralizar las infecciones por *Campylobacter* en el ganado, evitando así que este patógeno ingrese a la cadena alimentaria humana. En determinadas realizaciones, el heptasacárido de *C. jejuni* y los fragmentos del mismo, opcionalmente unidos a un aminoácido, oligopéptido, lípido u otro conjugado adecuado, pueden usarse como vacuna. Por ejemplo, esta vacuna se puede usar en cualquier animal infectado con *Campylobacter* para el cual el N-glucano se puede expresar sobre la superficie de *E. coli* como una fusión de núcleo de Lípido A.

#### 10 Composición de vacuna

La presente solicitud proporciona una composición de vacuna que comprende *E. coli* recombinante que se ha modificado por ingeniería para expresar al menos un N-glucano de *Campylobacter*, o un derivado de heptasacárido del mismo, en su superficie. La *E. coli* recombinante está viva, muerta y/o atenuada.

Como se describe anteriormente, el heptasacárido de *Campylobacter* es común al menos a varias especies de *Campylobacter* y numerosas cepas, incluidas especies que son importantes como patógenos humanos y veterinarios. Es un componente de múltiples glucoproteínas, incluyendo, por ejemplo, *C. jejuni* números Cj0114, Cj0200c, Cj0289c, Cj0367c y otros. Este resto de glucano también es fuertemente inmunogénico y, como tal, este glucano (y los derivados relacionados del mismo y glucopéptidos que comprenden el N-glucano o derivados del mismo) se identificó como un buen candidato para su uso como antígeno en una vacuna para la inmunización contra múltiples cepas y especies de *Campylobacter* en mamíferos, incluidos seres humanos y ganado, incluidos los pollos (Patente de Estados Unidos N.º 7.598.354).

*E. coli* es una bacteria Gram negativa que tiene una membrana externa cubierta de lipopolisacárido (LPS), que contribuye a la integridad estructural de la bacteria y proporciona una barrera física para proteger las membranas. LPS se compone de tres componentes principales: Lípido A, el núcleo y el antígeno O. El lípido A ancla el LPS a la membrana externa y el antígeno O es la parte más externa del LPS. El núcleo es un oligosacárido ramificado que une los componentes del lípido A y el antígeno O del LPS.

La cepa de *E. coli* útil en la preparación de la presente composición de vacuna es cualquier cepa que esté o pueda estar suficientemente atenuada para permitir su administración no patológica a seres humanos y/o animales en forma viva o muerta. Pueden usarse otras bacterias tales como *Salmonella* u otras cepas de *E. coli* que pueden ofrecer una expresión suficiente y una respuesta inmunitaria mejorada.

La expresión "operón *pgl*", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier grupo de glucosilación fisiológicamente activo de genes de *Campylobacter* capaces de glucosilar estructuras homólogas o heterólogas producidas por la cepa de *E. coli* empleada en la composición de vacuna. El operón *pgl* en *C. jejuni* codifica todas las enzimas necesarias para la síntesis del N-glucano heptasacárido de *C. jejuni*, su transporte a través de la membrana interna y la transferencia a proteínas. PglD, E, F codifican para las enzimas implicadas en la biosíntesis de di-N-acetilbacilosamina, PglC transfiere UDP-diN-acetilbacilosamina a undecaprenilfosfato y PglA, H y J agregan los restos de GalNAc. La rama de Glc está unida por PglI. La transferencia a través de la membrana interna del heptasacárido completo se produce a través de la acción de PglK y la oligosacariltransferasa PglB transfiere el N-glucano a la proteína y también libera el heptasacárido en el periplasma en su forma libre.

Un derivado funcional de un operón *pgl* es un grupo de genes derivados de cualquier operón *pgl* de *Campylobacter* que tiene delecciones, mutaciones y/o sustituciones de nucleótidos o genes completos, pero que aún es capaz de producir un oligo o polisacárido que puede unirse a estructuras homólogas o heterólogas producidas por la cepa de *E. coli* utilizada en la composición de vacuna. Uno o más operones *pgl* o derivados de los mismos pueden integrarse en el cromosoma de la cepa de *E. coli* o pueden introducirse como parte de al menos un plásmido. Generalmente, se prefiere la integración cromosómica porque es más estable en comparación con los vectores plasmídicos, cuya pérdida podría producirse durante la propagación. Se observa que la cepa de *E. coli* puede comprender más de un operón *pgl* o derivado del mismo que produce uno o más N-glucanos o derivados de los mismos. En determinadas realizaciones, la composición de vacuna comprende una cepa de *E. coli* que tiene más de un tipo de operón *pgl* que da como resultado que se exprese más de una estructura de glucano sobre la superficie de la *E. coli* recombinante. Esto puede ser ventajoso para provocar una respuesta inmunitaria más diversa en un ser humano o animal contra diferentes especies de *Campylobacter*. En una realización alternativa, la composición de vacuna comprende una cepa de *E. coli* que tiene un único tipo de operón *pgl* que da como resultado una estructura de glucano que se expresa sobre la superficie de la *E. coli* recombinante. Esto puede ser ventajoso para provocar una respuesta inmunitaria específica en un ser humano o animal contra una sola especie de *Campylobacter*.

Opcionalmente, el nivel de expresión del glucano de *C. jejuni* puede regularse mediante el uso de diferentes promotores u otros elementos reguladores cadena arriba del operón *pgl*, incluyendo, pero sin limitación, promotores de genes de proteínas ribosómicas, así como promotores de genes que codifican la resistencia a antibióticos como *bla* o promotores similares y preferentemente fuertes. Este tipo de regulación está disponible para operones *pgl* codificados por plásmidos o cromosómicamente integrados. Además, la estabilidad del plásmido puede potenciarse

opcionalmente incluyendo genes esenciales en el plásmido mientras se eliminan estos genes en el genoma de la cepa de *E. coli* empleada en la composición de vacuna.

5 En una realización alternativa, el gen *pglB* del operón *pgl* está inactivado, lo que significa que la oligosacariltransferasa B correspondiente no se expresa o al menos se inactiva enzimáticamente. El producto del gen *pglB* transfiere el N-glucano a un sitio aceptor de polipéptido específico que se describe más adelante y libera el heptasacárido en su forma libre. La inactivación de la transferasa conduce a que el derivado de N-glucano o N-glucano se una exclusivamente al núcleo del lípido A aceptor de antígeno O en *E. coli* y conduce al intercambio de GlcNAc por diN-acetilbacilosamina ya que la ligasa de antígeno O de *E. coli* solo reconoce los glucanos que contienen GlcNAc en el sitio de unión (es decir, el extremo reductor).

15 En una realización relacionada, el derivado de *pgl* es uno en el que uno o más genes para la biosíntesis de di-N-acetilbacilosamina, *pglD*, *E*, *F* y transferencia están inactivados y el gen *pglB* también está inactivo. Esta realización conduce al intercambio de GlcNAc por di-N-acetilbacilosamina. La incorporación de dicho derivado de *pgl* en *Salmonella* dio como resultado una presentación celular aumentada y la transferencia del heptasacárido modificado al núcleo del Lípido A en lugar de a los aceptores de polipéptidos (véase, la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Número 2012/0100177).

20 El al menos un N-glucano de *C. jejuni*, o un derivado de heptasacárido del mismo, puede ser cualquier N-glucano producido por cualquier operón *pgl* de *Campylobacter*, o un derivado funcional del mismo, siempre que el glucano sea inmunogénico, ya que provoca una respuesta inmunitaria específica para una especie *Campylobacter*.

25 En una realización específica, el glucano es el heptasacárido de fórmula (I) como se describe anteriormente, es decir, GaNAc- $\alpha$ 1,4-GalNAc- $\alpha$ 1,4-[Glc- $\beta$ -1,3]GalNAc- $\alpha$ 1,4-GaNAc- $\alpha$ 1,4-GalNAc- $\alpha$ 1,3-diNAcBac, en donde diNAcBac (también denominado di-N-acetilbacilosamina) es 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-glucopiranososa.

30 La realización alternativa, en la que un operón *pgl* donde los genes para la biosíntesis de di-N-acetilbacilosamina están inactivados, o en su mayoría o completamente eliminados, conduce a la síntesis de un heptasacárido derivado de fórmula (II), siendo GalNAc- $\alpha$ 1,4-GaNAc- $\alpha$ 1,4-[Glc- $\beta$ -1,3]GalNAc- $\alpha$ 1,4-GalNAc- $\alpha$ 1,4-GalNAc- $\alpha$ 1,3-GlcNAc.

35 En una determinada realización, el (los) N-glucano(s) o derivado(s) resultante(s) de al menos un operón *pgl*, o derivado del mismo, se puede(n) unir a al menos un polipéptido de *E. coli* homólogo o heterólogo que eventualmente se transferirá y presentará sobre la superficie celular. El polipéptido unido al N-glucano (derivado) puede ser cualquier tipo de polipéptido tal como un polipéptido puro (solo aminoácidos) o un polipéptido modificado postraduccionalmente, por ejemplo, un polipéptido unido a lípidos.

El (los) glucano(s) o derivado(s) del mismo, pueden purificarse a partir del hospedador natural en su forma de oligosacárido libre y después conjugarse químicamente a un polipéptido o vehículo lipídico.

40 En una realización específica, al menos un glucano o derivado del mismo resultante del al menos un operón *pgl* o derivado del mismo está unido al núcleo del Lípido A de *E. coli* o a un derivado funcionalmente equivalente del mismo. El núcleo de Lípido A de *E. coli* es una estructura de oligosacáridos que consiste, pero no se limita a hexosas, heptosas y ácido KDO (ácido 3-desoxi-D-manono-octulosónico) unido a través de dos glucosaminas a cadenas de acilo que anclan la estructura en la membrana externa de la bacteria. Un derivado funcionalmente equivalente del núcleo del Lípido A es uno capaz de aceptar uno o más glucanos o derivados de los mismos y presentarlos sobre la superficie celular. Se observa que en este caso el heptasacárido o derivado del mismo no está unido a N porque el núcleo del Lípido A de la estructura de *E. coli* no es un polipéptido.

50 Opcionalmente, al menos un heptasacárido o derivado del mismo ocupa el lugar de las cadenas laterales del antígeno O en LPS (lipopolisacárido). El núcleo interno y externo del Lípido A de *E. coli* permanece sin cambios mientras que la biosíntesis del antígeno O se elimina mediante la mutación de, por ejemplo, *wzy* y/u otras mutaciones. En determinadas realizaciones, al menos un heptasacárido, un derivado del mismo, o una mezcla de ambos, se expresa simultáneamente con las cadenas laterales del antígeno O en LPS dando como resultado un LPS heterogéneo que contiene tanto el antígeno O como el heptasacárido del hospedador.

55 Se prefiere y para usos médicos es muy importante que la cepa de *E. coli* de la invención no provoque efectos patógenos cuando se administra a un animal o ser humano en forma viva y/o inactivada. El experto conoce muchas formas de atenuar las especies virulentas de *E. coli* por mutación. Por ejemplo, mutaciones que atenúan la *E. coli* patógena (1) un CarAB mutante de la *Escherichia coli* O2 patógena aviar se atenúa y es eficaz como una vacuna oral viva contra la colibacilosis en pavos (Kwaga et al. Infect Immun. 62: 3766- 3772, 1994); (2) la mutación de la chaperona de ARN Hfq reduce significativamente la patogenicidad de VTEC, EAEC y UPEC en el modelo de nematodos (Bojer et al. Microbes Infect 14:1034-1039, 2012); (3) las mutaciones de genes dentro del sistema de transporte específico de fosfato (Pst) atenúan las cepas de *E. coli* (Buckles et al. Microbiology 152: 153-160, 2006; Daigle et al. Infect and Immun. 63: 4924-4927, 1995).

65 En una realización particular, la cepa de *E. coli* empleada en la composición de vacuna se atenúa por la inactivación

parcial o total de la expresión del antígeno O, por ejemplo, por mutación en el gen *wzy* (que da como resultado una polimerasa mutante del antígeno O) ( Baba y col., Mol. Syst. Biol. 2: 2006).

5 Las cepas de *E. coli* descritas anteriormente son altamente inmunogénicas y producen respuestas inmunitarias contra *Campylobacter*, tal como infecciones por *C. jejuni*. Además, una vez preparados, pueden propagarse fácilmente y producirse en masa. Se pueden administrar como vacunas muertas o vivas, vacunas vivas que permiten una propagación prolongada y un estímulo inmunitario sostenido en el hospedador, así como respuestas inmunitarias completas con o sin adyuvantes.

10 Por lo tanto, la presente solicitud también se refiere al uso médico de cepas de *E. coli* modificadas por ingeniería vivas o muertas para presentar uno o más N-glucanos de *Campylobacter*, o derivados de los mismos, en su superficie, en particular para preparar un medicamento, preferentemente una vacuna.

15 Preferentemente, el medicamento es útil para la prevención y/o el tratamiento de la infección y/o colonización por *C. jejuni*, preferentemente en ganado, más preferentemente en bovino y aves de corral, lo más preferentemente en aves de corral tales como pollos, pavos, gansos y patos.

20 De acuerdo con un aspecto, la presente solicitud proporciona una composición de vacuna que es una composición farmacéutica, alimento o pienso (aditivo) que comprende *E. coli* modificada por ingeniería viva o muerta para presentar uno o más N-glucanos de *Campylobacter*, o derivados de los mismos, en su superficie y un excipiente, diluyente o vehículo fisiológicamente aceptable. Opcionalmente, la composición de vacuna incluye o se administra con componentes adicionales, tal como, por ejemplo, un adyuvante. En otra alternativa, la composición de vacuna descrita en el presente documento está formulada para administración con otra composición de vacuna.

25 Los adyuvantes en general comprenden sustancias que estimulan la respuesta inmunitaria del hospedador de una manera no específica. Se conocen varios adyuvantes diferentes en la técnica. Ejemplos de adyuvantes son el adyuvante Completo e Incompleto de Freund, vitamina E, polímeros de bloque no iónicos y poliaminas tales como dextranulfato, carbopol y pirano. También son adecuadas las sustancias tensioactivas tales como Span, Tween, hexadecilamina, lisolecitina, metoxihexadecilglicerol y saponinas (p. ej., Quil A®). Además, con frecuencia se usan péptidos tales como muramildipéptidos, dimetilglicina y tuftsina. Junto a estos adyuvantes, pueden usarse ventajosamente complejos inmunoestimulantes (ISCOMS), aceite mineral, p. Bayol® o Markol®, aceites vegetales o emulsiones de los mismos y Diluvac® Forte.

35 Opcionalmente, la vacuna se mezcla con uno o más estabilizantes, por ejemplo, para proteger los componentes propensos a la degradación de ser degradados, para potenciar la vida útil de la vacuna o para mejorar la eficacia de liofilización. Los estabilizadores útiles son, por ejemplo, SPGA (Bovarnik et al. J. Bacteriology 59: 509, 1950), leche desnatada, gelatina, seroalbúmina bovina, carbohidratos por ejemplo, sorbitol manitol, trehalosa, almidón, sacarosa, dextrano o glucosa, proteínas tales como albúmina o caseína o productos de degradación de los mismos, y tampones, tales como fosfatos de metales alcalinos.

40 La composición de vacuna puede estar en forma de, por ejemplo, una solución, suspensión o una composición liofilizada adecuada para la reconstitución antes de la administración.

45 La liofilización es un método eficaz para la conservación de la composición de vacuna. El material liofilizado puede almacenarse estable durante muchos años. Las temperaturas de almacenamiento para el material liofilizado pueden estar por encima de cero grados, sin ser perjudiciales para el material. La liofilización se puede realizar de acuerdo con todos los procedimientos convencionales de liofilización bien conocidos.

#### Método de inmunización

50 La presente solicitud proporciona un método para inmunizar a un animal contra la infección por *Campylobacter*. El método comprende la etapa de administrar al animal una composición de vacuna que comprende *E. coli* recombinante que se ha modificado por ingeniería para presentar al menos un N-glucano de *Campylobacter*, o un derivado de heptasacárido del mismo, en su superficie, como se describe anteriormente.

55 La campilobacteriosis es la enfermedad causada por la infección con *Campylobacter*. Los síntomas más comunes son diarrea, dolor abdominal, fiebre, dolor de cabeza, náuseas y vómitos. Por lo general, estos síntomas solo duran entre tres y seis días. Sin embargo, excepcionalmente, la infección por *Campylobacter* puede causar complicaciones duraderas tales como, por ejemplo, síndrome de Guillain-Barré (GBS), artritis y bacteriemia. En consecuencia, las vacunas descritas en el presente documento son útiles para inmunizar animales, incluidos seres humanos y ganado, tales como el pollo, que es una de las principales causas de enfermedades transmitidas por los alimentos. En consecuencia, la presente solicitud proporciona además un método para prevenir o minimizar el efecto de una enfermedad o trastorno causado por la infección por *Campylobacter*. En realizaciones específicas, la enfermedad o trastorno causado por la infección por *Campylobacter* es la campilobacteriosis, síndrome de Guillain-Barré (GBS) y/o artritis y/o bacteriemia, aunque otras especies de *Campylobacter* se han relacionado con otras enfermedades tales como periodontitis y abortos.

En la realización en la que la composición de vacuna se usa para vacunar al ganado, existen varias rutas para la administración de la composición que pueden ser convenientes para la vacunación masiva. La administración se puede realizar a través de agua potable, alimentos o piensos, pulverización/nebulización (p. ej., pollos de un día en cajas de entrega, o animales en un ambiente alojado, tal como un gallinero), colirio, transfusión y escarificación (vía cutánea en la banda del ala o en la pata), inyección (p. ej., intramuscular o subcutánea) o administración *in-ovo*.

Opcionalmente, los animales se tratan con una dosis inicial de composición de vacuna seguida de una o más dosis de refuerzo a intervalos de tiempo apropiados. Un trabajador experto en la técnica identificaría fácilmente la cantidad de dosis y la pauta de dosificación apropiadas para una aplicación particular. En el ejemplo actual, se hace una vacunación inicial en aves de 1 semana de edad con  $1 \times 10^8$  células de *E. coli* vivas o fijadas con formalina (o con cualquier otra vacuna glucoconjugada, es decir, el N-glucano de *C. jejuni* vinculado a ToxC). Se realiza un refuerzo con la misma cantidad de células bacterianas (o proteínas) dos semanas después. La exposición con *Campylobacter* con frecuencia se realiza después de otra semana y las aves se sacrifican 1 semana después de la exposición (como se describe a continuación).

Para obtener una mejor comprensión de la invención descrita en el presente documento, se expone el siguiente ejemplo. Debe entenderse que estos ejemplos son solo para fines ilustrativos. Por lo tanto, no deberían limitar el alcance de esta invención de ninguna manera.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Preparación de la vacuna

#### *N-glucano de Campylobacter jejuni fusionado a una proteína*

Expresión y purificación de la proteína ToxC-GT glucosilada con el N-glucano de *C. jejuni*: La proteína ToxC-GT glucosilada con el N-glucano de *C. jejuni* se expresó en *E. coli* BL21 que expresa el operón *pgl* de *C. jejuni* y se purificó por cromatografía de Ni-NTA como se describe en la solicitud PCT internacional publicada número WO 2012/027850. La proteína se purificó adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico usando un sistema AEKTA FPLC equipado con una columna de intercambio aniónico MonoQ de 2,5 ml. La fase móvil era un tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 con un gradiente de NaCl ajustado a NaCl 0-500 mM en 30 volúmenes de columna. Las fracciones que contenían el glucoconjugado se analizaron mediante SDS PAGE al 12,5 %, se pasaron dos veces a través de 1 g de absorbente de eliminación de lípidos (LRA, Supelco), se dializaron contra PBS estéril y se ajustaron a una concentración de proteína de 0,5 mg/ml antes de su uso. La concentración de proteínas se determinó usando metodologías convencionales (prueba de Bradford) usando concentraciones crecientes de BSA en PBS para crear una curva patrón.

#### *N-glucano de Campylobacter jejuni fusionado con la estructura del núcleo del Lípido A de E. coli: Preparación de la vacuna de E. coli*

Las células de *E. coli* que expresan el heptasacárido de *C. jejuni* se describieron previamente (Nothhaft et al. Molecular and Cellular Proteomics 11: 1203-1219). Las células se cultivaron en caldo líquido (2 x caldo YT (extracto de levadura y caldo de triptona)) a 37 °C con agitación vigorosa (220 rpm) hasta que se alcanzó la fase estacionaria. Las células se cosecharon por centrifugación y se lavaron dos veces con PBS estéril. La cantidad de células se determinó colocando en placas diluciones en serie de un conjunto de suspensiones de células a una  $DO_{600}$  de 2,0 y se usó directamente o fijadas con formalina.

Las células de un cultivo nocturno de *E. coli* que expresaban el locus *pgl* de *C. jejuni* se recogieron por centrifugación y se lavaron dos veces con tampón PBS estéril como se describe en Nothhaft et al. Mol. Cell. Proteomics 11: 1203-1219, 2012. Después, 1 ml de células, ajustado a una  $DO_{600}$  con PBS estéril a 1,0 se centrifugaron y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de tampón de muestra Laemmli 1 vez y se calentaron durante 10 minutos a 95 °C. Se añadió proteinasa K a una concentración final de 200  $\mu$ g/ml y la muestra se incubó a 60 °C durante 1 h seguido de 5 minutos de incubación en hielo y centrifugación durante 15 minutos. Las alícuotas del sobrenadante se separaron mediante SDS-PAGE convencional al 12,5 %. El heptasacárido fusionado con el núcleo del Lípido A se visualizó mediante Transferencia Western como se describe (Nothhaft et al. Molecular and Cellular Proteomics 11: 1203-1219) usando el antisuero hR6 específico de N-glucano de *Campylobacter jejuni* como primario y anti conejo conjugado con fosfatasa alcalina como un anticuerpo secundario (Figura 1). El carril 1 muestra lisados celulares tratados con proteinasa K a partir de la polimerasa mutante del antígeno O de *E. coli* que expresa el operón de glucosilación de proteínas de *C. jejuni* con un gen *pglB* inactivo (*pACYC184pglB<sub>mut</sub>*). La formación de la fusión de Lípido A-N-glucano está marcada por una flecha. El carril 2 muestra los lisados celulares tratados con proteinasa K del control de vector vacío de polimerasa mutante del antígeno O de *E. coli* (*pACYC184*). Los marcadores de peso molecular (PM en kilodaltons, kDa) se indican a la izquierda. Las bandas de mayor peso molecular son componentes de *E. coli* que tienen reacción cruzada en ambas preparaciones.

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) del componente Lípido A-N-glucano purificado. Los

glucolípidos se prepararon a partir de ocho litros de un cultivo de *E. coli* con polimerasa mutante del antígeno O de una  $DO_{600} = 1,0$  que expresaba el operón de glucosilación de proteínas de *C. jejuni* con un gen *pglB* inactivo (pACYC184pglB<sub>mut</sub>). El LPS se extrajo con agua con fenol, se dializó, se trató con AcOH para precipitar ácidos nucleicos, se dializó, se secó, se hidrolizó con AcOH al 2 % y se separó en un Biogel P6. Las fracciones se analizaron mediante RNM. Las fracciones que contenían señales de N-glucano de *C. jejuni* se combinaron y se separaron en una columna Hitrap de intercambio aniónico usando un gradiente de NaCl. Las fracciones se analizaron mediante RNM. Las fracciones que contenían señales de N-glucano de *C. jejuni* se desalaron por cromatografía Sephadex G-15. Las conexiones se confirmaron mediante espectroscopía de efecto Nuclear Overhauser (NOESY por sus siglas en inglés) y espectroscopía de correlación de enlace múltiple heteronuclear (HMBC por sus siglas en inglés). Se pudieron observar cambios químicos específicos del N-glucano de *C. jejuni*, todos los enlaces 1-4 de los componentes de N-glucano de *C. jejuni* dieron NOE transglucosídicos 1:4 y 1:6 y las asignaciones coincidieron con los datos publicados previamente (Figura 2 y Tabla 1, y Nothaft et al., Molecular and Cellular Proteomics 11: 1203-1219, 2012). El derivado del N-glucano de *C. jejuni* con un GlcNAc en lugar de diNacBac como azúcar final reductor (Figura 2) se unió a través de O-7 del *L-glicero-D-mano-heptosa* del núcleo del Lípido A. Todas las señales de Hep (L) se encontraron mediante el análisis del montón principal de correlaciones y asignaciones para la parte del núcleo del Lípido A de *E. coli* y estaban de acuerdo con los datos publicados (Muller-Loennies et al. Journal of Biological Chemistry 278:,34090-34101, 2003, y la Tabla 1).

Tabla 1: Cambios químicos

		1	2	3	4	5	6	7
$\alpha$ -GalNAc A	$\delta_H$	5,47	4,27	3,23	4,07	3,92	3,70; 3,75	
	$\delta_C$	98,2	51,0	68,0	77,6	72,7	60,8	
$\alpha$ -GalNAc C	$\delta_H$	5,13	4,29	4,19	4,13	4,49	3,66; 3,78	
	$\delta_C$	98,2	51,5	67,8	77,4	71,6	59,9	
$\alpha$ -GalNAc D	$\delta_H$	5,07	4,23	4,04	4,06	4,39	3,70; 3,73	
	$\delta_C$	99,3	51,4	68,4	69,6	71,9	61,8	
$\alpha$ -GalNAc E	$\delta_H$	5,04	4,30	4,15	4,13	4,43	3,65; 3,68	
	$\delta_C$	99,3	51,5	67,8	77,4	72,3	60,5	
$\alpha$ -GalNAc F	$\delta_H$	5,02	4,53	4,17	4,36	4,45	3,56; 3,64	
	$\delta_C$	99,5	50,5	67,8	75,6	72,3	60,3	
$\beta$ -Glc G	$\delta_H$	4,60	3,32	3,48	3,38	3,43	3,71; 3,92	
	$\delta_C$		74,1	76,8	70,9	76,9	61,8	
$\alpha$ -GlcNAc N	$\delta_H$	4,54	3,82	3,74	3,68	3,45	3,75; 3,92	
	$\delta_C$		55,3	79,6	72,3	76,9	61,9	
		1	2	3	4	5	6	7
$\alpha$ -Hep L	$\delta_H$	4,89	3,97	3,80	3,86	3,57	4,16	3,80; 4,01
	$\delta_C$	100,4	71,1	72,0	67,3	72,8	68,4	73,2
$\alpha$ -Glc K	$\delta_H$	5,18	3,61	3,75	3,51	4,15	3,67; 3,92	
	$\delta_C$	97,1	72,4	74,6	70,4	71,2	65,9	
$\alpha$ -Glc I	$\delta_H$	5,47	3,68	3,85	3,54	4,08	3,82; 3,90	
	$\delta_C$	98,2	76,8	72,1	70,3	72,6	61,2	

Análisis de Clasificación de Células Activadas por Fluorescencia (FACS por sus siglas en inglés). En primer lugar, se sedimentó 1 ml de células de *E. coli* de  $DO_{600} = 1,0$  por centrifugación y se resuspendieron en 1 ml de solución de bloqueo (PBS, leche desnatada al 5 %). Las células se marcaron con sondas con antisuero hR6 específico de N-glucano de *C. jejuni* N-glucano y antisuero anti conejo conjugado con Alexa Fluor-546 y se analizaron mediante FACS. Los datos de FACS se procesaron con el software FACS Diva. Se utilizó DAPI contratinción para identificar y seleccionar células intactas. El análisis de una población de  $2 \times 10^4$  células mostró un aumento significativo en la fluorescencia de las células de *E. coli* que expresan el N-glucano de *C. jejuni* en comparación con las células de control de vector vacío de *E. coli* (pACYC184) confirmando que el N-glucano de *C. jejuni* se presenta en la superficie celular (Figura 3). La apariencia del máximo y la geometría del máximo muestran que cada célula de *E. coli* presentó una cantidad comparable de N-glucano de *C. jejuni* en su superficie.

## Ejemplo 2: Vacunación y Exposición

La exposición de los pollos a inyecciones del glucoconjugado ToxC-GT (Figura 4D) o dosis orales de cepas muertas (Figura 4A) y vivas (Figura 4B y C) de la *E. coli* modificada descrita en el Ejemplo 1, dio como resultado disminuciones significativas en el contenido cecal de *Campylobacter* en pollos expuestos. Se llevaron a cabo tres experimentos de vacunación con pollos utilizando *E. coli* que expresa el heptasacárido de *C. jejuni* para demostrar una mayor inmunidad de los pollitos a *Campylobacter*. Los resultados de estos experimentos se muestran en las Figuras 4A, B y C.

En el primer experimento de vacunación de pollos, se realizó una exposición con tres grupos de pollitos. El grupo de PBS control contenía cuatro pollos, mientras que los grupos 2 y 3 contenían cada uno ocho pollos. Las condiciones para los grupos 1 y 2 se muestran en la Tabla 2. El grupo 3 se sometió a alimentación forzada por vía oral con células muertas de *E. coli* que expresaban la superficie el N-glucano heptasacárido de *C. jejuni* los días 7 y 21. Las aves se

expusieron posteriormente de la siguiente manera: El grupo 1 (control negativo) se sometió a alimentación forzada por vía oral con 300 µl de PBS; los grupos 2 y 3 se sometieron a alimentación forzada por vía oral con 300 µl de PBS que contenía 10<sup>2</sup> células de *C. jejuni* 81-176. En el día 35, los pollos se sacrificaron y los niveles de colonización se determinaron colocando en placas diluciones en serie de los contenidos cecales de cada ave en agar Karmali selectivo. Las unidades formadoras de colonias (ufc) se determinaron después de la incubación de las placas durante 48 horas en condiciones microaerobias. Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 4A, con los niveles de colonización mostrados como ufc por gramo de contenido cecal. Las barras horizontales representan la mediana para cada grupo. Específicamente, los resultados muestran que la vacuna basada en N-glucano reduce la colonización por *Campylobacter* en pollos. No se detectaron unidades formadoras de colonias en las placas del grupo 1 (PBS control), mientras que las aves del grupo 2 fueron colonizadas con un promedio de aproximadamente 10<sup>10</sup> células de *Campylobacter* por gramo de contenido cecal. La colonización se redujo en el grupo 3 en aproximadamente 4 en escala logarítmica.

En el segundo experimento de vacunación de pollos, se realizó una exposición con tres grupos de pollitos. Los grupos 1 y 2 contenían 6 pollos, el grupo 3 contenía 8 pollos. Las condiciones para los grupos 1 y 2 se muestran en la Tabla 2. El grupo 3 se sometió a alimentación forzada por vía oral con células vivas de *E. coli* que expresaban el N-glucano heptasacárido de *C. jejuni* los días 7 y 21. Las concentraciones de exposición y los niveles de colonización se determinaron como se describe en el primer experimento. Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 4B, con los niveles de colonización mostrados como ufc por gramo de contenido cecal. Las barras horizontales representan la mediana para cada grupo. Los resultados muestran que la vacuna basada en N-glucano reduce la colonización por *Campylobacter* en pollos. No se detectaron unidades formadoras de colonias en las placas del grupo 1 (PBS control), mientras que las aves del grupo 2 fueron colonizadas con un promedio de aproximadamente 10<sup>10</sup> células de *Campylobacter* por gramo de contenido cecal. La colonización no fue detectable en ninguna de las aves del grupo 3.

En el tercer experimento mostrado en la Figura 4C, se realizó una exposición con 4 grupos de pollitos. El grupo 1 contenía 6 pollos, los grupos 2, 3 y 4 contenían 8 pollos. Las condiciones para los grupos 1 y 2 se muestran en la Tabla 2. Los grupos 3 y 4 se sometieron a alimentación forzada por vía oral el día 7 y el día 21. Las aves del grupo 3 recibieron *E. coli* viva que no expresaba el N-glucano en la superficie, mientras que las aves del grupo 4 recibieron células vivas de *E. coli* que expresaban el N-glucano heptasacárido de *C. jejuni* en sus superficies. Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 4C, con los niveles de colonización mostrados como ufc por gramo de contenido cecal. Las barras horizontales representan la mediana para cada grupo. Los resultados muestran que la vacuna basada en N-glucano reduce repetidamente la colonización por *Campylobacter* en pollos y que las células de *E. coli* que no expresan el N-glucano no tienen un efecto probiótico ya que los niveles de colonización por *Campylobacter* después de la exposición fueron similares a las aves del grupo 2.

En el cuarto experimento mostrado en la Figura 4D, se realizó una exposición con seis grupos de pollitos, cada grupo contenía ocho pollos. Las condiciones de cada grupo se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Grupos de exposición

Grupo	Condición
1	Control negativo: sin presentación a antígeno y sin exposición
2	Control positivo: sin presentación a antígeno
3	Dosis única IM de antígeno de glucoproteína el día 21
4	Dosis única IM de antígeno de glucoproteína el día 7
5	Dosis de antígeno de glucoproteína IM los días 7 y 21
6	Alimentación forzada oral de células vivas de <i>E. coli</i> que expresan en superficie N-glucano heptasacárido de <i>C. jejuni</i> los días 7 y 21

De forma similar a los experimentos anteriores, el día 1, se realizaron hisopos cloacales en el 10 % de las aves (5 seleccionadas al azar) y se colocaron en placas en agar Karmali selectivo para confirmar que las aves no estaban colonizadas con *C. jejuni*. No se observaron colonias de *Campylobacter* después de 48 h de incubación en condiciones microaerobias a 37 °C.

De forma similar a los experimentos anteriores, el día 7, se recogieron hasta 50 µl de sangre (sangrado previo) de cada ave. Los sueros se prepararon de la siguiente manera: Después de mantener las muestras de sangre a 37 °C durante 1 hora seguido de centrifugación (5 min, 18.000xg, 4 °C), los sobrenadantes (sueros) se transfirieron a un tubo nuevo y se añadió glicerol a una concentración final del 10 %. Los sueros se almacenaron a -20 °C hasta su uso posterior. El tratamiento antimicrobiano posterior se realizó de la siguiente manera: El grupo 1 (PBS control) y el 2 (control de colonización) recibieron 300 µl de PBS con Freund completo el día 7 y la misma cantidad pero con adyuvante incompleto de Freund el día 21 (150 µl de PBS + 150 µl de adyuvante) inyectados en dos sitios en el tórax con 150 µl de formulación de vacuna (sin el glucoconjugado) por sitio. El grupo 3 no recibió antígeno el día 7, pero recibió una dosis de ToxC-GT glucosilada con el N-glucano de *C. jejuni* (100 µg de proteína en 150 µl de PBS + 150 µl de adyuvante completo de Freund) el día 21; El grupo 4 recibió una dosis de ToxC-GT glucosilada con el N-glucano de *C. jejuni* en adyuvante completo de Freund el día 7 y sin antígeno el día 21. El grupo 5 recibió 2 dosis (el día 7 con Freund completo y el día 21 con Freund incompleto como adyuvante) de 100 µg de ToxC-GT con el N-glucano de *C.*

*jejuni* inyectado en la pata (150 µl de formulación de vacuna en cada pata) y el grupo 6 se sometió a alimentación forzada por vía oral con 2 dosis (el día 7 y el día 21) con 300 µl de PBS que contenía  $10^8$  células vivas de *E. coli* que expresaban el N-glucano de *C. jejuni* en su superficie.

5 De forma similar a los experimentos anteriores, el día 28, se extrajeron 100 µl de sangre de cada ave (sangrado de prueba) de los grupos 1-6 y los sueros se prepararon y almacenaron como se describe anteriormente. Las aves se expusieron posteriormente de la siguiente manera: El grupo 1 (control negativo) se sometió a alimentación forzada por vía oral con 300 µl de PBS; los grupos 2 - 6 se sometieron a alimentación forzada por vía oral con 300 µl de PBS que contenía  $10^2$  células de *C. jejuni* 81-176. En el día 34, se sacrificaron los pollos, se extrajo sangre (sangrado final) mediante punción cardíaca y se prepararon y almacenaron sueros como se describe anteriormente. Los niveles de colonización se determinaron colocando en placas diluciones en serie del contenido cecal de cada ave en agar Karmali selectivo. Las unidades formadoras de colonias (ufc) se determinaron después de la incubación de las placas durante 48 horas en condiciones microaerobias.

15 Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 4D, con los niveles de colonización mostrados como ufc por gramo de contenido cecal. Las barras horizontales representan la mediana para cada grupo. Específicamente, los resultados muestran nuevamente que las vacunas basadas en N-glucano reducen la colonización por *Campylobacter* en pollos y que las vacunas compuestas de células de *E. coli* vivas que expresan el N-glucano de *C. jejuni* en su superficie funcionan mejor que las vacunas de glucoproteínas en pollos (véase a continuación).

20 No se detectaron unidades formadoras de colonias en las placas del grupo 1 (PBS control), mientras que las aves del grupo 2 fueron colonizadas con un promedio de aproximadamente  $10^{10}$  células de *Campylobacter* por gramo de contenido cecal. La colonización se redujo en el grupo 3, el grupo 4 y el grupo 5 con un promedio de ufc de  $2,2 \times 10^4$ ,  $6,8 \times 10^5$  y  $5,5 \times 10^4$  por gramo de contenido cecal, respectivamente.

25 La colonización en el grupo 6 fue casi eliminada con un promedio de 100 ufc por gramo de contenido cecal. Además, 5 de las 8 aves no mostraron signos de colonización por *C. jejuni* en absoluto. Esto indica claramente que el tratamiento con la vacuna de N-glucano de *C. jejuni* basada en proteínas dio como resultado una colonización reducida después de la exposición con *Campylobacter* independientemente del momento de inyección y el sitio de aplicación de la vacuna y que la vacunación oral con células vivas de *E. coli* que expresaban el heptasacárido en su superficie eliminó casi por completo la colonización por *Campylobacter*. Además, la autolimitación de la cepa de vacuna de *E. coli* se demostró ya que no se observó *E. coli* en los contenidos cecales de este grupo cuando se colocaron en placas sobre LB Kan-Cm selectivo. La eliminación de la cepa de vacuna de *E. coli* viva de los pollos se observó en todos los experimentos.

35 Se realizaron pruebas ELISA para analizar la respuesta inmunitaria específica de N-glucano, específicamente la respuesta de anticuerpos específicos de N-glucano de IgY (IgG) de pollo. El oligosacárido libre (fOS por sus siglas en inglés) de *C. jejuni* se preparó como se describe (Dwivedi et al. Biopolymers, 99: 772-7830, 2013) y se acopló a BSA mediante aminación reductora como se describe (Nothhaft et al. Mol. Cell. Proteomics 11: 1203-1219, 2012). La formación del conjugado BSA-Cj-N-glucano se confirmó mediante Transferencia Western usando el antisuero R1-4. Después de ajustar la concentración a 1 mg/ml con PBS, el glucoconjugado se almacenó a 4 °C hasta su uso posterior. Después, se revistieron placas Maxisorb de 96 pocillos con 500 ng de conjugado BSA-Cj-N-glucano durante la noche (18 horas) a 4 °C. Después de eliminar el antígeno no unido, la placa se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente con 100 µl de PBS-T, leche desnatada al 5% con agitación. Después de descartar la solución de bloqueo, se añadieron 100 µl de las soluciones de anticuerpos y se incubaron durante 1 hora como se describe anteriormente. Las soluciones de anticuerpos estaban compuestas de antisuero específico de N-glucano diluido 1:3000 en PBS-T, leche desnatada al 1 % o suero de pollo (preparado a partir del 2º sangrado (es decir, día 28) de los experimentos de vacunación) y diluido 1:50 en PBS- T, leche desnatada al 1 %. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente como se describe y cada pocillo se lavó 3 veces durante 5 minutos con 100 µl de PBS-T. Después de la adición de 100 µl de la solución de anticuerpo secundario (ya sea anti-AP de conejo (1:500) para el R1-4 control, o anti-IgY de pollo (1:500) para las muestras experimentales y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, las soluciones de anticuerpos secundarios se descartaron y los pocillos se lavaron 4 veces 5 minutos con 100 µl de PBS-T. Después de la última etapa de lavado, la solución de lavado restante se eliminó por completo de cada pocillo y la placa se desarrolló usando PNPP como sustrato. La inmunorreactividad en cada suero se determinó después de explorar la placa a DO<sub>405</sub> en un lector de placas.

60 Los anticuerpos específicos del N-glucano de *C.jejuni* estaban presentes (Figura 5A) en sueros preparados a partir de sangre extraída el día 28 antes de la exposición con *Campylobacter* de aves vacunadas con 1 dosis de ToxC-GT con glucano el día 21 (tórax, IM) (grupo de muestra 3), 2 dosis de ToxC-GT con glucano los días 7 y 21 (tórax, IM) (grupo de muestra 4), 2 dosis de ToxC-GT con glucano los días 7 y 21 (pata) (grupo de muestra 5), y 2 dosis de *E. coli* muerta (grupo de muestra 6). La respuesta de anticuerpos (expresada como DO<sub>405</sub>) fue mayor en el grupo de muestra 6 y la mayoría de los pollos en este grupo de muestra no mostraron colonización. La respuesta de anticuerpos en los grupos de control de colonización positivo y negativo (grupos de muestra 1 y 2) estaba por debajo del límite de detección. Las barras horizontales representan la mediana para cada grupo.

65 Los anticuerpos específicos de N-glucano de *C.jejuni* estaban presentes (Figura 5B) en sueros preparados a partir de

5 sangre extraída el día 28 antes de la exposición con *Campylobacter* de aves vacunadas con *E. coli* viva que presentaba el N-glucano en la superficie (grupo de muestra 4). Esto corresponde al experimento de vacuna número 3 que se muestra en la Figura 4C. Las respuestas de anticuerpos (expresadas como DO<sub>405</sub>) en aves vacunadas con *E. coli* sin glucano vivas (grupo de muestra 3) y los grupos de control de colonización positivo y negativo (grupos de muestra 1 y 2) estaban por debajo del límite de detección. Las barras horizontales representan la mediana para cada grupo.

Se observó lo siguiente:

10 1) alimentar a los pollitos con las células muertas de *E. coli* que expresan el heptasacárido de *C. jejuni* seguido de una exposición con *C. jejuni* causó una reducción de aproximadamente 4 en escala logarítmica en la colonización por *C. jejuni* del intestino de los pollos (Figura 4A); y

15 2) alimentar a los pollitos con las células vivas de *E. coli* que expresan el heptasacárido de *C. jejuni* seguido de una exposición con *C. jejuni* provocó de forma consistente una reducción mayor de 7 en escala logarítmica en la colonización por *C. jejuni* en el intestino de los pollos (Figuras 4B, C y D).

20 Es evidente que las vacunas que comprenden células de *E. coli* vivas o muertas que expresan el heptasacárido de *C. jejuni* son capaces de aumentar significativamente la inmunidad de los pollitos para la exposición posterior por *C. jejuni*.

#### **Experimento de control**

25 Para demostrar que la disminución en la colonización por *C. jejuni* es el resultado de la vacunación con *E. coli* viva que expresa el heptasacárido de *C. jejuni* y no un efecto probiótico debido a la exposición a células de *E. coli* vivas, el contenido cecal de aves que se vacunaron con las cepas de *E. coli* vivas también se colocaron en placas sobre medios selectivos de *E. coli* como se menciona anteriormente. No se detectaron colonias de *E. coli* en los pollos vacunados con *E. coli* viva, lo que indica que la *E. coli* se aclaró antes de la finalización del experimento.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de vacuna para su uso en la vacunación de pollos contra *Campylobacter*, comprendiendo la composición: bacterias modificadas por ingeniería para expresar al menos un N-glucano de *Campylobacter* en su superficie celular; y uno o más de un diluyente, excipiente, adyuvante o vehículo fisiológicamente aceptable, en donde la bacteria es *Escherichia coli*, y en donde la bacteria modificada por ingeniería expresa el N-glucano en la superficie como una fusión de núcleo de Lípido A.
- 10 2. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el *Campylobacter* es *C. jejuni*.
3. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición comprende *E. coli* modificada por ingeniería, viva, o *E. coli* modificada por ingeniería, atenuada, viva.
- 15 4. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición comprende células de *E. coli* modificadas por ingeniería inactivadas o destruidas.
- 20 5. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la composición comprende una suspensión de bacterias modificadas por ingeniería en un diluyente tamponado adecuado, tal como solución salina tamponada con fosfato.
6. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende adicionalmente un adyuvante, estabilizante o conservante.
- 25 7. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la composición se formula para administración oral.
8. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la composición de vacuna se formula para pulverizarse o añadirse al pienso, aditivo para piensos o agua del ganado.
- 30 9. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, formulada para la administración a aves de corral, preferentemente pollos.
- 35 10. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en donde las bacterias modificadas por ingeniería expresan el N-glucano de *C. jejuni* en su superficie.
11. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición de vacuna se administra por pulverización o en una composición farmacéutica, alimento, un aditivo para piensos o agua potable.
- 40 12. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la composición farmacéutica se formula para administración por administración oral.
- 45 13. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el glucano es un heptasacárido o derivado de hexasacárido de un heptasacárido, que carece de una ramificación de glucosa.
- 50 14. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el glucano es el heptasacárido de fórmula (I), GalNAc- $\alpha$ 1,4-GalNAc- $\alpha$ 1,4-[Glc- $\beta$ -1,3]GalNAc- $\alpha$ 1,4-GalNAc- $\alpha$ 1,4-GalNAc- $\alpha$ 1,3-diNAcBac, en donde di-NAcBac es 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-glucopiranososa, o el heptasacárido derivado de fórmula (II), GalNAc- $\alpha$ 1,4-GalNAc- $\alpha$ 1,4-[Glc- $\beta$ -1,3]GalNAc- $\alpha$ 1,4-GalNAc- $\alpha$ 1,4-GalNAc- $\alpha$ 1,3-GlcNAc.

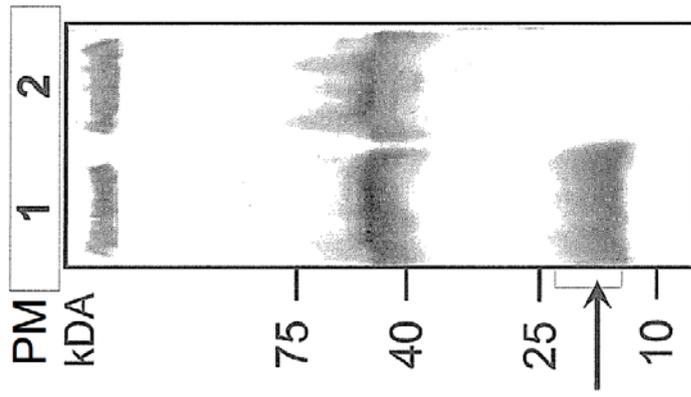
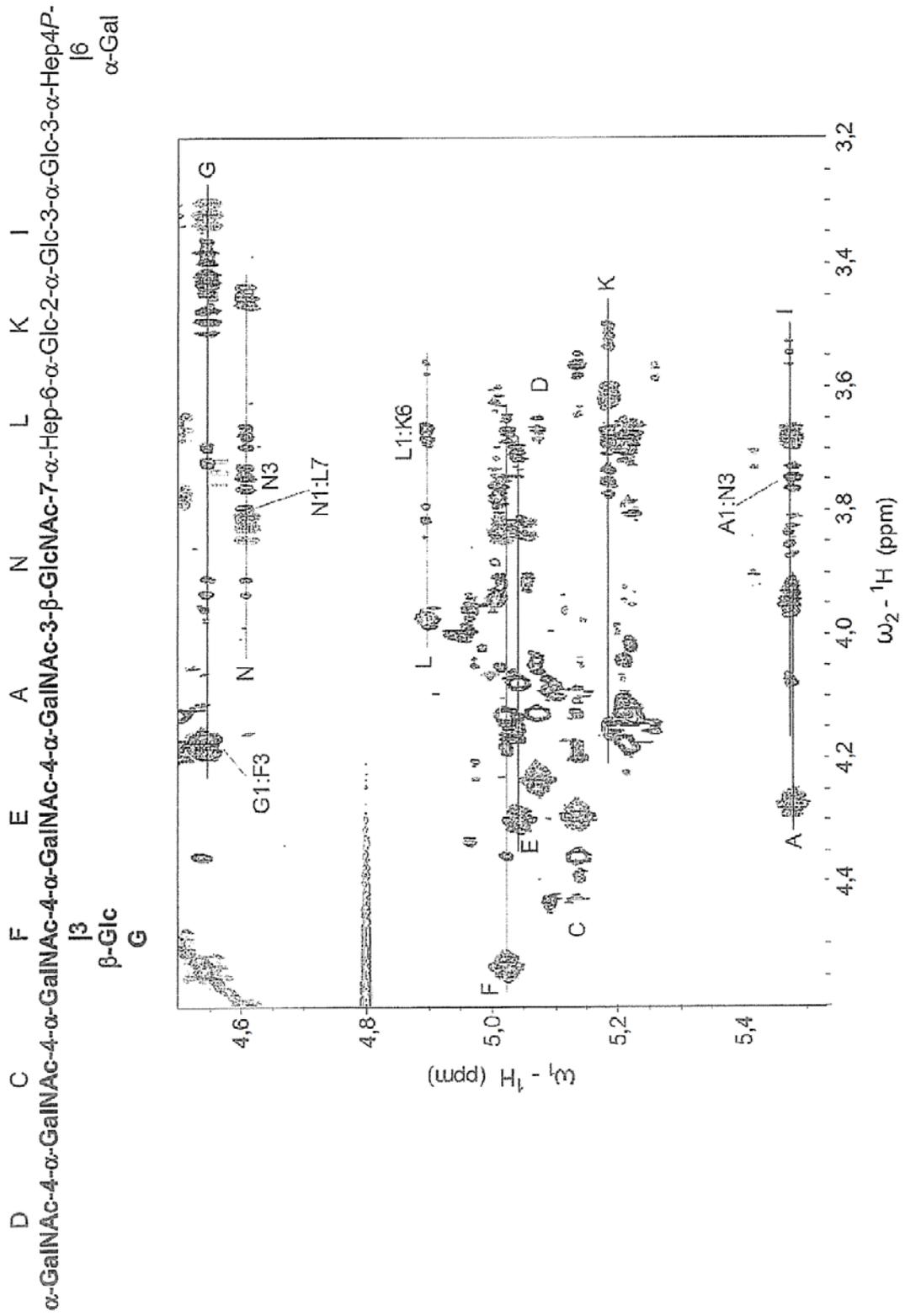


Figura 1

Figura 2



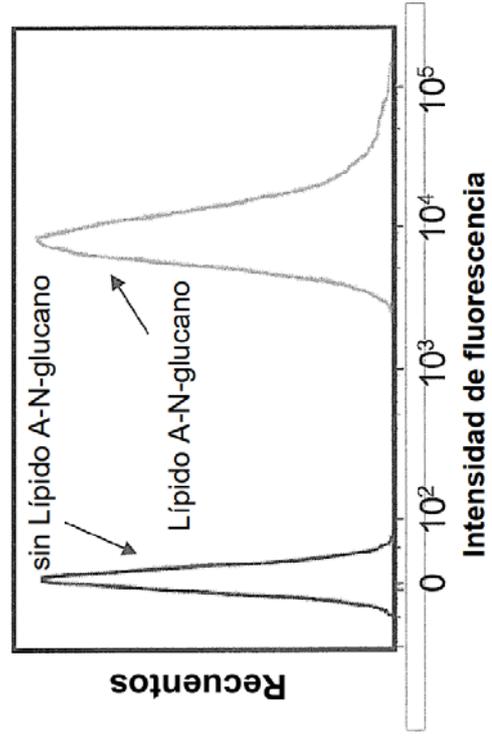


Figura 3

Figura 4A

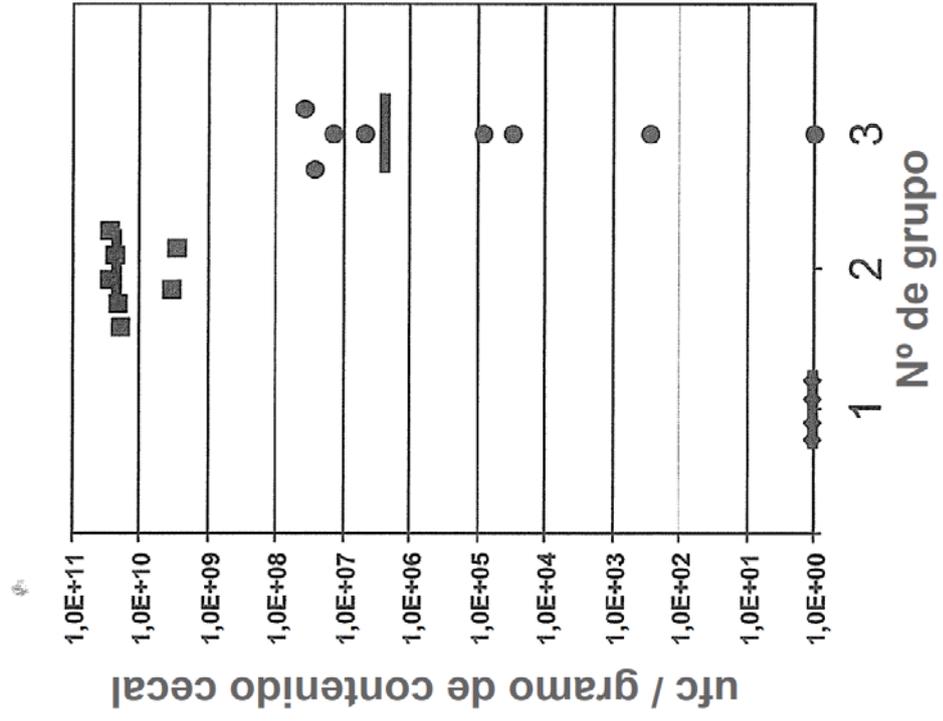




Figura 4C

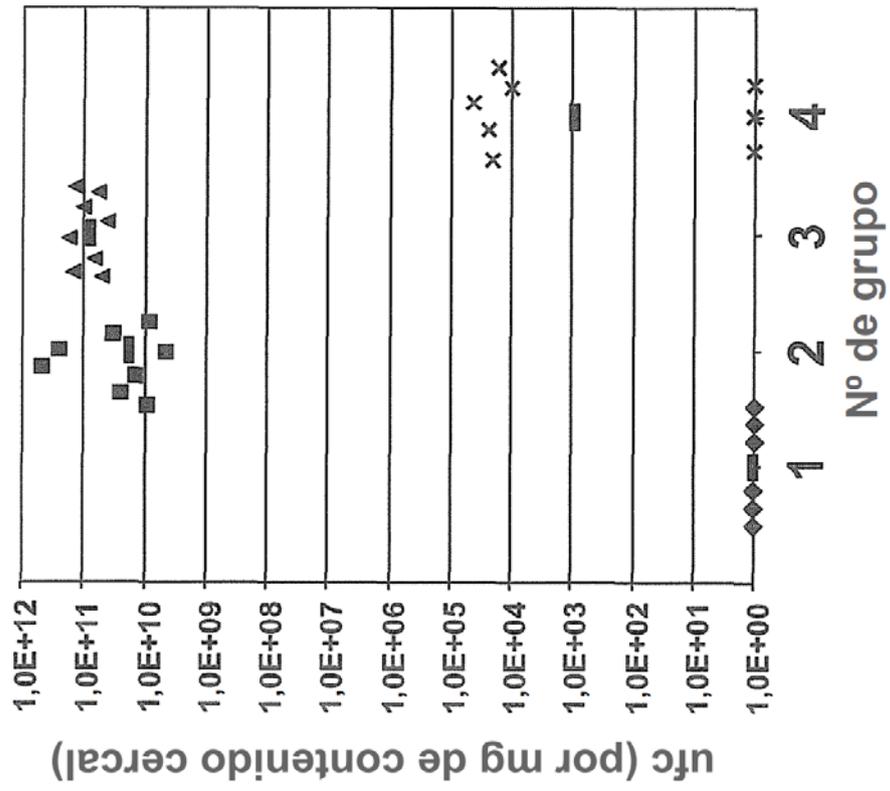
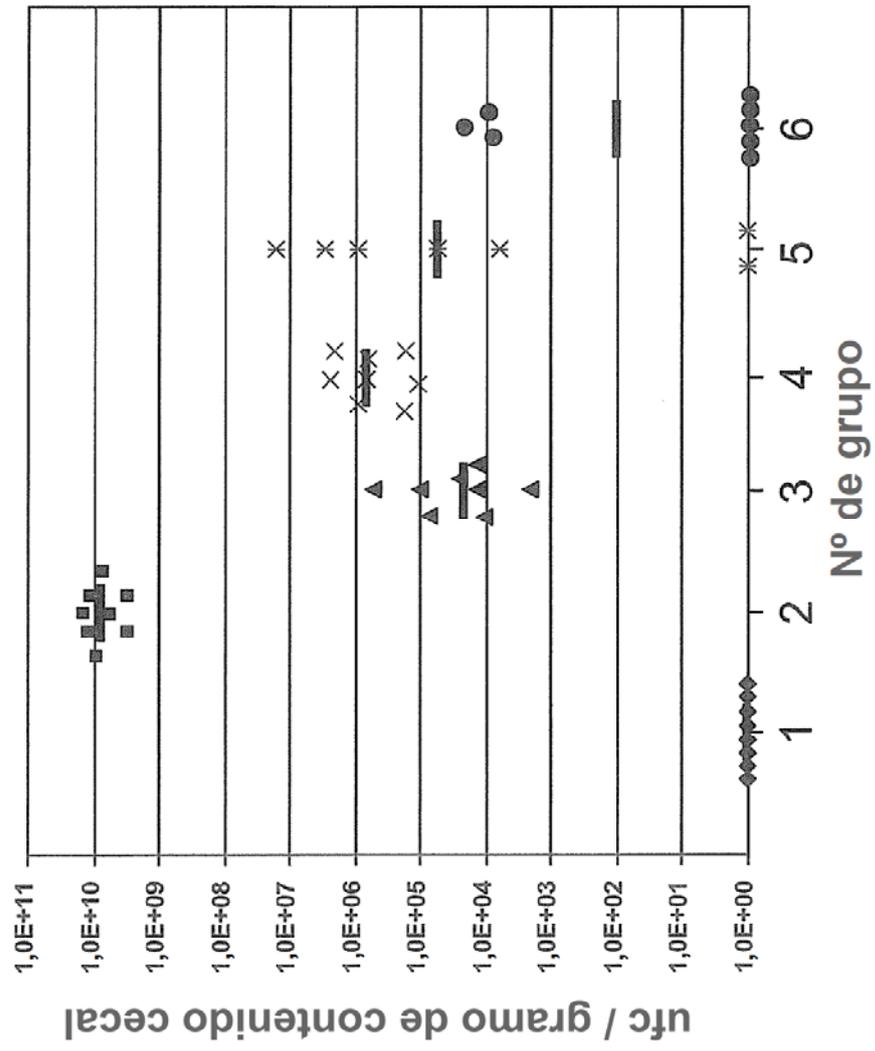


Figura 4D



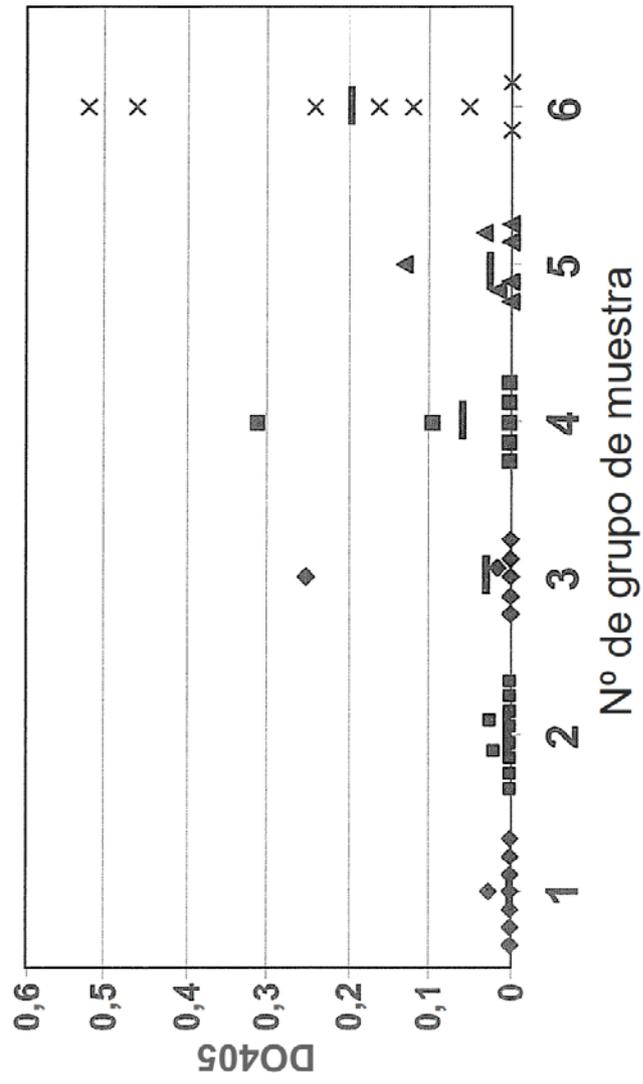


Figura 5A

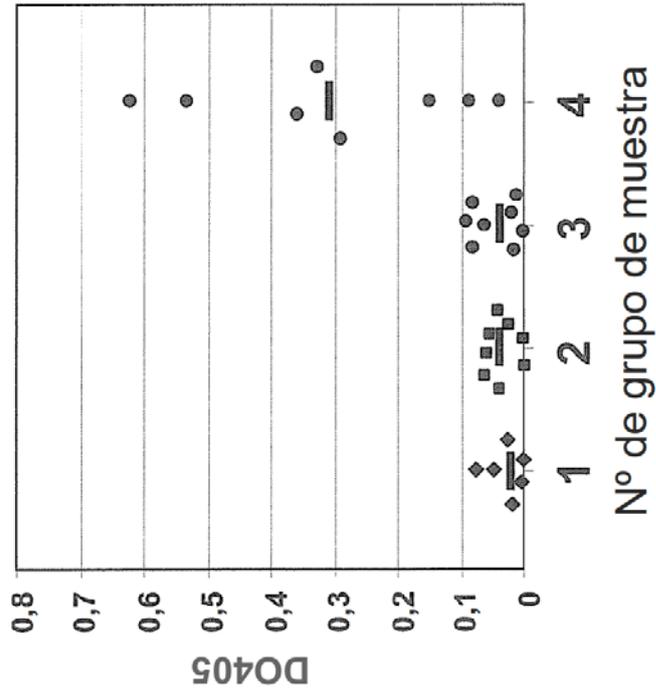


Figura 5B