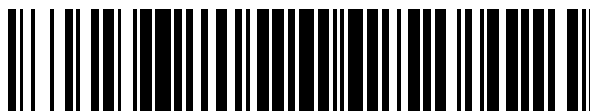


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 848 774**

51 Int. Cl.:

C12N 15/70 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2013** **E 18198665 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2020** **EP 3444352**

54 Título: **Producción de vacuna recombinante en *E. coli* mediante conjugación enzimática**

30 Prioridad:

07.11.2012 US 201261723408 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.08.2021

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)
Rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

WACKER, MICHAEL;
KOWARIK, MICHAEL;
WETTER, MICHAEL y
FARIDMOAYER, AMIRREZA

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 848 774 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

Producción de vacuna recombinante en *E. coli* mediante conjugación enzimática

1 – Introducción

5 En el presente documento, se proporcionan células procarióticas eficientes para producir glucoconjugados *in vivo*, así como los procedimientos para generar estas células, y los procedimientos para utilizar estas células para producir glucoconjugados. También se incluyen composiciones de los glucoconjugados mencionados así como sus diferentes usos.

2 – Antecedentes

10 La glucosilación es un proceso mediante el cual, las moléculas de carbohidratos o azúcares (monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, o polisacáridos) se unen a las cadenas laterales de diferentes restos de aminoácidos en una proteína o polipéptido para generar una glucoproteína.

15 Las glucoproteínas están involucradas en varios procesos, tales como interacción celular y señalización celular; participan en el plegamiento de las proteínas, oligomerización, estabilidad, control de calidad, clasificación y transporte de las proteínas secretoras y de membrana. La glucosilación de proteínas tiene una influencia profundamente favorable sobre la antigenicidad, la estabilidad y la vida media de una proteína.

Existen diferentes clases de glucoproteínas dependiendo del tipo de enlace entre las moléculas de carbohidratos y el resto de aminoácido en el vehículo de proteína.

20 La glucosilación de proteínas N-ligada - la adición de las moléculas de carbohidratos a un resto de asparagina en la cadena de polipéptido de la proteína diana - es el tipo más común de modificación posterior a la traducción que se presenta en el retículo endoplásmico de los organismos eucariotas. El proceso se lleva a cabo mediante el complejo enzimático de oligosacaril-transferasa (OST) responsable de la transferencia de un oligosacárido previamente ensamblado a partir de un vehículo de lípido (dolicol fosfato) con un resto de asparagina de una proteína naciente dentro de la secuencia conservada Asn-X-Ser/Thr (en la que X es cualquier aminoácido excepto prolina) en el retículo endoplásmico. La cadena de sacárido entonces se somete a otras modificaciones en el aparato de Golgi. El proceso de glucosilación N-ligada se presenta en los eucariotas y ampliamente en las arqueas, pero muy raramente en las bacterias (véase más adelante).

La glucosilación O-ligada es una forma de glucosilación que se presenta en los eucariotas, en las arqueas, y en las bacterias. Consiste en la unión de una molécula de azúcar a un átomo de oxígeno en un resto de aminoácido en la proteína diana.

30 Se ha demostrado que una bacteria, el patógeno que se transmite por los alimentos *Campylobacter jejuni*, también puede N-glucosilar sus proteínas (Wacker y col., *Science*. 2002; 298 (5599): 1790-3) debido al hecho de que posee su propia maquinaria de glucosilación. La maquinaria responsable de esta reacción es codificada por un complejo denominado como pgl (por glucosilación de proteínas).

35 La maquinaria de glucosilación de *C. jejuni* se puede transferir a *E. coli* para permitir la glucosilación de las proteínas recombinantes expresadas por las células de *E. coli*. Los estudios anteriores han demostrado la manera de generar cepas de *E. coli* que pueden llevar a cabo la N-glucosilación (véase, por ejemplo, Wacker y col., *Science*. 2002; 298 (5599): 1790-3; Nita-Lazar y col., *Glycobiology*. 2005; 15(4): 361-7; Feldman y col., *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 2005; 102(8): 3016-21; Kowarik y col., *EMBO J.* 2006; 25(9): 1957-66; Wacker y col., *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 2006; 103(18): 7088-93; Publicaciones de Solicitud Internacional de Patente Números WO2003/074687, WO2006/119987, WO 2009/104074, WO/2011/ 06261, y WO2011/138361).

40 Las bacterias se pueden dividir en dos grupos, Gram positivas y Gram negativas, dependiendo de si tienen cualquiera de una membrana celular de una sola vaina o de doble vaina que con frecuencia está rodeada por los polisacáridos capsulares. Los ejemplos de estas bacterias incluyen *Streptococcus* ssp., *Pseudomonas* ssp., *Neisseria* ssp., *Salmonella* ssp., *Escherichia* ssp., *Staphylococcus* ssp., *Campylobacter* ssp., etc. Uno de los agentes infecciosos médicamente y comercialmente más relevantes es *Streptococcus pneumoniae*, un patógeno Gram positivo.

45 *S. pneumoniae* es la principal causa de infecciones tanto leves como severas en todo el mundo. Los síndromes clínicos primarios asociados con las infecciones neumocócicas son neumonía, meningitis, infecciones en el torrente sanguíneo, y otitis media aguda, siendo la neumonía la más importante de éstas en términos de patología y mortalidad. Las infecciones causadas por *S. pneumoniae* son responsables de problemas sustanciales de enfermedad, en particular en los muy jóvenes y en los ancianos (Isaacman D J, M. E., Reinert R. 2010. Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. *Int J Infect Dis.* 14: 197-209).

Los neumococos están agrupados en varios serotipos (aproximadamente 93) con base en sus polisacáridos

capsulares químicamente y serológicamente distintos. Ciertos serotipos son más abundantes que otros, para asociarse con las infecciones clínicamente evidentes, para ocasionar infecciones invasivas graves, y para adquirir resistencia a una o más clases de agentes antibacterianos (Rueda, A. M. M., MSc; Serpa, José A. MD; Matloobi, Mahsa MD; Mushtaq, Mahwish MD; Musher, Daniel M. MD. 2010. The spectrum of invasive pneumococcal disease at an adult tertiary care hospital in the early 21st century. *Medicine* (Baltimore) 89: 331-336). Se han identificado distintos serotipos de *S. pneumoniae* basándose en las diferencias estructurales en la cápsula del polisacárido. De acuerdo con los análisis previos, aproximadamente 10 u 11 serotipos cuentan por más del 70 % de las infecciones pediátricas invasivas en todas las regiones del mundo (Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR: Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, parte I. Clinical infectious diseases: an official publication of the *Infectious Diseases Society of America* 2000, 30(1): 100-121). La distribución de los serotipos que provocan la enfermedad varía por edad, síndrome de enfermedad, gravedad de la enfermedad, región geográfica, y a través del tiempo. Los neumococos que son resistentes a penicilina, eritromicina, co-trimoxazol o a múltiples fármacos, son comunes en muchas regiones (Evolving trends in *Streptococcus pneumoniae* resistance: implications for therapy of community-acquired bacterial pneumonia. Jones RN, Jacobs MR, Sader HS. *Int J Antimicrob Agents*. Septiembre de 2010; 36(3): 197-204).

La cápsula neumocócica es uno de los principales factores de virulencia bacteriana, y se ha utilizado con éxito como antígeno en diferentes vacunas. Se ha demostrado que los anticuerpos contra el polisacárido capsular son protectores contra la infección neumocócica (Musher DM PH, Watson DA, Baughn RE: Antibody to capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* at the time of hospital admission for Pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 2000, 182(1): 158-167, Isaacman DJ ME, Reinert RR: Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. *Int J Infect Dis* 2010, 14(3): 197-209)

Las vías de síntesis de los polisacáridos capsulares (CPS) neumocócicos difieren dependiendo del serotipo (aproximadamente 93). Con la excepción de los tipos 3 y 37, los cuales se sintetizan mediante la vía de sintasa (Bentley SD, Aanensen DM, Mavroidi A, Saunders D, Rabinowitsch E, Collins M, Donohoe K, Harris D, Murphy L, Quail MA y col.: Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS genetics* 2006, 2(3): e31); los polisacáridos capsulares (CPS) neumocócicos se sintetizan en términos generales mediante la vía dependiente de Antígeno-O-Flipasa (Wzx) / Polimerasa (Wzy) (Figura 1).

Los polisacáridos capsulares (CPS) se ensamblan a partir de los precursores comunes (por ejemplo, monosacáridos activados por nucleótidos) sobre los lípidos vehículos, mediante un planteamiento por pasos. Primero, se ensambla la unidad de repetición sobre el vehículo en el lado citoplásmico de la membrana mediante diferentes glucosil-transferasas. El oligosacárido enlazado al lípido se desliza entonces hacia el lado externo de la membrana, en donde se polimerizan las unidades de repetición. El polisacárido capsular (CPS) completo se libera del lípido vehículo y se exporta hacia la superficie.

Los polisacáridos bacterianos pueden provocar una respuesta inmunitaria de larga duración en los seres humanos si se acoplan a un vehículo de proteína que contenga epítopos de linfocitos T. Este concepto se elaboró hace casi 100 años (Avery, O. T., y W. F. Goebel, 1929. Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins. Immunological specificity of synthetic sugar-proteins. *J. Exp. Med.* 50: 521-533), y se probó posteriormente para el polisacárido de *Haemophilus influenza* tipo B (HIB) acoplado a la toxina de difteria portadora de proteína (Anderson, P. 1983. Antibody responses to *Haemophilus influenzae* type b and diphtheria toxin induced by conjugates of oligosaccharides of the type b capsule with the nontoxic protein CRM197. *Infect Immun* 39: 233-8; Schneerson, R., O. Barrera, A. Sutton, y J. B. Robbins. 1980. Preparation, characterization, and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugates. *J Exp Med* 152: 361-76). Este glucoconjugado también fue la primera vacuna conjugada que obtuvo licencia en los EE.UU. en 1987, y se introdujo en el programa de inmunización infantil de los Estados Unidos poco después. Además de HIB, se han desarrollado con éxito vacunas conjugadas contra los patógenos humanos encapsulados *Neisseria meningitidis* y *S. pneumoniae*. El uso rutinario de estas vacunas ha dado como resultado una colonización nasofaríngea reducida, así como infección. En la actualidad, aproximadamente el 25 % del mercado global de vacunas comprende vacunas conjugadas.

Las vacunas conjugadas se han utilizado con éxito para proteger contra las infecciones bacterianas. Se requiere de la conjugación de un polisacárido antigénico con un vehículo de proteína para la respuesta de memoria protectora, debido a que los polisacáridos son antígenos independientes de los linfocitos T. Los polisacáridos se han conjugado con vehículos de proteína mediante diferentes procedimientos químicos, utilizando grupos reactivos de activación en el polisacárido, así como en el vehículo de proteína (Pawlowski, A., G. Kallenius, y S. B. Svenson. 2000. Preparation of pneumococcal capsular polysaccharide-protein conjugates vaccines utilizing new fragmentation and conjugation technologies. *Vaccine* 18: 1873-1885; Robbins, J. B., J. Kubler-Kielb, E. Vinogradov, C. Mocca, V. Pozsgay, J. Shiloach, y R. Schneerson. 2009. Synthesis, characterization, and immunogenicity in mice of *Shigella sonnei* O-specific oligosaccharide-core-protein conjugates. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 106: 7974-7978).

Las vacunas conjugadas se pueden administrar a niños para protegerlos contra las infecciones bacterianas, y pueden proporcionar una respuesta inmunitaria de larga duración a los adultos. Se ha descubierto que las construcciones de la invención generan una respuesta de IgG en los animales. Se cree que el polisacárido (es decir, el resto de azúcar) desencadena una respuesta inmunitaria de corta duración que es específica del azúcar. En realidad, el sistema

inmunológico humano genera una fuerte respuesta a las estructuras superficiales de polisacárido específicas de las bacterias, tales como los antígenos-O y los polisacáridos capsulares. Sin embargo, debido a que la respuesta inmunitaria a los polisacáridos es dependiente de IgM, el sistema inmunológico no desarrolla ninguna memoria. El vehículo de proteína que lleva el polisacárido, sin embargo, desencadena una respuesta de IgG que es dependiente de los linfocitos T y que proporciona una protección de larga duración, debido a que el sistema inmunológico desarrolla memoria. Por esta razón, es conveniente desarrollar una vacuna como un conjugado de vehículo de proteína – polisacárido.

La incapacidad de las vacunas neumocócicas puras para inducir una respuesta inmunitaria protectora para los serotipos importantes en los niños jóvenes precluye su consideración para la inmunización infantil.

Hasta la fecha, las vacunas contra las enfermedades neumocócicas se sintetizan *in vitro* mediante una tecnología de conjugación química bien establecida. Los polisacáridos capsulares antigénicos se extraen a partir de organismos patógenos, se purifican, se activan químicamente, y se conjugan con un vehículo de proteína adecuado. En la actualidad, existen diferentes vehículos de proteína utilizados para producir los glucoconjugados, por ejemplo, CRM197 (toxóide de difteria), toxóide de tétanos, y proteína D de *Hemophilus influenzae*.

Hace varios años se concedió en licencia una vacuna conjugada neumocócica 7-valente (PCV7), y ha sido recomendada para usarse en los países en desarrollo con una alta carga de morbilidad por el WHO's Strategic Advisory Group of Experts (SAGE) (Grupo de Expertos Asesores Estratégicos de la Organización Mundial de la Salud) (*Vaccine*, 6 de julio de 2012; 30(32): 4717-8. Publicación Electrónica 20 de mayo de 2012. Neumococcal vaccines WHO position paper - 2012 - recommendations. Publicación de WHO). También se concedieron en licencia una vacuna conjugada 10-valente (PCV10) y una vacuna conjugada 13-valente (PCV13) en diferentes países. Existen vacunas conjugadas adicionales en diferentes etapas de desarrollo (Jiang SM, Wang L y Reeves PR: Molecular characterization of *Streptococcus pneumoniae* type 4, 6B, 8, and 18C capsular polysaccharide gene clusters. *Infect Immun* 2001, 69(3): 1244-1255).

Se han identificado varios problemas en el contexto de la elaboración de vacunas conjugadas químicas. Se ha demostrado que el tratamiento químico de los polisacáridos para conjugación deteriora la conformación natural del polisacárido, teniendo influencia sobre la calidad de los antígenos y, en consecuencia, afectando a la antigenicidad e inmunogenicidad del producto final (Impact of the conjugation method on the immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19F polysaccharide in conjugate vaccines (Poolman J, Frasc C, Nurkka A, Käyhty H, Biemans R, Schuerman L. *Clin Vaccine Immunol*. Febrero de 2011; 18(2): 327-36. Publicación Electrónica 1 de diciembre de 2010).

3 – Sumario de la invención

La presente invención describe un procedimiento novedoso para producir vacunas de glucoconjugados que contienen polisacáridos a partir de células neumocócicas. Esta vacuna neumocócica innovadora se basa en el descubrimiento de que los genes reguladores involucrados en la biosíntesis de los oligo- o poli-sacáridos de una bacteria Gram positiva se pueden utilizar para sintetizar de una manera eficiente los oligo- y poli-sacáridos en una cepa huésped Gram negativa, y que el oligo- o poli-sacárido producido de esta manera se puede utilizar para hacer una vacuna de glucoconjugado en las células hospedadoras Gram negativas. Otras características novedosas e inesperadas de la invención incluyen, sin limitación, las realizaciones estipuladas más adelante.

La presente invención describe un procedimiento original para la producción de vacunas conjugadas basadas en polisacáridos neumocócicos. El procedimiento se basa en varios pasos:

i) La producción recombinante de polisacáridos neumocócicos como polisacáridos tipo antígeno-O enlazados a pirofosfato de undecaprenilo (Und-PP) en *E. coli* utilizando genes reguladores que mejoran la eficiencia de producción de los polisacáridos.

ii) El desarrollo de una cepa de producción adecuada mediante la supresión de funciones específicas de la cepa inicial, para hacer que la producción del polisacárido sea más eficiente.

iii) El diseño de construcciones de ADN adecuadas que permitan la síntesis recombinante eficiente de los polisacáridos neumocócicos en *E. coli*.

iv) Un procedimiento para la conjugación eficiente *in vivo* de los polisacáridos con una proteína aceptora mediante una oligosacaril-transferasa.

4 – Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** ilustra la organización genética de la vía biosintética del polisacárido capsular de *S. pneumoniae*. Diagrama esquemático de la organización genética general de la vía biosintética del polisacárido capsular de las cepas de *Streptococcus pneumoniae* utilizadas para la conjugación *in vivo*.

La **Figura 2** muestra la organización genética relacionada con la biosíntesis del CPS1. Organización genética del

CPS1, *wzg* a *rmlD* son los genes que están involucrados en la biosíntesis del polisacárido capsular.

La **Figura 3** ilustra una subunidad de CPS1. Diagrama esquemático de una subunidad de CPS1.

La **Figura 4** muestra una subunidad de antígeno-O a partir de *S. sonnei* y *P. shigelloides*. Diagrama esquemático de la unidad de repetición de *S. sonnei* y *P. shigelloides*.

5 La **Figura 5** muestra el complejo del antígeno O17 de *P. shigelloides*. Complejo de antígeno-O O17 de *Plesiomonas shigelloides*.

La **Figura 6** presenta la producción del polisacárido CPS1 de *S. pneumoniae* en *E. coli*. Producción del polisacárido CPS1 de *S. pneumoniae* en *E. coli*. Análisis por transferencia de Western de extractos de células enteras tratadas con proteinasa K a partir de diferentes cepas de *E. coli* transformadas con el plásmido pGVX767, que contiene los genes biosintéticos de CPS1 completos, *wzg-ugd*. Carril 1, marcador de proteína; carril 2, *E. coli* GVX2174 (W3110 $\Delta waaL$ $\Delta wecAwzzECA$ $\Delta rfbO16::rfbP.shigelloidesO17-clmR$); carril 3, *E. coli* GVX2174 transformada con pGVX767 (pLAFR que codifica un promotor, un RBS, y *wzg-ugd* de CPS tipo 1); carriles 4 y 5, *E. coli* GVX3329 (=GVX2174 *wbgW::clmR*= W3110 $\Delta waaL$ $\Delta wecAwzzECA$ $\Delta rfbO16::rfbP.shigelloidesO17 \Delta wbgW::clmR$), transformada con pGVX767. Las muestras se ejecutaron en gel de Bis-tris (Invitrogen) al 12 % con MES durante 35 minutos a 200V y entonces se transfirieron en el iBlot y se revelaron mediante un anticuerpo anti-CP1 (1:250), como un anticuerpo primario. *clmR* denota un segmento de ADN que confiere resistencia al cloranfenicol (*clm*), es decir, un casete de resistencia a *clm*.

La **Figura 7** muestra la sensibilidad al tratamiento con ácido para el polisacárido CPS1 producido en *E. coli*. *E. coli*, análisis por transferencia de Western de *E. coli* GVX3329 transformada con el plásmido pGVX767 (que contiene los genes biosintéticos de CPS1 completos, *wzg-ugd*). Carriles 1, 3, extractos de células enteras de dos colonias diferentes tratadas con proteinasa K; carriles 2 y 4, extractos correspondientes tratados con ácido trifluoro-acético (TFA); carril 5, marcador de proteína. Las muestras se ejecutaron en geles de Bis-tris al 12 % (Invitrogen) con regulador MES durante 35 minutos a 200V, y entonces se electrotransfirieron y se revelaron mediante el anticuerpo anti-CP1 (1:250), como un anticuerpo primario.

25 La **Figura 8** muestra el efecto de las supresiones de los genes transportadores en CPS1 de *S. pneumoniae*. Efecto de la supresión de los genes transportadores del polisacárido capsular, *wzg*, *wzh*, *wzd*, y *wze*, sobre la biosíntesis del polisacárido CPS1 de *S. pneumoniae* en *E. coli*. Análisis por transferencia de Western de los extractos de células enteras (digeridas con proteinasa K) de cuatro colonias diferentes de *E. coli* GVX3329 transformadas con el plásmido pGVX808 (=pGVX767 $\Delta wzg-wze::clmR$), carriles 2 a 5 y pGVX767 (complejo de CPS1 completo), carril 6. Las muestras se ejecutaron en gel de Bis-tris al 12 % (Invitrogen) con MES durante 35 minutos a 200V, y entonces se transfirieron en el iBlot y se revelaron mediante el anticuerpo anti-CP1 (1:250), como un anticuerpo primario.

La **Figura 9** muestra los pasos de purificación de His-Trap del EPA N-glucosilado con el CPS tipo 1 de *S. pneumoniae* a partir de los pasos de purificación de His-Trap de *E. coli*. diseñados del EPA N-glucosilado con el polisacárido capsular grupo 1 de *S. pneumoniae* a partir de *E. coli* diseñada. Los Paneles A y B muestran el Western-blot de las muestras de proteína a partir de los pasos de purificación de los conjugados de EPA-CP1 desarrollados por anti-His y anti-CP1, respectivamente. Se utilizó del 4 al 12 % de gel de PAGE-Bis-tris para resolver las muestras de proteína. Se utilizó la cepa de *E. coli* GVX3329 (=GVX2174 *wbgW::clmR*= W3110 $\Delta waaL$ $\Delta wecAwzzECA$ $\Delta rfbO16::rfbP.shigelloidesO17 \Delta wbgW::clmR$), transformada con pGVX767, pGVX114, y pGVX150.

La **Figura 10** muestra un diagrama esquemático de una subunidad CPS4.

La **Figura 11** muestra la organización genética de CPS4. Organización genética de CPS4, *wzg* a *fnlC* son los genes que están involucrados en la biosíntesis del polisacárido capsular.

La **Figura 12** ilustra la producción del polisacárido CPS4 de *S. pneumoniae* en *E. coli*. Análisis por transferencia de Western de extractos de células enteras tratadas con proteinasa K a partir de diferentes cepas de *E. coli*. Carril 1, marcador de proteína; carriles 2 a 4, *E. coli* W3110 $\Delta waaL$ transformada con pGVX803 (que expresa el complejo de CPS4 entero), y pGVX238 (Z3206, epimerasa); carriles 5 a 7, *E. coli* W3110 $\Delta waaL$ transformada con pGVX803 y pGVX207 (*galE*, epimerasa); carriles 8 a 10, *E. coli* W3110 $\Delta waaL$ *E. coli* transformada con pGVX753 (complejo parcial de CPS4, *wciJ-fnlC*, *sin* genes reguladores y *wciI*), y pGVX238. Se utilizó arabinosa al 0,1 % para la inducción. Los equivalentes a 0,1 OD de la biomasa cultivada se ejecutaron en gel de Bis-tris al 12 % (Invitrogen) con MES durante 35 minutos a 200V, y entonces se transfirieron en el iBlot y se revelaron mediante el anticuerpo anti-CPS4 (1:100), como un anticuerpo primario.

Las **Figuras 13A y 13B** muestran los resultados a partir del análisis de CPS4 de *S. pneumoniae* producida en *E. coli* SCM6. El análisis de CPS4 de *S. pneumoniae* producida en *E. coli*. LLO se extrajo a partir de *E. coli* SCM6 (Schwarz F, Huang W, Li C, Schulz BL, Lizak C, Palumbo A, Numao S, Neri D, Aebi M, Wang LX: A combined method for producing homogeneous glycoproteins with eukaryotic N-glycosylation. *Nat Chem Biol* 2010), y se marcó con 2AB como se describe anteriormente (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US

2011/0274720 A1). Figura 13A; cromatograma de LLO marcado con 2AB extraído a partir de SCM6 de *E. coli* transformado con pGVX803 (que expresa el complejo de CPS4 entero a partir de pLAFR), y epimerasa *galE* (pGVX207, estructura base de pMLBAD), líneas punteadas, comparándose con la cepa de *E. coli* del fondo transformada con los vectores vacíos pLAFR y pMLBAD, línea continua. Figura 13B, Análisis de MS/MS de la única unidad de repetición del pico de CPS4 que se eluyó a los 53,9 minutos (Panel A).

La **Figura 14** muestra los resultados del análisis de CPS4 de *S. pneumoniae* producida en *E. coli* SCM3 (Faridmoayer A, Fentabil MA, Mills DC, Klassen JS, Feldman MF: Functional characterization of bacterial oligosaccharyltransferases involved in O-linked protein glycosylation. JOURNAL OF BACTERIOLOGY 2007, 189(22): 8088-8098). Análisis de CPS4 de *S. pneumoniae* producida en *E. coli*. LLO se extrajo a partir de *E. coli* SCM3 (Sφ874, Δ*waaL*), y se marcó con 2AB como se describe (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 2011/0274720 A1). Cromatograma de HPLC de LLO marcado con 2AB extraído a partir de *E. coli* SCM3 transformada con pGVX771 (pLAFR que contiene un promotor, RBS, el gen Z3206, y *wciJ-fnlC* del complejo CPS14, sin genes reguladores), línea sólida, comparándose con la cepa SCM3 de *E. coli* SCM3 del fondo transformada con el vector vacío pGVX725 (pLAFR con promotor y RBS solamente), línea punteada. El análisis de MS de los picos eluidos a los 50,8, 53,6 y 56,2 minutos concordó con una sola unidad de repetición (RU) de CPS4 con o sin piruvato (Pyr).

Las **Figuras 15A a 15D** ilustran el resultado a partir del análisis de la N-glucosilación *in vitro* utilizando CPS4-LLO. N-glucosilación *in vitro* utilizando el oligosacárido enlazado a lípido CPS4. LLO se extrajo a partir de *E. coli* SCM3 (Sφ874 Δ*waaL*) transformada con pGVX771 (descrito en la figura anterior), y pGVX725 (vector vacío). La reacción *in vitro* se completó durante la noche mediante la mezcla de *C. jejuni* PglB purificado, un aceptor peptídico marcado con fluorescencia (Tamra-DANYTK), y extracto de LLO en un regulador de reacción. El péptido se separó de la mezcla de reacción mediante la separación de la fase orgánica y se sometió a UPLC seguida por análisis de MS. Figuras 15A y 15B, cromatogramas de UPLC del péptido después de la glucosilación utilizando LLO extraído de SCM3 que contiene pGVX725 (control negativo), y SCM3 que contiene pGVX771. Figuras 15C y 15D, análisis de MS/MS de los gluco-péptidos eluidos a los 15,43 y 17,62 minutos correspondientes a una y dos subunidades completas de CPS4 ensamblado sobre el péptido.

Las **Figuras 16A a 16C** muestran los pasos de purificación de His-Trap del EPA N-glucosilado con los pasos de purificación de His-Trap de CPS4 de *S. pneumoniae* del EPA N-glucosilado con CPS4 de *S. pneumoniae* a partir de *E. coli* diseñada. *E. coli* W3110Δ*waaL* transformada con pGVX539, pGVX114, pGVX207 y pGVX803 y cultivada en el medio TB. Las Figuras 16A, 16B y 16C muestran la tinción con Coomassie y el Western-blot de las muestras de proteína a partir de los pasos de purificación de los conjugados de EPA-CPS4 desarrollados por anti-His y anti-CP4, respectivamente. Se utilizó del 4 al 12 % de gel SDS - Bis-tris para resolver las muestras de proteína. pGVX539 es un plásmido de expresión para la expresión de la proteína portadora de EPA en donde el EPA se detoxifica y contiene dos secuencias de N-glucosilación en consenso.

La **Figura 17** muestra el análisis de derivación de PMP mediante el análisis de HPLC RP de los glucoconjugados de CPS4-EPA. Análisis de derivación de PMP mediante el análisis de HPLC RP de los glucoconjugados de CPS4-EPA producidos en *E. coli*. Línea sólida: traza obtenida a partir de hidrólisis y análisis del glucoconjugado, línea punteada: traza preparada idénticamente a partir del polisacárido capsular CP4.

La **Figura 18** ilustra el análisis Dot-blot de los sueros a partir de conejos inmunizados con los conjugados de CPS4-EPA. Análisis Dot-blot de los sueros a partir de conejos inmunizados con los conjugados de CPS4-EPA. 50 nanogramos del polisacárido capsular CPS4 aislado a partir de *S. pneumoniae* grupo 4 se transfirieron sobre cada punto. El suero obtenido después de la segunda inyección se utilizó para el análisis con una dilución de 1 a 100. Carril 1, reserva de suero preinmune de conejos que se utilizaron en este estudio; carriles 2 a 7, suero a partir de diferentes conejos inyectados con EPA-CPS4; carriles 8 a 9, suero de conejos de control inyectados con regulador que contiene hidróxido de aluminio y adyuvantes completos de Freund, respectivamente; Carriles 10 a 11, suero de conejos de control positivo inyectados con Prevenar-13; Carriles 12 a 13, se utilizó un antisuero neumocócico tipo 4 como un anticuerpo primario de Statens Serum Institute con diluciones a 1:100 y 1:200, respectivamente.

La **Figura 19** describe la organización genética de CPS14 de los genes involucrados en la biosíntesis de CPS. Organización genética de CPS14, *wzg* a *wciY* son los genes que están involucrados en la biosíntesis del polisacárido capsular.

La **Figura 20** muestra un diagrama esquemático de una subunidad CPS14.

Las **Figuras 21A y 21B** muestran la expresión de CPS14 LLO en *E. coli*. *wchA* a *wciY*, los genes a partir del complejo de CPS14 se clonaron en el vector de reemplazo de genes pDOC-C (pGVX615) que contiene el promotor del complejo del antígeno-O O16 (*rfbO16*) y transformado en *E. coli* GVX1128 (W3110Δ*waaL*). Figura 21A, cromatograma de LLO marcado con 2AB extraído a partir de *E. coli* GVX1128 transformado con pGVX615*wzy*_{mut} (mutante de polimerasa de CPS14 que produce una sola subunidad), línea sólida, comparándose con LLO extraído a partir de la cepa del fondo, línea punteada; el inserto es el Western-blot de *E. coli* GVX1128 digerida con proteinasa K transformada con pGVX615 sondeada mediante el anticuerpo anti-CPS14 como el anticuerpo primario. Figura 21B, análisis de MS/MS de la única subunidad de CPS14 eluida a los 57 minutos (indicado por la

flecha en la Figura 21A).

La **Figura 22** muestra la expresión del polisacárido CPS14 en cepas de *E. coli*, en donde el ácido colánico (CA) fue reemplazado con el complejo de CPS14. Se ilustra el Western-blot de células digeridas con proteinasa K a partir de diferentes cepas de *E. coli* integradas sondeadas mediante anti-CPS14. Todas las cepas integradas; GVX6126 (GVX1052 CA::CPS14; carriles 1 y 2), GVX6129 (GVX1128 CA::CPS14; carriles 3 y 4), y GVX6300 (GVX1716; carriles 5 y 6), mostraron un patrón de tipo de escalera correspondiente a la producción del polímero CPS14 cuando se transformó con pGVX688, expresando RcsA.

La **Figura 23** ilustra el efecto de los genes transportadores de CPS14 sobre la producción del polisacárido CPS14 de *S. pneumoniae* en cepas de *E. coli* GVX6126 (*E. coli* W3110 CA::CPS14). Se muestra el análisis por transferencia de Western de extractos de células enteras tratadas con proteinasa K a partir de diferentes células de *E. coli*. Carril 1, marcador de proteína; carril 2, *E. coli* GVX6126 transformada con pGVX688 (*rscA*), y pGVX72 (vector vacío; carril 3, *E. coli* GVX6126 transformada con pGVX688 (*rscA*), y pGVX1497 (CPS14 *wzg-wze* clonado en pGVX72). Los equivalentes a 0.4 OD de biomasa cultivada se ejecutaron en gel de Bis-tris al 12 % (Invitrogen) con MES durante 35 minutos a 200V, y entonces se transfirieron en el iBlot y se revelaron mediante el anticuerpo anti-CPS4 (1:100), como un anticuerpo primario.

La **Figura 24** ilustra un cromatograma de LLO marcado con 2AB extraído a partir de *E. coli* GVX6129 (W3110Δ*waaL* CA::CPS14) transformada con pGVXN688 (que expresa RcsA), y glucolípidos analizados mediante el marcado con 2-AB y análisis de MS/MS como se describe en las secciones que se encuentran más adelante. El análisis de MS/MS identificó 2 y 3 subunidades de CPS14, eluidas a los 95,9 minutos y 115,3 minutos, respectivamente, (indicados por las flechas).

5 – Descripción detallada de la invención

Los polisacáridos capsulares neumocócicos se sintetizan sobre lípidos vehículos mediante la colaboración de un conjunto de enzimas típicamente codificadas en el complejo de CPS de las células de *S. pneumoniae* (Whitfield C., Roberts I.S.: Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1999, 31(5): 1307-1319). La síntesis del CPS dependiente de *wzy* empieza con la adición de un monosacárido-fosfato hasta undecaprenil-fosfato (Und-P) en el lado citoplásmico de la membrana. Un oligosacárido corto se alarga mediante la adición en secuencia de monosacáridos a partir de los nucleótidos de azúcar activados mediante diferentes glucosiltransferasas, y el polisacárido enlazado con lípido se desliza a través de la membrana mediante una flipasa. La unidad de repetición de antígeno (RU) se polimeriza mediante una reacción enzimática efectuada por la proteína *wzy*. El polisacárido se transfiere entonces a la estructura aceptora final. Se cree que la polimerización y el transporte hacia la superficie celular son controlados por un conjunto de 3 a 4 enzimas que se localizan en el extremo 5' de los complejos de CPS.

Las glucosil-transferasas, la polimerasa *wzy*, la flipasa *wzx*, y las transferasas de monosacárido-fosfato son codificadas en la mayoría de los casos dentro del complejo *dexB* a *aliA*, mientras que las vías biosintéticas de monosacáridos activados por nucleótidos son codificadas ya sea en cualquier parte del genoma en el caso de las actividades generales de mantenimiento, y específicamente dentro del complejo de CPS cuando los monosacáridos son específicos para el CPS (Bentley SD, Aanensen DM, Mavroidi A, Saunders D, Rabinowitsch E, Collins M, Donohoe K, Harris D, Murphy L, Quail MA y col.: Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS genetics* 2006, 2(3):e31).

Se cree que el control de la longitud en la biosíntesis de CPS involucra un círculo de eventos de fosforilación para la regulación (Morona JK, Miller DC, Morona R, Paton JC. The effect that mutations in the conserved capsular polysaccharide biosynthesis genes have on virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*. 15 de mayo de 2004; 189(10): 1905-13. Publicación Electrónica 27 de abril de 2004. PubMed PMID: 15122528). La mayoría de las vías biosintéticas que producen CPS utilizan monosacáridos activados por difosfato de nucleótido (NDP) como sustratos, es decir, esto es UDP-Glc y UDP-GlcNAc. Estos azúcares de NDP son proporcionados en los hospedadores Gram negativos y Gram positivos por los genes de mantenimiento, y por consiguiente, están disponibles como materiales de partida para la síntesis de azúcares específicos. Los genes biosintéticos para la síntesis de azúcares de NDP específicos u otras modificaciones siempre son codificados en los complejos de CPS.

La síntesis del antígeno-O y la síntesis de CPS difieren en la última etapa de la biosíntesis. El antígeno-O se agrega al núcleo del Lípido A mediante la ligasa *WaaL*, y se transporta adicionalmente hacia la membrana externa, mientras que el CPS está presente como una estructura capsular sobre las células. En promedio, la longitud final del azúcar de antígeno-O es mucho más corta que el CPS.

El CPS de *S. pneumoniae* está clasificado como un CPS del grupo I, debido a las vías bioquímicas específicas que conducen a su síntesis. La bacteria Gram negativa también contiene vías de CPS del grupo I, las cuales difieren de los complejos neumocócicos del grupo I por la presencia de genes de proteína transportadora de membrana adicionales responsables del transporte a la membrana externa. Por ejemplo, éstos son los complejos genéticos *wca* de la maquinaria biosintética del ácido colánico (CA) (Stevenson G., Andrianopoulos K, Hobbs M, Reeves PR: Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide

colanic acid. *J Bacteriol* 1996, 178(16): 4885-4893), y el complejo de CPS K30 (Whitfield C: Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem* 2006, 75: 39-68).

Sin embargo, a pesar del hecho de que algunos complejos de polisacáridos capsulares Gram negativos y Gram positivos eran similares en los elementos funcionales, nunca hubo un complejo neumocócico entero de CPS funcionalmente expresado en *E. coli*. En general se acepta que la diferente arquitectura de la envoltura celular requiere de una maquinaria específica para la producción del polisacárido, que es diferente cuando se debe cruzar una membrana externa. Por consiguiente, en el presente documento se describen procedimientos de producción mejorados de polisacáridos capsulares neumocócicos empleando: i) los aspectos del LPS y las vías del polisacárido capsular en un organismo Gram negativo, y ii) los aspectos de la regulación de la biosíntesis capsular Gram positiva y las vías de transporte en combinación dentro de las células hospedadoras Gram negativas. Estos polisacáridos se producen mediante los mecanismos de la vía del LPS en el hospedador Gram negativo, y la estructura de estos polisacáridos es la misma que aquella de los polisacáridos LPS. Los polisacáridos producidos en los sistemas Gram negativos de la presente invención se pueden caracterizar, por consiguiente, como "polisacáridos capsulares modificados" o "cápsulas de LPS" para los propósitos de esta solicitud. Adicionalmente, este sistema de expresión recién sintetizado y esta vía biosintética, que combina el LPS y las vías biosintéticas capsulares, se puede caracterizar por ser una "vía biosintética de LPS modificada" para los propósitos de la presente solicitud. Por lo tanto, la presente invención proporciona una bacteria Gram negativa diseñada genéticamente para la producción de una glucoproteína recombinante, en la que la bacteria Gram negativa comprende (a) glucotransferasas para producir un polisacárido capsular de una bacteria Gram positiva (b) una oligosacáril transferasa que es heteróloga para la bacteria Gram negativa, y (c) ácido nucleico que codifica una proteína de vehículo que comprende una secuencia consenso para la glucosilación, en donde un gen que codifica una enzima Gtr de la bacteria Gram negativa está funcionalmente inactivado.

De conformidad con lo anterior, una realización adicional involucra una vacuna de *S. pneumoniae* hecha mediante un sistema de glucosilación utilizando una vía de LPS modificada, el cual comprende la producción de un polisacárido capsular modificado o una cápsula de LPS.

Otra realización específica de la invención involucra la optimización del genoma de la célula hospedadora de *E. coli* Gram negativa para la expresión optimizada del CPS neumocócico. *E. coli* W3110 codifica un complejo genético profago denominado como *gtr*. Las enzimas de Gtr: GtrA, B, y S, codifican una maquinaria que modifica los antígenos-O mediante la adición de restos de glucosa ramificados a la cadena de antígeno-O en crecimiento en el espacio periplásmico (Lehane AM, Korres H, Verma NK: Bacteriophage-encoded glucosyltransferase GtrII of *Shigella flexneri*: membrane topology and identification of critical residues. *The Biochemical Journal* 2005, 389(Pt 1): 137-143). La vía involucra la generación de glucosa enlazada a undecaprenil-fosfato (Und-P, no Und-PP) sobre la cara citoplásmica de la membrana celular, deslizándose hacia el periplasma, y la transferencia consecutiva de la glucosa enlazada con Und-P al polisacárido de antígeno-O en crecimiento.

En ciertas realizaciones, Los genes *gtrABS* son parcialmente o completamente funcionalmente inactivados o suprimidos de las células hospedadoras Gram negativa, por ejemplo, los *gtrABS* se suprimen en una célula hospedadora de *E. coli*. Sin obligarse por la teoría, esta supresión canaliza toda la actividad biosintética del CPS hacia la vía de Und-PP accesible para la glucosilación, y de esta manera, potencia la producción de glucoproteína. Muchos polisacáridos neumocócicos se sintetizan como polímeros de unidades de repetición (RU) con glucosa como el monosacárido iniciador. Por consiguiente, estas unidades de repetición pueden interferir con la glucosilación de las proteínas, debido a que se ensamblan sobre Und-P.

Otra realización específica es el perfeccionamiento de la producción de CPS enlazado a Und-PP mediante el aumento de la expresión y actividad de UDP-glucosa: undecaprenil-fosfato glucosa – fosfato transferasa, que incrementa las cantidades de Und-PP-Glc en las células y, por consiguiente, conduce a una mayor eficiencia de producción de la unidad de repetición (RU) del CPS, y de los polisacáridos. Los ejemplos para estas UDP-glucosa:undecaprenil-fosfato glucosa-transferasas de fosfato es el *WchA* de *S. pneumoniae* (es decir, la enzima natural que proporciona la función iniciadora) o el *WcaJ* codificado en el operón *wca* de ácido colánico de *E. coli* W3110. Una realización específica de la invención es el reemplazo de la función natural del gen *wchA* de *S. pneumoniae* por la función de *E. coli* codificada en el gen *wcaJ* para optimizar el rendimiento de la producción del glucolípido.

Otra realización de la invención es la integración genómica del complejo de CPS recombinante en lugar del operón *wca* de *E. coli* W3110 para la producción de glucolípido estable y de alto rendimiento, y para una mejor actividad de glucosilación.

Genes reguladores

Se pueden utilizar diferentes genes reguladores de los complejos genéticos de los polisacáridos capsulares de las bacterias Gram positivas con los procedimientos y las células hospedadoras de la presente invención. En las realizaciones específicas, el gen regulador es *wzg*, *wzh*, *wzd*, o *wze* de un complejo genético de polisacárido capsular de *S. pneumoniae*, o *capA*, *capB*, o *capC* de un complejo genético de polisacárido capsular de *S. aureus*, o *CpsA*, *CpsB*, *CpsC*, o *CpsD* de un complejo genético de polisacárido capsular de *Streptococcus agalactiae* (Estreptococo del grupo B, o GBS). En ciertas realizaciones, el gen regulador es un gen regulador de un complejo genético de

polisacárido capsular enlistado en la sección de "Polisacáridos Capsulares" a continuación.

Polisacáridos capsulares

En ciertas realizaciones, los procedimientos y células hospedadoras de la presente invención, se utilizan para generar los polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae*. Estos polisacáridos capsulares incluyen, de *S. pneumoniae*: CPS1, CPS2, CPS3, CP4, CPS5, CPS6 (A y B), CPS7 (A,B, C), CPS8, CPS9 (A, L,N, V), CPS10 (A,B,C,F), CPS11 (A, B,C,D,F), CPS12(A,B,F), CPS13, CPS14 CPS15(A,B,C,F), CPS16(A,F), CPS17(A,F), CPS18(A,B,C,F), CPS19(A,B,C,F), CPS20,CPS21, CPS22(A,F), CPS23(A,B,F), CPS24(A,B,F), CPS25(A,F), CPS26, CPS27,CPS28(A,F), CPS29, CPS31, CPS32(A,F), CPS33(A,B,C,D,F), CPS34, CPS35(A,B,C,D,F), CPS36, CPS37, CPS38, CPS39, CPS40, CPS41(A,F), CPS42, CPS43, CPS44, CPS45, CPS46, CPS47(A,F), CPS48 y todas las cápsulas adicionales mencionadas en (Bentley SD, Aanensen DM, Mavroidi A, Saunders D, Rabinowitsch E, Collins M, Donohoe K, Harris D, Murphy L, Quail MA y col.: Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genetics* 2006, 2(3): e31). De una manera específica, estos polisacáridos capsulares incluyen, de *S. pneumoniae*: CPS1, CPS4, y CPS14.

En otras realizaciones, se pueden generar polisacáridos capsulares de otras bacterias Gram positivas empleando los procedimientos y células hospedadoras de la presente invención. Otras bacterias Gram positivas incluyen *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* (GBS). Los ejemplos de los polisacáridos capsulares incluyen *S. aureus* CPS5, CPS8, *S. agalactiae* (grupo B, GBS) CPSIa, CPSIb, CPSII, CPSIII, CPSIV, CPSV, CPSVI, CPSVII, CPSVIII, *Enterococcus faecalis* CPSA, CPSB, CPSC, CPSD.

En ciertas realizaciones, las glucosil-transferasas se introducen en las células hospedadoras proporcionadas en el presente documento, de tal manera que se sintetiza un polisacárido capsular deseado en la célula hospedadora. Véase, por ejemplo, la Solicitud Internacional de Patente Número WO 2011/138361.

Bioconjugados

En ciertas realizaciones de la presente invención, la célula hospedadora se modifica además para generar un bioconjugado, es decir, una proteína portadora que se glucosila con la proteína capsular generada en la célula hospedadora. La transferencia del polisacárido capsular sobre la proteína portadora es catalizada por una oligosacaril-transferasa. En ciertas realizaciones, una oligosacaril-transferasa se expresa de una manera recombinante en la célula hospedadora. En ciertas realizaciones, una oligosacaril-transferasa se introduce en el hospedador procariótico. Las oligosacaril-transferasas pueden ser de cualquier origen, y pueden incluir oligosacaril-transferasas heterólogas, es decir, oligosacaril-transferasas derivadas a partir de un organismo diferente de la célula procariótica hospedadora (por ejemplo, oligosacaril-transferasas derivadas a partir de una especie bacteriana diferente). En una realización específica, la oligosacaril-transferasa es de una especie de *Campylobacter*, por ejemplo, *C. jejuni*.

La proteína de vehículo puede ser una proteína recombinante. En ciertas realizaciones, la proteína de vehículo es una proteína que comprende naturalmente una o más secuencias en consenso de N-glucosilación. En otras realizaciones, se han introducido de una manera recombinante una o más secuencias en consenso de N-glucosilación en la proteína portadora. En el presente documento se puede utilizar cualquier proteína portadora adecuada para utilizarse en la producción de las vacunas conjugadas. Las proteínas portadoras de ejemplo incluyen, sin limitación, Exotoxina A de *P. aeruginosa* (EPA), CRM197, el toxoide de difteria, el toxoide de tétanos, hemolisina A destoxificada de *S. aureus*, factor de aglomeración A de *S. aureus*, factor de aglomeración B de *S. aureus*, FimH de *E. coli*, FimHC de *E. coli*, enterotoxina lábil al calor de *E. coli*, variantes destoxificadas de enterotoxina lábil al calor de *E. coli*, subunidad B de toxina de cólera (CTB), toxina de cólera, variantes destoxificadas de toxina de cólera, proteína Sat de *E. coli*, el dominio pasajero de proteína Sat de *E. coli*, AcrA de *C. jejuni*, y glucoproteínas naturales de *C. jejuni*, neumolisina de *S. pneumoniae*, y antígenos de proteína adicionales de *S. pneumoniae*, por ejemplo, NOX de *S. pneumoniae*, PspA de *S. pneumoniae*, PcpA de *S. pneumoniae*, PhtD de *S. pneumoniae*, PhtE de *S. pneumoniae*, Ply de *S. pneumoniae*, y LytB de *S. pneumoniae*.

En ciertas realizaciones, las proteínas de vehículo utilizadas en la generación de los conjugados descritos en el presente documento se modifican, por ejemplo, se modifican de tal manera que la proteína sea menos tóxica y/o más susceptible a la glucosilación, etc. En una realización específica, las proteínas de vehículo utilizadas en la generación de las vacunas conjugadas descritas en el presente documento se modifican de tal manera que el número de sitios de glucosilación en las proteínas portadoras se maximiza de una manera que permite tener concentraciones más bajas de la proteína para administrarse, por ejemplo, en una composición inmunogénica, en su forma bioconjugada. De conformidad con lo anterior, en ciertas realizaciones, las proteínas portadoras descritas en el presente documento se modifican para incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más sitios de glucosilación que los que normalmente estarían asociados con la proteína de vehículo (por ejemplo, en relación con el número de sitios de glucosilación asociados con la proteína de vehículo en su estado nativo/natural, por ejemplo, "de tipo silvestre"). En las realizaciones específicas, la introducción de sitios de glucosilación se lleva a cabo mediante la inserción de secuencias en consenso de glucosilación en cualquier parte de la estructura primaria de la proteína. La introducción de estos sitios de glucosilación se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante la adición de nuevos aminoácidos a la estructura primaria de la proteína (es decir, se agregan sitios de glucosilación, completos o parciales), o mediante la mutación de los aminoácidos existentes en la proteína con el objeto de generar los sitios de glucosilación (es decir, no se agregan

aminoácidos a la proteína, pero los aminoácidos seleccionados de la proteína se mutan como para formar sitios de glucosilación). Aquéllos con experiencia en la materia reconocerán que la secuencia de aminoácidos de una proteína se puede modificar fácilmente utilizando los planteamientos conocidos en la materia, por ejemplo, los planteamientos recombinantes que incluyen la modificación de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína. En las realizaciones específicas, se introducen secuencias en consenso de glucosilación en regiones específicas de la proteína portadora, por ejemplo, las estructuras superficiales de la proteína, en los términos N o C de la proteína, y/o en ciclos que se estabilizan mediante puentes de disulfuro en la base de la proteína. En ciertas realizaciones, la secuencia en consenso de glucosilación de 5 aminoácidos clásica se puede extender mediante restos de lisina para tener una glucosilación más eficiente y, de esta manera, la secuencia en consenso insertada puede codificar 5, 6 o 7 aminoácidos que se deben insertar o que reemplazan a los aminoácidos de la proteína aceptora.

En ciertas realizaciones, las proteínas de vehículo utilizadas en la generación de las vacunas conjugadas descritas en el presente documento comprenden un "marcador", es decir, una secuencia de aminoácidos que permite hacer el aislamiento y/o identificación de la proteína de vehículo. Por ejemplo, la adición de un marcador a una proteína de vehículo descrita en el presente documento puede ser útil en la purificación de esa proteína y, por consiguiente, en la purificación de vacunas conjugadas que comprendan la proteína de vehículo marcada. Los marcadores de ejemplo que se pueden utilizar en el presente documento incluyen, sin limitación, marcadores de histidina (HIS) (por ejemplo, marcador de hexa-histidina, o Marcador 6XHis), FLAG-TAG, y marcadores de HA. En ciertas realizaciones, los marcadores utilizados en el presente documento son removibles, por ejemplo, la remoción mediante agentes químicos o por medios enzimáticos, una vez que ya no se necesitan, por ejemplo, después de que se haya purificado la proteína.

En ciertas realizaciones, las células hospedadoras bacterianas descritas en el presente documento, y los conjugados producidos por estas células hospedadoras bacterianas descritas en el presente documento, poseen propiedades convenientes. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las células hospedadoras bacterianas descritas en el presente documento, que comprenden genes reguladores derivados a partir de bacterias Gram positivas, en donde esos genes reguladores están involucrados en la biosíntesis de oligosacáridos o polisacáridos, son capaces de producir antígenos de azúcar, por ejemplo, los oligo- y/o polisacáridos, de una mayor longitud como un resultado de la presencia de dichos genes reguladores. Además, las células hospedadoras bacterianas descritas en el presente documento son capaces de producir mayores cantidades de antígenos de azúcar, por ejemplo, los oligo- y/o polisacáridos, comparándose con las células hospedadoras bacterianas Gram negativas que carecen de genes reguladores derivados a partir de bacterias Gram positivas. Cada una de estas características es conveniente porque los conjugados producidos por las células bacterianas tienen una proporción más alta del antígeno de azúcar a la proteína, y debido a que las células bacterianas producen un mayor número de conjugados.

En ciertas realizaciones, una célula hospedadora bacteriana descrita en el presente documento produce aproximadamente el 5 %, el 10 %, 15 %, 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, o más del 50 % más conjugados que una célula hospedadora bacteriana que tenga las mismas propiedades pero que carezca de un gen regulador a partir de una bacteria Gram positiva que esté involucrada en la biosíntesis de oligo- o poli-sacáridos. En ciertas realizaciones, una célula hospedadora bacteriana descrita en el presente documento produce del 5 % al 10 %, del 10 % al 20 %, del 20 % al 30 %, del 30 % al 40 %, o del 40 % al 50 % más conjugados que una célula hospedadora bacteriana que tenga las mismas propiedades pero que carezca de un gen regulador a partir de una bacteria Gram positiva que esté involucrada en la biosíntesis de oligo- o polisacáridos.

En ciertas realizaciones, una célula hospedadora bacteriana descrita en el presente documento produce aproximadamente el 5 %, el 10 %, 15 %, 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, o más del 50 % más antígenos de azúcar, por ejemplo, los oligo- y/o poli-sacáridos, que una célula hospedadora bacteriana que tenga las mismas propiedades pero que carezca de un gen regulador a partir de una bacteria Gram positiva que esté involucrada en la biosíntesis de oligo- o poli-sacáridos. En ciertas realizaciones, una célula hospedadora bacteriana descrita en el presente documento produce del 5 % al 10 %, del 10 % al 20 %, del 20 % al 30 %, del 30 % al 40 %, o del 40 % al 50 % más antígenos de azúcar, por ejemplo, los oligo- y/o poli-sacáridos, que una célula hospedadora bacteriana que tenga las mismas propiedades pero que carezca de un gen regulador a partir de una bacteria Gram positiva que esté involucrada en la biosíntesis de oligo- o poli-sacáridos.

En ciertas realizaciones, una célula hospedadora bacteriana descrita en el presente documento produce antígenos de azúcar, por ejemplo, los oligo- y/o poli-sacáridos, que son aproximadamente el 5 %, el 10 %, 15 %, 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, o más del 50 % más largos que los antígenos de azúcar, por ejemplo, los oligo- y/o poli-sacáridos producidos por una célula hospedadora bacteriana que tenga las mismas propiedades pero que carezca de un gen regulador a partir de una bacteria Gram positiva que esté involucrada en la biosíntesis de oligo- o poli-sacáridos. En ciertas realizaciones, una célula hospedadora bacteriana descrita en el presente documento produce antígenos de azúcar, por ejemplo, los oligo- y/o poli-sacáridos, que son del 5 % al 10 %, del 10 % al 20 %, del 20 % al 30 %, del 30 % al 40 %, o del 40 % al 50 % más largos que los antígenos de azúcar, por ejemplo, los oligo- y/o poli-sacáridos producidos por una célula hospedadora bacteriana que tenga las mismas propiedades pero que carezca de un gen regulador a partir de una bacteria Gram positiva que esté involucrada en la biosíntesis de oligo- o poli-sacáridos.

Se pueden emplear diferentes ensayos para caracterizar los conjugados descritos en el presente documento, por ejemplo, para caracterizar la proteína de vehículo, los antígenos de azúcar unidos (por ejemplo, el oligo- y/o polisacárido), o ambos, incluyendo, por ejemplo, cromatografía de alto rendimiento con exclusión de tamaños, enfoque isoeléctrico, SDS-PAGE y análisis por transferencia de Western, determinación del peso molecular mediante MS, secuenciación N-terminal, análisis de aminoácidos, cromatografía en fase inversa de líquidos, espectroscopía de masas con electroaspersión, espectrometría de masas en fila (MS/MS), y mapeo de péptidos mediante espectroscopía de masas después de la digestión triptica.

Realizaciones

En una realización, en el presente documento se proporciona una bacteria Gram negativa diseñada para la producción de un polisacárido, en la que la bacteria Gram negativa comprende un gen regulador de un complejo genético de polisacárido capsular de una bacteria Gram positiva. En ciertas realizaciones, la bacteria Gram negativa comprende al menos el 25 %, 50 %, 75 %, 85 %, 90 %, o al menos el 95 % de los marcos de lectura abierta del complejo genético del polisacárido capsular. En ciertas realizaciones, la bacteria Gram negativa comprende un complejo genético de polisacárido capsular completo. En ciertas realizaciones, el polisacárido comprende un epítipo del polisacárido capsular.

En ciertas realizaciones, la bacteria Gram negativa del párrafo anterior se selecciona a partir del grupo que consiste en especies de *Escherichia*, *E. coli*, especies de *Shigella*, especies de *Klebsiella*, especies de *Salmonella*, especies de *Yersinia*, especies de *Neisseria*, especies de *Vibrio* y especies de *Pseudomonas*. En una realización específica, la bacteria Gram negativa es *E. coli*.

En ciertas realizaciones, el gen regulador de un complejo genético de polisacárido capsular de una bacteria Gram positiva que se diseña en la bacteria Gram negativa de cualquiera de los párrafos anteriores es un gen regulador de *Streptococcus pneumoniae*. En una realización específica, el gen regulador de *S. pneumoniae* es de *S. pneumoniae* Tipo 1. En una realización específica, el gen regulador de *S. pneumoniae* es de *S. pneumoniae* Tipo 4.

En ciertas realizaciones, el gen regulador de un complejo genético de polisacárido capsular de una bacteria Gram positiva que se diseña en la bacteria Gram negativa de cualquiera de los párrafos anteriores es un gen regulador de *Staphylococcus aureus*. En una realización específica, el gen regulador es un gen regulador de *Staphylococcus agalactiae*.

En ciertas realizaciones, el gen regulador de un complejo genético de polisacárido capsular de una bacteria Gram positiva que se diseña en la bacteria Gram negativa de uno cualquiera de los párrafos anteriores es un gen regulador de *Enterococcus faecalis*.

En ciertas realizaciones, la bacteria Gram negativa de cualquiera de los párrafos anteriores comprende una oligosacaril-transferasa. En una realización específica, la oligosacaril-transferasa es heteróloga para la bacteria Gram negativa.

En ciertas realizaciones, la bacteria Gram negativa de cualquiera de los párrafos anteriores comprende al menos una glucosil-transferasa heteróloga. En una realización específica, la glucosil-transferasa heteróloga es una glucosil-transferasa procariótica. En una realización específica, la glucosil-transferasa se obtiene a partir de las mismas bacterias Gram positivas que el gen regulador.

En ciertas realizaciones, la bacteria Gram negativa de cualquiera de los párrafos anteriores comprende una supresión o inactivación de uno o más genes nativos para la bacteria Gram negativa. En una realización específica, el uno o más genes suprimidos comprenden al gen *waaL*. En una realización específica, el uno o más genes suprimidos comprenden todos los genes asociados con la biosíntesis del antígeno-O en la bacteria Gram negativa.

En ciertas realizaciones, el gen regulador diseñado en la bacteria Gram negativa de cualquiera de los párrafos anteriores es *wzg*, *wzh*, *wzd*, *wze*, *capA*, *capB*, o *capC*.

En ciertas realizaciones, la bacteria Gram negativa de cualquiera de los párrafos anteriores comprende un ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia en consenso para la glucosilación. En una realización específica, el ácido nucleico que codifica la proteína portadora es heterólogo para la bacteria Gram negativa. En una realización específica, la proteína portadora es la exotoxina A destoxificada a partir de *P. aeruginosa*, CRM197, el toxoide de difteria, el toxoide de tétanos, hemolisina A destoxificada de *S. aureus*, factor de aglomeración A, factor de aglomeración B, FimH de *E. coli*, FimHC de *E. coli*, enterotoxina lábil al calor de *E. coli*, variantes destoxificadas de enterotoxina lábil al calor de *E. coli*, subunidad B de toxina de cólera (CTB), toxina de cólera, variantes destoxificadas de toxina de cólera, proteína Sat de *E. coli*, el dominio pasajero de proteína Sat de *E. coli*, AcrA de *C. jejuni*, glucoproteínas naturales de *C. jejuni*, y neumolisina de *S. pneumoniae*. En una realización específica, la proteína portadora es una proteína de *S. pneumoniae*, por ejemplo, neumolisina de *S. pneumoniae*, *S. pneumoniae* NOX, *S. pneumoniae* PspA, *S. pneumoniae* PcpA, *S. pneumoniae* PhtD, *S. pneumoniae* PhtE, *S. pneumoniae* Ply, o *S. pneumoniae* LytB. En una realización específica, la proteína portadora se conjuga con el polisacárido mediante una oligosacaril-transferasa.

- En ciertas realizaciones, el gen regulador diseñado en la bacteria Gram negativa de cualquiera de los párrafos anteriores es un gen regulador correspondiente a uno de los siguientes complejos genéticos de polisacáridos capsulares: de *S. pneumoniae*: CPS1, CPS2, CPS3, CP4, CPS5, CPS6 (A y B), CPS7 (A,B, C), CPS8, CPS9 (A, L,N, V), CPS10 (A,B,C,F), CPS11 (A, B,C,D,F), CPS12(A,B,F), CPS13, CPS14 CPS15(A,B,C,F), CPS16(A,F), CPS17(A,F), CPS18(A,B,C,F), CPS19(A,B,C,F), CPS20,CPS21, CPS22(A,F), CPS23(A,B,F), CPS24(A,B,F), CPS25(A,F), CPS26, CPS27,CPS28(A,F), CPS29, CPS31, CPS32(A,F), CPS33(A,B,C,D,F), CPS34, CPS35(A,B,C,D,F), CPS36, CPS37, CPS38, CPS39, CPS40, CPS41(A,F), CPS42, CPS43, CPS44, CPS45, CPS46, CPS47(A,F), o CPS48; o de *Staphylococcus aureus*: CPS5, o CPS8; de *Streptococcus agalactiae*: (grupo B, GBS) CPSIa, CPSIb, CPSII, CPSIII, CPSIV, CPSV, CPSVI, CPSVII, o CPSVIII; o *Enterococcus faecalis* CPSA, CPSB, CPSC, o CPD.
- En una realización, en el presente documento se proporciona un vector capaz de replicarse en una bacteria Gram negativa, en el que este vector comprende un gen regulador asociado con la biosíntesis de polisacáridos capsulares en una bacteria Gram positiva.
- En ciertas realizaciones, la expresión y actividad de UDP-glucosa:undecaprenil-fosfato glucosa - fosfato transferasa, se incrementa en la bacteria Gram negativa de cualquiera de los párrafos anteriores.
- En ciertas realizaciones, la bacteria Gram negativa de cualquiera de los párrafos anteriores expresa WcaJ codificado por el operón wca de ácido colánico de una enterobacteria común (por ejemplo, *E. coli* W3110).
- En ciertas realizaciones, en el presente documento se proporciona una bacteria Gram negativa diseñada para la producción de un polisacárido, incluyendo una bacteria Gram negativa de cualquiera de los párrafos anteriores, en donde un gen que codifica una enzima Gtr de la bacteria Gram negativa se inactiva funcionalmente. En una realización específica, la inactivación funcional del gen que codifica una enzima Gtr da como resultado la eliminación de la glucosa enlazada a Und-P. En una realización específica, el gen que codifica una enzima Gtr de la bacteria Gram negativa se suprime. En una realización específica, los genes que codifican GtrA, GtrB, y/o GtrS se inactivan funcionalmente. En una realización específica, los genes que codifican GtrA, GtrB, y/o GtrS se suprimen. En una realización específica, la bacteria Gram negativa se selecciona a partir del grupo que consiste en especies de *Escherichia*, *E. coli*, especies de *Shigella*, especies de *Klebsiella*, especies de *Salmonella*, especies de *Yersinia*, y especies de *Pseudomonas*.
- En una realización específica, la bacteria Gram negativa del párrafo anterior comprende una oligosacril-transferasa. En una realización específica, la oligosacril-transferasa es heteróloga para la bacteria Gram negativa.
- En una realización específica, la bacteria Gram negativa de los párrafos anteriores comprende al menos una glucosil-transferasa que es heteróloga para la bacteria Gram negativa. En una realización específica, la glucosil-transferasa es una glucosil-transferasa procariótica.
- En una realización específica, la bacteria Gram negativa de los párrafos anteriores comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de vehículo que comprende una secuencia consenso para la glucosilación. En una realización específica, el ácido nucleico que codifica la proteína portadora es heterólogo para la bacteria Gram negativa. En una realización específica, la proteína portadora es la exotoxina A destoxificada a partir de *P. aeruginosa*, CRM197, el toxoide de difteria, el toxoide de tétanos, hemolisina A destoxificada de *S. aureus*, factor de aglomeración A, factor de aglomeración B, FimH de *E. coli*, FimHC de *E. coli*, enterotoxina lábil al calor de *E. coli*, variantes destoxificadas de enterotoxina lábil al calor de *E. coli*, subunidad B de toxina de cólera (CTB), toxina de cólera, variantes destoxificadas de toxina de cólera, proteína Sat de *E. coli*, el dominio pasajero de proteína Sat de *E. coli*, AcrA de *C. jejuni*, y glucoproteínas naturales de *C. jejuni*. En una realización específica, la proteína de vehículo se conjuga con el polisacárido mediante la oligosacril-transferasa.
- En una realización específica, el polisacárido de la bacteria Gram negativa de los párrafos anteriores es un polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae*.
- En una realización específica, el polisacárido de la bacteria Gram negativa de los párrafos anteriores es un antígeno-O de *E. coli* (O1, O2, O3, O4, O5, O6, O7, O8, O9, O10, O11, O12, O13, O14, O15, O16, O17, O18, O19, O20, O21, O22, O23, O24, O25, O26, O27, O28, O29, O30, O32, O33, O34, O35, O36, O37, O38, O39, O40, O41, O42, O43, O44, O45, O46, O48, O49, O50, O51, O52, O53, O54, O55, O56, O57, O58, O59, O60, O61, O62, O63, O64, O65, O66, O68, O69, O70, O71, O73, O74, O75, O76, O77, O78, O79, O80, O81, O82, O83, O84, O85, O86, O87, O88, O89, O90, O91, O92, O93, O95, O96, O97, O98, O99, O100, O101, O102, O103, O104, O105, O106, O107, O108, O109, O110, O111, O112, O113, O114, O115, O116, O117, O118, O119, O120, O121, O123, O124, O125, O126, O127, O128, O129, O130, O131, O132, O133, O134, O135, O136, O137, O138, O139, O140, O141, O142, O143, O144, O145, O146, O147, O148, O149, O150, O151, O152, O153, O154, O155, O156, O157, O158, O159, O160, O161, O162, O163, O164, O165, O166, O167, O168, O169, O170, O171, O172, O173, O174, O175, O176, O177, O178, O179, O180, O181, O182, O183, O184, O185, O186, O187), *Salmonella* sp (*S. enterica* subsp. *Enterica*, *S. enterica* subsp. *Salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *Diarizoneae*, *S. enterica* subsp. *Houtenae*, *S. bongori*, y *S. enterica* subsp. *Indica*, y los tipos-O 1-67, *Pseudomonas* sp (*P. aeruginosa* o los serotipos 1-20), *Klebsiella* sp. (en particular *K. pneumonia* serotipos O1, O2 (y los subserotipos), O3, O4, O5, O6, O7, O8, O9, O10, O11, O12), los antígenos-O de *Acinetobacter* (en particular los antígenos-O de *A. baumannii*), los antígenos-O de *Chlamidia trachomatis* (los serotipos A, B, C, D, E, F, G, H, I J, K, L1, L2, L3), los antígenos-O de *Vibrio cholera* O1 a

155, *Listeria* sp., en particular *L. monocytogenes* tipos 1, 2, 3, 4 y los subserotipos de los mismos, los antígenos-O de *Legionella pneumophila* serotipos 1 a 15, los antígenos-O de *Bordetella parapertussis*, los antígenos-O de *Burkholderia mallei* y *pseudomallei*, *Francisella tularensis*, *Campylobacter* sp. (*C. jejuni*); los polisacáridos capsulares de *Clostridium difficile* (los serotipos A, G, H, K, S1, S4, D, Cd-5, y *C. perfringens* serotipos A, B, C, D y E), *Staphylococcus aureus* tipos 5 y 8, *Streptococcus pyrogenes* (polisacáridos de serotipos capsulares de estreptococos del grupo B), *E. coli*, *Streptococcus agalacticae* (polisacáridos capsulares de estreptococos del grupo A), *Neisseria meningitidis* (serotipos A, B, C, W y, X), *Candida albicans*, *Haemophilus influenza*, los polisacáridos capsulares tipos I-V de *Enterococcus faecalis*; y otras estructuras de polisacáridos superficiales, por ejemplo, los glucolípidos de *Borrelia burgdorferi*, glucano de pilina-O y lipo-oligosacárido (LOS) de *Neisseria meningitidis*, LOS de *Haemophilus influenza*, lipofosfoglucono de *Leishmania major*, antígenos de carbohidratos asociados con tumores, glucosil-fosfatidil-inositol de malaria, o micobacteria de tuberculosis arabinomannan.

En las realizaciones específicas, en el presente documento se proporciona una glucoproteína recombinante producida por la bacteria Gram negativa de cualquiera de los párrafos anteriores.

En las realizaciones específicas, en el presente documento, se proporciona un procedimiento para la producción de una glucoproteína recombinante, el cual comprende cultivar la bacteria Gram negativa de cualquiera de los párrafos anteriores bajo condiciones adecuadas para la producción de las proteínas. En una realización específica, el procedimiento comprende además purificar la glucoproteína recombinante.

En una realización específica, en el presente documento se proporciona una célula de *E. coli* diseñada, la cual comprende un complejo genético del antígeno-O de *Plesiomonas shigelloides*, en donde se inactiva el gen *wbgW* del complejo genético del antígeno-O, y en donde la célula de *E. coli* produce Und-PP-D-FucNAc4N.

En una realización específica, en el presente documento se proporciona una célula de *E. coli* diseñada, la cual comprende un complejo genético del antígeno-O O17 de *Shigella sonnei* o *Plesiomonas shigelloides* en donde se inactiva el gen *wbgW* del complejo genético del antígeno-O, y en donde la célula de *E. coli* produce Und-PP-D-FucNAc4N.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de conjugados de CPS1 en *E. coli*:

Un objetivo de una realización de la invención es producir los polisacáridos antigénicos CPS tipo 1 en *E. coli*. Como se discute anteriormente, los presentes inventores aprovechan de una manera novedosa la capacidad de *E. coli* para expresar la maquinaria biosintética del complejo de CPS de *S. pneumoniae*.

El ADN del complejo de CPS (tal como se define por la secuencia de ADN entre *dexB* y *aliA*) se ilustra en la Figura 2, y las estructuras de la unidad de repetición de *S. pneumoniae* Tipo 1 se muestran en la Figura 3. La unidad de repetición empieza con un D-FucNAc4N, seguido por dos restos de D-GalA enlazados en los enlaces glicosídicos alfa 1-3 (-4-a-D-GalA-1,3-a-D-GalA-1,3-a-D-FucNAc4N-). Además, la unidad de repetición (RU) está O-acetilada de una manera no estequiométrica (Bentley SD, Aanensen DM, Mavroidi A, Saunders D, Rabinowitsch E, Collins M, Donohoe K, Harris D, Murphy L, Quail MA y col.: Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. PLoS Genetics 2006, 2(3):e31). La secuencia de ADN contiene los genes supuestos que codifican las proteínas para:

i) transporte/regulación (Wzg, Wzh, Wzd, Wze);

ii) las dos glucosil-transferasas más probablemente responsables de la transferencia de los dos restos de GalA (WchBD), como se concluyó a partir de las búsquedas de homologías;

iii) una acetil-transferasa supuesta WchC,

iv) un polimerasa wzy, para la polimerización de las unidades de repetición sobre la hoja externa de la membrana citoplásmica;

v) una flipasa wzx, para deslizar las unidades de repetición individuales desde la hoja interna hasta la hoja externa de la membrana citoplásmica;

vi) dos proteínas que son responsables de la síntesis de D-GalA activado por nucleótido, es decir, Gla y Ugd. Se demostró la síntesis de UDP-D-Gala mediante Gla y Ugd a partir del UDP-Glc de mantenimiento (Munoz R, Lopez R, de Frutos M, Garcia E: First molecular characterization of a uridine diphosphate galacturonate 4-epimerase: an enzyme required for capsular biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* type 1. Mol Microbiol 1999, 31(2): 703-713)

vii) cuatro proteínas RmlACBD que se sabe que elaboran la TDP-L-Rhamnosa. Estos genes son críticos y probablemente sean dosificables para la producción de CPS.

En conjunto, esto significa que se codifican todos los genes necesarios para hacer un CPS tipo 1 en el complejo,

excepto:

a) los genes biosintéticos que codifican las proteínas para la síntesis del azúcar iniciador UDP-D-FucNAc4N;

b) un gen que codifica una transferasa de fósforo-azúcar para agregar el fosfo-D-FucNAc4N al vehículo de lípido Und-P. Para sintetizar el CPS tipo 1 mediante una vía biosintética de LPS modificada, es necesario proporcionar a) y b) en una cepa huésped de *E. coli* de una manera que, mediante la adición del complejo de CPS tipo 1, se pueda sintetizar la cápsula neumocócica de LPS. Las cepas de *E. coli* en términos generales no codifican esas enzimas. Notoriamente, hay solamente unos cuantos microorganismos que se sabe que sintetizan FucNAc4N y lo incorporan en un polisacárido: las cepas de *S. pneumoniae* CP1, *Shigella sonnei*, *Plesiomonas shigelloides* 017, y *Bacterioides fragilis*.

Por consiguiente, los presentes inventores deducen que es necesario encontrar un complejo genético que proporcione dichas funcionalidades. Los presentes inventores lograron esto utilizando los elementos genéticos de la maquinaria biosintética para la síntesis del antígeno-O O17 de *Shigella sonnei* o *Pseudomonas shigelloides*. Ambos de estos organismos sintetizan un antígeno-O con idéntica estructura. Este antígeno-O es un genuino antígeno-O Gram negativo compuesto de un polímero lineal compuesto de una unidad de repetición de disacárido -4-a-L-AltNAcA-1,3-a-D-FucNAc4N-1- (Figura 4) (Batta G, Liptak A, Schneerson R, Pozsgay V: Conformational stabilization of the altruronic acid residue in the O-specific polysaccharide of *Shigella sonnei*/*Plesiomonas shigelloides*. *Carbohydr Res* 1997, 305(1): 93-99). Se demostró que el azúcar iniciador es D-FucNAc4N (Kubler-Kielb J, Vinogradov E, Ben-Menachem gramos, Pozsgay V, Robbins JB, Schneerson R: Saccharide/protein conjugate vaccines for Bordetella species: preparation of saccharide, development of new conjugation procedures, and physico-chemical and immunological characterization of the conjugates. *Vaccine* 2008, 26(29-30): 3587-3593). El complejo genético requerido para la biosíntesis (Figura 5) es codificado en el genoma de *P. shigelloides* y sobre un plásmido de virulencia en *S. sonnei* (Kopecko DJ, Washington O, Formal SB: Genetic and physical evidence for plasmid control of *Shigella sonnei* form I cell surface antigen. *Infection and immunity* 1980, 29(1): 207-214). Las funciones del gen se conocen supuestamente mediante el análisis de homologías (Xu DQ, Cisar JO, Ambulos Jr N, Jr., Burr DH, Kopecko DJ: Molecular cloning and characterization of genes for *Shigella sonnei* form I O polysaccharide: proposed biosynthetic pathway and stable expression in a live salmonella vaccine vector. *Infect Immun* 2002, 70(8): 4414-4423).

Por consiguiente, la estrategia para ensamblar la maquinaria biosintética para la producción de CPS tipo 1 en *E. coli* fue como sigue:

Primero, los presentes inventores tuvieron como objetivo reconstituir la vía de producción de Und-PP-D-FucNAc4N. Para lograr esto, expresaron de una manera recombinante el complejo del antígeno-O de *P. shigelloides* en *E. coli*.

Segundo, suprimieron la glucosil-transferasa de L-AltNAcA a partir del complejo O17 de *P. shigelloides*, lo cual dio como resultado un precursor de lípido truncado Und-PP-D-FucNAc4N.

Tercero, los presentes inventores agregaron el complejo de CPS tipo 1 sobre un plásmido. Se creía que las enzimas codificadas en este plásmido extendían el precursor de Und-PP-D-FucNAc4N hecho por el sistema de *P. shigelloides* para completar la unidad de repetición (RU) de CPS tipo 1 y polimerizar las unidades de repetición (RUs) para hacer un LPS modificado.

Técnicamente, esto se hizo como sigue:

En una primera etapa, los presentes inventores clonaron el complejo genético del antígeno-O de *P. shigelloides* (*rfbP.shigelloides* O17) en el plásmido donador pDOC-C (Lee DJ, Bingle LE, Heurlier K, Pallen MJ, Penn CW, Busby SJ, Hobman JL: Gene doctoring: a method for recombinering in laboratory and pathogenic *Escherichia coli* strains. *BMC Microbiol* 2009, 9: 252). Utilizando este plásmido donador y un plásmido auxiliar que codificaban una recombinasa y una endonucleasa (Kuhlman TE, Cox EC: Site-specific chromosomal integration of large synthetic constructs. *Nucleic acids research* 2010, 38(6): e92), intercambiaron el complejo *rfb* de una cepa de *E. coli* W3110 Δ wecA Δ wzzECA Δ waaL por el complejo de *P. shigelloides* (*wzz* a *wbgZ*, Figura 5) a partir del plásmido mediante recombinación homóloga. Véase, por ejemplo, la Solicitud Internacional del TCP Número PCT/EP2013/071328, la cual se incorpora a la presente como referencia en su totalidad. La cepa cromosómicamente integrada resultante elabora el antígeno-O recombinante, el cual es reactivo al suero de tipificación anti-*S. sonnei* en el análisis por transferencia de Western.

El gen *wbgW* codificado dentro de este complejo de *P. shigelloides* integrado se suprimió del cromosoma mediante recombinación homóloga de acuerdo con el procedimiento de Datsenko y Wanner (Datsenko KA, Wanner BL: One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 2000, 97(12): 6640-6645). La cepa resultante ya no produjo más ningún polisacárido enlazado con lípido específico anti-*S. sonnei*, más probablemente debido a la incapacidad de la cepa para hacer una unidad de repetición de disacárido completa.

A continuación, el complejo de CPS 1 de *wzg* a *ugd* (Figura 2) se clonó detrás de un promotor artificial (J23103, http://partsregistry.org/Part:BBa_J23103), y un sitio de enlace ribosomal óptimo activo en *E. coli*.

La expresión del sistema genético descrito en un cultivo en un matraz de agitación para el análisis de la biosíntesis de

oligosacáridos enlazados a lípidos generó un patrón de bandas en forma de escalera en el análisis por transferencia de Western utilizando un antisuero específico anti-CPS tipo 1 (Figura 6). Esto muestra que la vía de biosíntesis de LPS modificada estaba colaborando en la expresión recombinante del CPS del tipo 1 de *S. pneumoniae*.

Con el fin de proporcionar adicionalmente evidencias de que el reactivo producido del material resistente a la proteasa era realmente el CPS tipo 1 enlazado al pirofosfato de undecaprenilo, se aplicó una prueba de sensibilidad al ácido a las muestras de la Figura 6. El tratamiento ácido suave con ácido trifluoro-acético abrogó la señal anti-CPS tipo 1, indicando la presencia del enlace de pirofosfato que conecta el polisacárido y el undecaprenilo (Figura 7). Los presentes inventores descubrieron que era posible hacer un antígeno-O modificado en la presencia de los genes transportadores *wzg-wzd*. Con el fin de verificar si estos genes tenían un efecto directo, suprimieron los cuatro genes transportadores del plásmido del CPS tipo 1 mediante recombinación homóloga (Bloor AE, Cranenburgh RM: An efficient method of selectable marker gene excision by Xer recombination for gene replacement in bacterial chromosomes. *Applied and environmental microbiology* 2006, 72(4): 2520-2525). La coexpresión del plásmido modificado conduce de una manera sorprendente a una pérdida de la señal anti-CPS tipo 1 (Figura 8). Esto indica que se requieren los genes transportadores para la producción eficiente del antígeno-O modificado.

Con el fin de mostrar que se puede utilizar el CPS tipo 1 recombinante para la glucosilación de las proteínas y, por consiguiente, para la formación de los conjugados de proteína-carbohidrato, los presentes inventores probaron la maquinaria de glucosilación de proteínas bacterianas (Wacker M, Linton D, Hitchen PG, Nita-Lazar M, Haslam SM, North SJ, Panico M, Morris HR, Dell A, Wren BW y col.: N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science* 2002, 298(5599): 1790-1793) para determinar la capacidad de producción de conjugados en cepas de *E. coli* recombinante adecuadas.

Se llevó a cabo un experimento utilizando el sistema de N-glucosilación documentado en (Feldman MF, Wacker M, Hernandez M, Hitchen PG, Marolda CL, Kowarik M, Morris HR, Dell A, Valvano MA, Aebi M: Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 2005, 102(8): 3016-3021; Kowarik M, Young NM, Numao S, Schulz BL, Hug I, Callewaert N, Mills DC, Watson DC, Hernandez M, Kelly JF y col.: Definition of the bacterial N-glycosylation site consensus sequence. *The EMBO Journal* 2006, 25(9): 1957-1966; Wacker M, Linton D, Hitchen PG, Nita-Lazar M, Haslam SM, North SJ, Panico M, Morris HR, Dell A, Wren BW y col.: N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science* 2002, 298(5599): 1790-1793; Ihssen J, Kowarik M, Dilettoso S, Tanner C, Wacker M, Thony-Meyer L: Production of glycoprotein vaccines in *Escherichia coli*. *Microbial cell factories* 2010, 9: 61). La *E. coli* recombinante que expresó el oligosacárido enlazado a lípido de CPS tipo 1 se transformó con dos plásmidos inducibles. Un plásmido codificó la enzima PglB, la cual se muestra repetidamente que N-glucosila en general las proteínas aceptoras (que codifican una secuencia de aminoácidos en consenso del tipo -D/E-x-N-x-S/T-, en donde x no puede ser prolina). Sobre el segundo plásmido, se codificó la proteína portadora EPA, la cual contiene dos secuencias en consenso de N-glucosilación insertadas, y una marca-His para la purificación de cromatografía de afinidad con Ni. Después del experimento de glucosilación, la proteína EPA se purificó y se sondeó con un antisuero anti-marca-His (Figura 9, panel A) y un antisuero anti-CPS tipo 1 (Figura 9, panel B), y se detectó claramente en las fracciones de la elución. Esto prueba que el sistema PglB en conjunto con el sistema de expresión de CPS tipo 1 recombinante, permite tener una producción eficiente de conjugados de proteínas que se pueden utilizar como candidatos de vacunas anti-neumocócicas.

Ejemplo 2: Síntesis de CPS4 conjugados in *E. coli*:

Para demostrar adicionalmente que se puede utilizar la glucosilación de proteínas para producir vacunas de conjugados activos, nos pusimos como objetivo producir un conjugado del CPS tipo 4 en la presencia de los genes transportadores para el CPS1.

El CPS4 tiene una estructura de unidad de repetición que contiene un GalNAc en el extremo reductor (Figura 10). La estructura completa es: -1,4-(2,3 S pyr)-a-D-Gal-1,3-a-D-ManNAc-1,3-a-L-FucNAc-1,3-a-D-GalNAc

A diferencia del complejo genético del CPS1, el complejo que codifica el CPS tipo 4 a partir de *S. pneumoniae* codifica todas las enzimas necesarias para sintetizar un CPS4 (Figura 11). UDP-D-FucNAc y UDP-D-ManNAc son hechas por las proteínas MnaA, FnlA, B, y C. Se predicen las funciones de diferentes glucosil-transferasas basándose en sus homología con otras glucosil-transferasas con especificidades conocidas. *WciI* es una transferasa de glucosil-fosfato predicha y, por consiguiente, es responsable de la síntesis de Und-PP-D-GalNAc, *WciJ*, K, y L son transferasas de D-ManNAc, L-FucNAc, y D-Gal, y *WciM* es un homólogo de transferasas de piruvato (Jiang SM, Wang L, Reeves PR: Molecular characterization of *Streptococcus pneumoniae* type 4, 6B, 8, and 18C capsular polysaccharide gene clusters. *Infect Immun* 2001, 69(3): 1244-1255).

Con el fin de reconstruir una vía modificada de CPS4 en *E. coli*, los presentes inventores primero clonaron el complejo genético de CPS4 (los genes entre *aliA* y *dexB*) en un plásmido para la expresión en *E. coli*, dando como resultado el pGVXN803. En un segundo establecimiento, incluyeron solamente los genes aguas abajo de los genes transportadores (dando como resultado el pGVXN753), es decir, *wciJ-fnlC*, con el fin de analizar explícitamente los efectos de *wzg*, *wzh*, *wzd*, y *wze*, así como el efecto de la supresión de *wciI*. *WciI* es un homólogo de transferasa de fósforo-azúcar de acuerdo con el análisis bioinformático. Hay actividades similares presentes en *E. coli*,

específicamente el gen *wecA* codificado en el complejo del antígeno enterobacteriano común (ECA). En pGVXN753, incluyeron una secuencia promotora artificial corriente arriba de los múltiples sitios de clonación para asegurar la transcripción de los genes insertados.

Con el fin de analizar los efectos de los plásmidos anteriormente mencionados sobre la expresión en *E. coli*, los presentes inventores transformaron las células W3110 $\Delta waaL$ con pGVXN753 y pGVXN803. W3110 $\Delta waaL$ codifica la proteína WecA que es responsable de la síntesis de Und-PP-D-GlcNAc, pero es incapaz de hacer el Und-PP-D-GalNAc. Éste último monosacárido enlazado a lípido es el sustrato esperado para las enzimas del complejo de CPS4 que debe completar la unidad de repetición (RU) del CPS4. Por consiguiente, proporcionaron, además de un plásmido del complejo de CPS4, dos diferentes epimerasas de D-GlcNAc a D-GalNAc, Z3206 (Rush JS, Alaimo C, Robbiani R, Wacker M, Waechter CJ: A novel epimerase that converts GlcNAc-P-P-undecaprenyl to GalNAc-P-P-undecaprenyl in *Escherichia coli* O157. *J Biol Chem* 2010, 285(3): 1671-1680), y GalE (Linton D, Dorrell N, Hitchen PG, Amber S, Karlyshev AV, Morris HR, Dell A, Valvano MA, Aebi M, Wren BW: Functional analysis of the *Campylobacter jejuni* N-linked protein glycosylation pathway. *Mol Microbiol* 2005, 55(6): 1695-1703). Ambos genes codifican proteínas que permiten hacer la síntesis de D-GalNAc *in vivo*, el primero mediante la epimerización del D-GlcNAc enlazado a lípido (Und-PP-D-GlcNAc $\leftrightarrow$ Und-PP-D-GalNAc), y el último utilizando el azúcar activado por nucleótido como sustrato (UDP-D-GlcNAc $\leftrightarrow$ UDP-D-GalNAc).

La Figura 12 muestra los resultados del análisis. Las células se cultivaron, y se indujo la expresión de epimerasa, y se separó la biomasa resistente a la proteasa mediante SDS-PAGE, y se analizó mediante inmunodetección después de transferir los glucolípidos a la membrana de nitrocelulosa. Los resultados muestran que siempre que estuvo presente pGVXN803 en las células, hubo una señal de tipo escalera detectada por el anticuerpo anti-CPS4. pGVXN753 también indujo una señal, aunque mucho más débil que las construcciones que contenían los genes transportadores y *wciI*. La inducción y la naturaleza de la epimerasa tuvieron una influencia marginal sobre la fuerza de la señal. Se obtuvo la reactividad más fuerte con pGVXN803 y la epimerasa específica para el azúcar activado por nucleótido, sugiriendo que *WciI* es una transferasa de D-GalNAc-fosfato. Por consiguiente, de una manera sorprendente, como para el CPS1, los genes transportadores son importantes para la producción eficiente del LPS modificado por CPS4 en *E. coli*. Para disectar la influencia de los genes transportadores contra *wciI*, se puede emplear la coexpresión de *wciI* en la presencia de pGVX753. Más probablemente, *wciI* solo es incapaz de mejorar la expresión de CPS4 hasta el nivel observado en la presencia de los genes transportadores (es decir, en W3110 $\Delta waaL$ que contiene pGVX803).

Con el objeto de caracterizar adicionalmente el CPS4 producido en *E. coli*, los presentes inventores expresaron pGVXN803 en *E. coli* SCM6 (Schwarz F, Huang W, Li C, Schulz BL, Lizak C, Palumbo A, Numao S, Neri D, Aebi M, Wang LX: A combined method for producing homogeneous glycoproteins with eukaryotic N-glycosylation. *Nat Chem Biol* 2010; SCM6 se suprime in *wecA*, ECA, *waaL*), y analizaron los glucolípidos mediante marcado con 2-AB y análisis de MS/MS. El marcado con 2-AB es un procedimiento que se desarrolló para aislar, hidrolizar y modificar poli- y oligosacáridos, y para analizarlos mediante HPLC y MS/MS. Las células se cultivaron durante la noche, y se prepararon y procesaron de acuerdo con un procedimiento establecido (Documento US2011/0274720).

Brevemente, los glucolípidos se extrajeron a partir de la biomasa mediante disolventes orgánicos (Cloroformo : Metanol : Agua, 10:10:3), y se purificaron sobre cartuchos C18; los eluatos se trataron con ácido trifluoro-acético (TFA) en agua/ isopropanol para hidrolizar los enlaces de pirofosfato y liberar la parte de glucano de los Und-PP-glucanos. La solución resultante se pasó sobre otro cartucho C18 para remover los lípidos. El flujo atravesado se secó y los glucanos se marcaron con 2-amino-benzamida en el extremo de reducción. Los glucanos marcados resultantes se separaron mediante HPLC utilizando una columna en fase normal glylosepN, y se detectaron mediante fluorescencia (Documento US2011/ 0274720 A1).

Los cromatogramas resultantes se muestran en la Figura 13 (panel A). La comparación de un cromatograma obtenido a partir de células SCM6 que contienen o que carecen de pGVXN803, muestran varios picos que están presentes en el primero pero que faltan en el último. Algunos de éstos se analizaron mediante MS/MS para la identificación de la identidad y secuencia del glucano. Para varios picos, fue posible identificar los patrones de MS/MS que son consistentes con la RU de CPS4 esperada y con las estructuras poliméricas (indicadas por flechas). El Panel B de la Figura 13 muestra el espectro de MALDI-MS/MS a partir del pico eluido a los 53,8 minutos. Las series de iones de fragmentación son consistentes con la RU de CPS4 modificada con piruvato en la hexosa no reductora.

Los presentes inventores observaron heterogeneidad debido a la presencia no estequiométrica del piruvato, que indica ya sea una modificación no cuantitativa de las unidades de repetición de CPS4 con piruvato, o bien una hidrólisis durante la preparación de las muestras. Los presentes inventores concluyeron, a partir de los datos, que fueron capaces de generar una vía biosintética de LPS modificada que produce glucanos de CPS4 sobre Und-PP.

Con el objeto de analizar adicionalmente los glucolípidos de CSP4, extrajeron glucolípidos a partir de *E. coli* cepa SCM3, (Faridmoayer A, Fentabil MA, Mills DC, Klassen JS, Feldman MF: Functional characterization of bacterial oligosaccharyltransferases involved in O-linked protein glycosylation. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* 2007, 189(22): 8088-8098) que expresaban CSP4, y los analizaron como se describe anteriormente (Figura 14), o utilizaron directamente los glucolípidos para la glucosilación *in vitro*. En este experimento, se mezclan los glucolípidos, un péptido aceptor que contiene la secuencia en consenso de N-glucosilación, y la preparación purificada de la oligosacril-transferasa PglB (Jervis AJ, Butler JA, Lawson AJ, Langdon R, Wren BW, Linton D: Characterization of

the structurally diverse N-linked glycans of *Campylobacter* species. JOURNAL OF BACTERIOLOGY 2012, 194(9): 2355-2362). Se forman glucopéptidos, los cuales se pueden analizar mediante una cromatografía HILIC, seguida por ESI-MS/MS (Figura 15, paneles A y B) para la secuenciación del glucano. Cuando se analizaron los productos a partir de este experimento, se identificaron exclusivamente los glucanos piruvilatados unidos a los péptidos (Figura 15, paneles C y D). Por consiguiente, la piruvilatación no estequiométrica observada en las Figuras 13 y 14 más probablemente se originó a partir de la hidrólisis de piruvato a partir del glucano durante la preparación de la muestra en lugar de la decoración no cuantitativa de la RU de CPS4. Por consiguiente, los presentes inventores reivindican que, mediante la vía de biosíntesis de LPS modificada, es posible producir un CPS en condiciones nativas, permitiendo la síntesis de un conjugado activo y posiblemente mejor comparándose con la conjugación química.

Para probar esta hipótesis, los presentes inventores tuvieron como objetivo probar el glucoconjugado en ensayos preclínicos. En una primera etapa, los presentes inventores utilizaron la fermentación microbiana para producir el CPS4 conjugado con una proteína portadora genérica, la Exotoxina A genéticamente destoxificada de *Pseudomonas aeruginosa* (EPA, US2011/0274720 A1). La *E. coli* W3110 $\Delta waaL$ se transformó con pGVXN539 (que expresa la proteína de vehículo EPA que codifica las secuencias consenso de glucosilación 2 N (Documento US2011/0274720 A1) y *dyx*, se clonó en pACT3 (GenBank: U51556.1), en el que el casete de *clmR* se reemplazó por un casete de resistencia a la kanamicina (*kanR*); pGVXN114 (expresión inducible de PglB, documento US2011/0274720 A1), pGVXN207 (expresión inducible de GalE, (Rush JS, Alaimo C, Robbiani R, Wacker M, Waechter CJ: A novel epimerase that converts GlcNAc-P-P-undecaprenyl to GalNAc-P-P-undecaprenyl in *Escherichia coli* O157. J Biol Chem 2010, 285(3): 1671-1680), y pGVXN803 (que codifica el complejo de CPS4). Las células se cultivaron en el medio TB, y se indujeron en las OD adecuadas, y la producción se llevó a cabo durante la noche. La EPA marcada con His se purificó a partir de los extractos periplásmicos preparados mediante la extracción periplásmica utilizando lisozima seguida por IMAC. Los ensayos analíticos de las fracciones de la elución se muestran en la Figura 16. SDS-PAGE y la tinción con Coomassie muestran la EPA no glucosilada y glucosilada en 70 y por encima de 70 kDa, estando la última presente en un patrón de tipo de escalera que indica un glucano de antígeno-O (modificado) compuesto de unidades de repetición (RU) (Figura 16, panel A). La inmunodetección mediante anti-His (Figura 16, panel B), y anti-CPS4 (Figura 16, panel C), después de electrotransferirse a las membranas de nitrocelulosa de las mismas fracciones, confirmó la presencia de CPS4 y EPA en el material.

Los glucoconjugados se purificaron adicionalmente mediante cromatografía de intercambio de aniones para la separación de la EPA no glucosilada y glucosilada; entonces la glucoproteína se purificó adicionalmente mediante cromatografía con exclusión de tamaños. La preparación de glucoproteína resultante se analizó para determinar la composición del monosacárido utilizando derivación mediante 1-fenil-3-metil-5-pirazolona (PMP, Lv L, Yang X, Zhao Y, Ruan Y, Yang Y, Wang Z: Separation and quantification of component monosaccharides of the tea polysaccharides from *Gynostemma pentaphyllum* by HPLC with indirect UV detection. Food Chemistry 2009, 112: 742-746), la cual demostró que la composición de glucano del glucoconjugado recombinante es idéntica a aquella del CPS4 aislado a partir de *S. pneumoniae* (Figura 17).

Con el fin de probar la actividad de la vacuna de los glucoconjugados, se llevaron a cabo estudios de inmunización y de opsonofagocitosis (OPA). La OPA es un ensayo generalmente reconocido para resolver la funcionalidad de los anticuerpos para eliminar las células de *S. pneumoniae*, y es un subrogado para la protección. Inmunizamos conejos con diferentes dosis del conjugado de EPA-CPS4. Como un control, los presentes inventores utilizaron Prevenar 13, un producto concedido en licencia y comercializado ampliamente utilizado para la prevención de la enfermedad neumocócica pediátrica. Los antisueros resultantes se sometieron a análisis mediante Dot blot para determinar la inmunogenicidad (Figura 18), y OPA para determinar la funcionalidad de acuerdo con un protocolo estandarizado (Romero-Steiner S, Frasch CE, Carlone G, Fleck RA, Goldblatt D, Nahm MH: Use of opsonophagocytosis for serological evaluation of pneumococcal vaccines. Clin Vaccine Immunol 2006, 13(2): 165-169).

La Tabla 1 muestra las titulaciones opsonicas relevantes obtenidas. Los resultados muestran que los glucoconjugados hechos de una manera recombinante en *E. coli* son igualmente buenos y en algunos casos incluso superiores al comparador de vacuna concedido en licencia, en términos de su capacidad para reproducir los antisueros activos en el ensayo opsonofagocítico.

Ejemplo 3: Síntesis de conjugados de CPS14 en *E. coli*:

Con el objeto de mostrar adicionalmente que *E. coli* se puede utilizar para la producción de conjugados de CPS, tuvimos como objetivo la producción de conjugados de CPS14. El polisacárido CPS14 es codificado por el complejo de CPS14 (Figura 19) en una arquitectura similar a las de CPS1 y CPS4. CPS14 consiste en unidades de repetición (RU) polimerizadas con la siguiente estructura: (Figura 20): -1,6-(b-D-Gal-1,4)-b-D-GlcNAc-1,3-b-D-Gal-1,4-b-D-Glc-.

La biosíntesis del CPS14 empieza con la adición de fosfo-D-Glc al undecaprenil-fosfato (Und-P), mediante la actividad de WchA. Se demostró bioquímicamente que WchA es una transferasa de fosfo-glucosa, con una actividad idéntica a aquella de la proteína WcaJ de *E. coli* codificada por un gen en el complejo del ácido colánico. Se logra un alargamiento adicional de D-Glc mediante las acciones enzimáticas de las otras glucosil-transferasas presentes en el complejo (Kolkman MA, van der Zeijst BA, Nuijten PJ: Functional analysis of glycosyltransferases encoded by the capsular polysaccharide biosynthesis locus of *Streptococcus pneumoniae* serotype 14. J Biol Chem 1997, 272(31): 19502-19508). Se predicen funciones detalladas de los diferentes marcos de lectura abierta (ORFs) en el complejo de CPS14

para *wzg*, *wzh*, *wzd*, *wze* (regulador, y 3 genes de transporte asociados), *WchJK* (transferasa de D-Gal), *WchL* (transferasa de D-GlcNAc), *WchM* (transferasa de D-Gal), *Wzy* (polimerasa), *Wzx* (flipasa). *WciY* es dispensable para la formación del CPS14, mientras que la supresión de *wchN* tiene una influencia negativa sobre los rendimientos de CPS14 (Kolkman MA, Wakarchuk W, Nuijten PJ, van der Zeijst BA: Capsular polysaccharide synthesis in *Streptococcus pneumoniae* serotype 14: molecular analysis of the complete *cps* locus and identification of genes encoding glycosyltransferases required for the biosynthesis of the tetrasaccharide subunit. *Mol Microbiol* 1997, 26(1): 197-208). El complejo de CPS14 es especial en el sentido de que hay más funciones codificadas que las mínimamente requeridas para la biosíntesis del CPS14. Muy probablemente, algunas de las proteínas con funciones no asignadas son enzimas auxiliares que soportan la biosíntesis de la cápsula.

Con el objeto de probar la producción del polisacárido CPS14 en *E. coli*, el complejo genético de CPS14 consistente en el tramo de *wchA* a *wciY*, se clonó en el plásmido donador pDOC (Lee DJ, Bingle LE, Heurlier K, Pallen MJ, Penn CW, Busby SJ, Hobman JL: Gene doctoring: a method for recombineering in laboratory and pathogenic *Escherichia coli* strains. *BMC Microbiol* 2009, 9: 252) designado para la integración del CPS14 en el complejo del antígeno O16 (pGVXN615), y se transformó en *E. coli* cepa GVXN1128 (W3110 $\Delta waaL$). El análisis de inmunotransferencia de las células de *E. coli* digeridas por proteinasa K que alojaban el pGVXN615, mostró un patrón en forma de escalera, el cual se detectó con el antisuero de CPS14 que se utiliza para la serotipificación capsular de los aislados clínicos de CPS14 (inserto de la Figura 21, panel A). Adicionalmente, para acumular una sola unidad de repetición, la polimerasa del complejo de CPS14, *wzy*, se suprimió en el pGVXN615 mediante mutagénesis de transposón, dando como resultado el pGVXN643. Los glucolípidos se extrajeron a partir de las células de *E. coli* transformadas con pGVXN643, y se analizaron mediante NP-HPLC después de la hidrólisis y del marcado fluorescente, como se describe anteriormente. Un pico específico se eluyó a los 57.4 minutos (Figura 21, panel A) a partir de la columna de glucosepN. El análisis de MS y MS/MS de este pico concordó con la masa y el patrón de fragmentación esperados de una sola unidad de repetición de CPS14 (Figura 21, panel B). Esto confirma que la expresión de un complejo genético de CPS14 parcial bajo el control de un promotor de antígeno-O, puede conducir a una producción de oligosacárido CPS14 biosintético de LPS recombinante en una célula hospedadora de *E. coli* común.

Con el objeto de mejorar y estabilizar la biosíntesis del polisacárido CPS14 en *E. coli*, parte del complejo de CPS14 que contenía el tramo de *wchA* a *wciY*, se clonó en el plásmido de reemplazo pDOC-C (Lee DJ, Bingle LE, Heurlier K, Pallen MJ, Penn CW, Busby SJ, Hobman JL: Gene doctoring: a method for recombineering in laboratory and pathogenic *Escherichia coli* strains. *BMC Microbiol* 2009, 9: 252), designado para la integración de CPS14 en el complejo de ácido colánico de *E. coli* (pGVXN710). La integración de CPS14 se completó en varias cepas de *E. coli*, incluyendo GVXN1052 (W3110), GVXN1128 (W3110 $\Delta waaL$), y GVXN1716 (W3110 $\Delta waaL \Delta wecA$ -wzzE), como se describen anteriormente. Se ha demostrado que los genes de ácido colánico no son expresados en *E. coli* bajo condiciones normales, y su expresión es controlada por una compleja red de reguladores. Se identificó que la transcripción del ácido colánico requiere de RcsA, un regulador positivo (Ebel W, Trempey JE. *J Bacteriol.* 1999; 181(2): 577-84). El análisis de inmunotransferencia de las cepas de *E. coli* digeridas por proteinasa K, en donde el complejo de ácido colánico fue reemplazado por el complejo de CPS14 que aloja un plásmido para la expresión de RcsA (pGVX688), mostró un patrón en forma de escalera detectado por el antisuero de CPS14, el cual se utilizó para la serotipificación de los aislados clínicos de CPS14; este patrón no fue detectable en ausencia de RcsA (véase la Figura 22). Este resultado demuestra que el ácido colánico es un sitio diana adecuado para integrar las vías biosintéticas del polisacárido, y que la expresión del polisacárido heterólogo es estrechamente controlada por la proteína RcsA de *E. coli*.

Con el fin de caracterizar adicionalmente el CPS14 producido en *E. coli*, el GVX6129 (W3110 $\Delta waaL$ CA::CPS14) se transformó en *E. coli* junto con pGVXN688 (*rcaA*). Los glucolípidos se analizaron mediante marcado con 2-AB y análisis de MS/MS, como se describe anteriormente. El análisis de MS/MS identificó 2 y 3 subunidades de CPS14, eluidas a los 95,9 minutos y 115,3 minutos, respectivamente (véase la Figura 24).

Para probar el efecto de la expresión de los genes transportadores sobre la producción del polisacárido CPS14 en *E. coli*, de *wzg* a *wze* del complejo de CPS14 de *S. pneumoniae* CPS14, que contenía los genes transportadores, se clonó en un plásmido de bajo número de copias con el promotor inducible por IPTG (pGVX 72), para formar el pGVX1497. El plásmido se transformó en *E. coli* cepa GVX6126 (*E. coli* W3110 CA::CPS14), a partir de la cual, la porción de *wchA* a *wciY* del complejo de CPS14 se integró en el ácido colánico de *E. coli*. El GVX6126 se transformó con pGVX72 o pGVX1497 y se cultivó, con la inducción de la expresión del gen transvehículo utilizando IPTG 0.01 mM. Las células de *E. coli* se cosecharon después de la incubación durante la noche, y se digirieron con proteinasa K, y se separó una biomasa resistente a la proteasa mediante SDS-PAGE, y se analizó mediante inmuno-detección después de transferir los glucolípidos a la membrana de nitrocelulosa. Los resultados muestran que, en la presencia de pGVXN1497 (que expresa *wzg-wzh-wzd-wze*), se detectó una señal en forma de escalera de alto peso molecular mediante el antisuero anti-CPS14 (véase Figura 23. Carril 3), y cuando el pGVXN1497 fue reemplazado con un vector vacío (pGVX72), se redujo significativamente el tamaño de la escalera (véase la Figura 23. Carril 2). Esto demuestra un requerimiento subyacente de los genes transportadores para la producción de CPS.

El operón *gtrABS* está involucrado en la síntesis de glucosa sobre Und-P, un compuesto celular que es muy similar al paso iniciador nativo para el CPS14 (sintetizado por *wchA*), Und-PP. El operón *gtrABS* contiene genes que codifican las enzimas involucradas en el ensamble de la glucosa sobre el Und-P en el citoplasma, deslizando el glucolípido en el periplasma, y una glucosil-transferasa que utiliza Und-P-glucosa como un donador para transferir el resto de glucosa

sobre el extremo de reducción GlcNAc de la subunidad O16 en *E. coli* W3110 .

Con el objeto de impedir la producción de dos precursores de lípido con D-Glc, y para producir exclusivamente Und-PP-CPS14 y no Und-P-CPS14, se puede utilizar una enzima que solamente elabore la Und-PP-glucosa como la glucosa iniciadora. En adición, se puede suprimir la vía de producción de Und-P-glucosa. De esta manera, todos los CPS se enlazan a Und mediante un enlace de pirofosfato y, por consiguiente, están disponibles para la glucosilación.

Con el fin de elucidar adicionalmente y optimizar la vía biosintética del CPS14 en *E. coli*, se puede mejorar la actividad de glucosil-transferasa iniciadora de la vía de CPS14. Esto se exploró mediante la supresión de *wchA* y *wcaJ*, y complementándolos con estrategias de sobreexpresión surgida del plásmido, utilizando los mismos genes, y analizando los efectos sobre la producción de glucolípido.

Un plásmido que contenga el gen *wcaJ* bien se puede transformar en cepas de *E. coli* cepas que contengan CPS14 pero que carezcan de *WchA* y *WcaJ* (por ejemplo, W3110 $\Delta waaL \Delta rfbO16::CPS14-clmR \Delta wchA \Delta gtrABS$). Empleando los procedimientos establecidos, se puede analizar la producción de azúcar en estas cepas. Basándose en estos resultados, se podría determinar la combinación óptima de genes para la producción de la máxima cantidad de CPS14 enlazado a Und-PP, y se utilizaría para transformar *E. coli*, generando la cepa de producción óptima. Ciertamente, esta novedosa cepa de *E. coli* con una producción superior de azúcar, podría ser ideal para enriquecer la producción de proteínas glucosiladas, tanto N- como O-glucosiladas. Más aún, esta cepa recién diseñada se podría utilizar para generar diferentes glucoconjugados, si adicionalmente: se incluyen diversos vehículos de proteína en la cepa de producción de cualquier glucoconjugado que contenga Glc en el extremo de reducción.

ID Conejo	Tratamiento	Índice Opsónico	
		preimmune	postimmune
SZ 3415	2 µg CPS4-EPA / Alum	< 8	2719
SZ 3416		< 8	777
SZ 3417	10 µg CPS4-EPA / Alum	< 8	1111
SZ 3418		< 8	2215
SZ 3419	10 µg CPS4-EPA / FCA-FIA	< 8	29068
SZ 3420		< 8	187543
SZ 3421	FCA-FIA solamente	< 8	< 8
SZ 3422		< 8	< 8
SZ 3423	Prevna-13	< 8	2753
SZ 3424		< 8	169

Tabla 1: Los conejos "Blancos Nueva Zelanda" se inmunizaron en el día 0, el día 21 y el día 42 con las vacunas glucoconjugadas indicadas (observe que la cantidad mencionada en microgramos se refiere a la cantidad de polisacárido/inyección) por medio de la vía subcutánea. Las vacunas glucoconjugadas tuvieron un adyuvante de Al³⁺ al 0.12 % para las tres inmunizaciones, o bien estuvieron con Adyuvante Completo de Freund (FCA) para la primera inmunización (d0), y con Adyuvante Incompleto de Freund (FIA) para la dos inmunizaciones de refuerzo (d21 y d42). Se utilizó Prevna-13 de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes, y se inyectó una dosis humana (correspondiente a 2.2 microgramos del polisacárido CPS4) por inmunización. Los animales se sacrificaron en el día 56, y el suero obtenido se analizó para determinar la actividad neutralizante en un ensayo de aniquilación por opsonofagocitosis (OPK). El "Índice Opsónico" se define como la dilución de suero que aniquila al 50 % de las bacterias (serotipo neumocócico 4).

REIVINDICACIONES

1. Una bacteria Gram negativa diseñada para la producción de una glucoproteína recombinante, en la que la bacteria Gram negativa comprende (a) glucosiltransferasas para producir un polisacárido capsular de una bacteria Gram positiva (b) una oligosacaril transferasa que es heteróloga para la bacteria Gram negativa, y (c) un ácido nucleico que codifica una proteína de vehículo que comprende una secuencia consenso para la glucosilación, en donde un gen que codifica una enzima Gtr de la bacteria Gram negativa está funcionalmente inactivado.
2. La bacteria Gram negativa de la reivindicación 1, en la que la inactivación funcional del gen que codifica una enzima Gtr da como resultado la eliminación de la glucosa enlazada a Und-P.
3. La bacteria Gram negativa de la reivindicación 1, en la que el gen que codifica una enzima Gtr de la bacteria Gram negativa está deletado.
4. La bacteria Gram negativa de la reivindicación 1 o 3, en la que los genes que codifican GtrA, GtrB y/o GtrS están funcionalmente inactivados.
5. La bacteria Gram negativa de la reivindicación 4 en la que los genes que codifican GtrA, GtrB y/o GtrS están deletados.
6. La bacteria Gram negativa de la reivindicación 1, en la que dicha bacteria Gram negativa se selecciona a partir del grupo que consiste en especies de *Escherichia*, *E. coli*, especies de *Shigella*, especies de *Klebsiella*, especies de *Salmonella*, especies de *Yersinia* y especies de *Pseudomonas*.
7. La bacteria Gram negativa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el ácido nucleico que codifica la proteína de vehículo es heterólogo para la bacteria Gram negativa.
8. La bacteria Gram negativa de la reivindicación 7, en la que dicha proteína de vehículo es la exotoxina A destoxificada de *P. aeruginosa*, CRM197, el toxoide de difteria, el toxoide de tétanos, hemolisina A destoxicada de *S. aureus*, factor de aglomeración A, factor de aglomeración B, FimH de *E. coli*, FimHC de *E. coli*, enterotoxina lábil al calor de *E. coli*, variantes destoxificadas de enterotoxina lábil al calor de *E. coli*, subunidad B de toxina de cólera (CTB), toxina de cólera, variantes destoxificadas de toxina de cólera, proteína Sat de *E. coli*, el dominio pasajero de proteína Sat de *E. coli*, AcrA de *C. jejuni*, y glucoproteínas naturales de *C. jejuni*.
9. La bacteria Gram negativa de la reivindicación 7, en la que dicha proteína de vehículo está conjugada con el polisacárido mediante la oligosacaril transferasa.
10. La bacteria Gram negativa de la reivindicación 1, en la que el polisacárido es un polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae*.
11. La bacteria Gram negativa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el polisacárido es un antígeno O de *E. coli* (O1, O2, O3, O4, O5, O6, O7, O8, O9, O10, O11, O12, O13, O14, O15, O16, O17, O18, O19, O20, O21, O22, O23, O24, O25, O26, O27, O28, O29, O30, O32, O33, O34, O35, O36, O37, O38, O39, O40, O41, O42, O43, O44, O45, O46, O48, O49, O50, O51, O52, O53, O54, O55, O56, O57, O58, O59, O60, O61, O62, O63, O64, O65, O66, O68, O69, O70, O71, O73, O74, O75, O76, O77, O78, O79, O80, O81, O82, O83, O84, O85, O86, O87, O88, O89, O90, O91, O92, O93, O95, O96, O97, O98, O99, O100, O101, O102, O103, O104, O105, O106, O107, O108, O109, O110, O111, O112, O113, O114, O115, O116, O117, O118, O119, O120, O121, O122, O123, O124, O125, O126, O127, O128, O129, O130, O131, O132, O133, O134, O135, O136, O137, O138, O139, O140, O141, O142, O143, O144, O145, O146, O147, O148, O149, O150, O151, O152, O153, O154, O155, O156, O157, O158, O159, O160, O161, O162, O163, O164, O165, O166, O167, O168, O169, O170, O171, O172, O173, O174, O175, O176, O177, O178, O179, O180, O181, O182, O183, O184, O185, O186, O187), *Salmonella* sp. (*S. enterica* subsp. *Enterica*, *S. enterica* subsp. *Salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *Diarizonae*, *S. enterica* subsp. *Houtenae*, *S. bongori*, y *S. enterica* subsp. *Indica*, y los tipos O 1-67, *Pseudomonas* sp. (serotipos O 1-20 de *P. aeruginosa*), *Klebsiella* sp. (en particular *K. pneumoniae* serotipos O1, O2 (y subserotipos), O3, O4, O5, O6, O7, O8, O9, O10, O11, O12), antígenos O de *Acinetobacter* (en particular antígenos O de *A. baumannii*), antígenos O de *Chlamydia trachomatis* (serotipos A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L1, L2, L3), antígenos O1 a 155 de *Vibrio cholera*, *Listeria* sp., en particular *L. monocytogenes* tipo 1, 2, 3, 4 y subserotipos de los mismos, *Legionella pneumophila* antígenos O serotipos 1 a 15, antígenos O de *Bordetella parapertussis*, antígenos O de *Burkholderia mallei* y *pseudomallei*, *Francisella tularensis*, *Campylobacter* sp. (*C. jejuni*); Polisacáridos capsulares de *Clostridium difficile* (serotipos A, G, H, K, S1, S4, D, Cd-5, y serotipos A, B, C, D y E de *C. perfringens*), *Staphylococcus aureus* tipo 5 y 8, *Streptococcus pyogenes* (polisacáridos de serotipo capsular de grupo B de estreptococos), *E. coli*, *Streptococcus agalacticae* (polisacáridos capsulares de grupo A de estreptococos), *Neisseria meningitidis* (serotipos A, B, C, W, Y, X), *Candida albicans*, *Haemophilus influenza*, *Enterococcus faecalis* polisacáridos capsulares tipo I-V; y otras estructuras de polisacáridos de superficie, por ejemplo, los glucolípidos de *Borrelia burgdorferi*, glucano de pilina-O y lipo-oligosacárido (LOS) de *Neisseria meningitidis*, LOS de *Haemophilus influenza*, lipofosfoglucono de *Leishmania major*, antígenos de carbohidratos asociados con tumores, glucosil-fosfatidil-inositol de malaria, o micobacteria de tuberculosis arabinomano.
12. Un procedimiento para producir una glucoproteína recombinante que comprende cultivar la bacteria Gram negativa

de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en condiciones adecuadas para la producción de proteínas, que adicionalmente comprende purificar la glucoproteína recombinante.

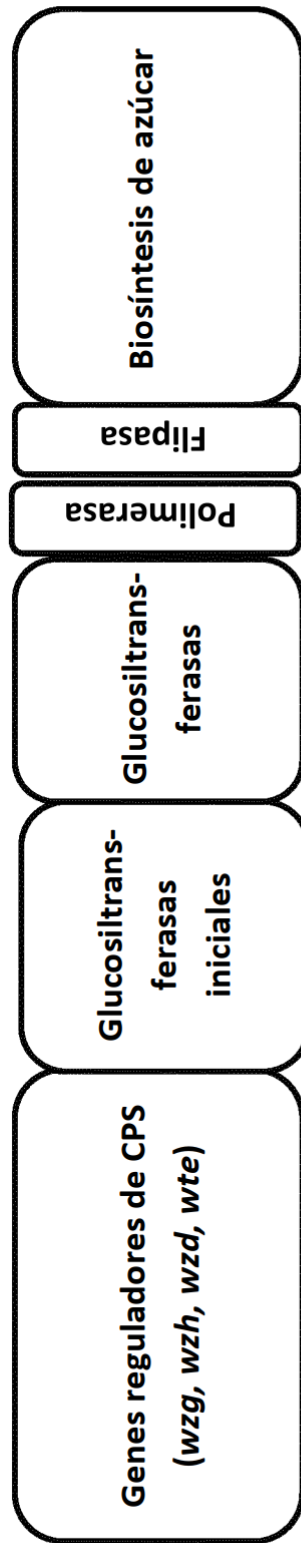


Fig. 1.

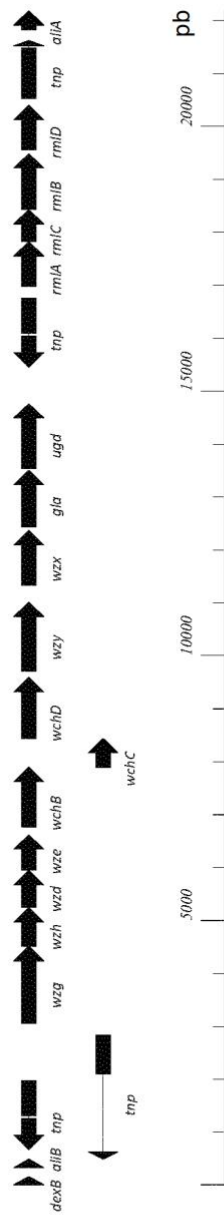


Fig. 2.

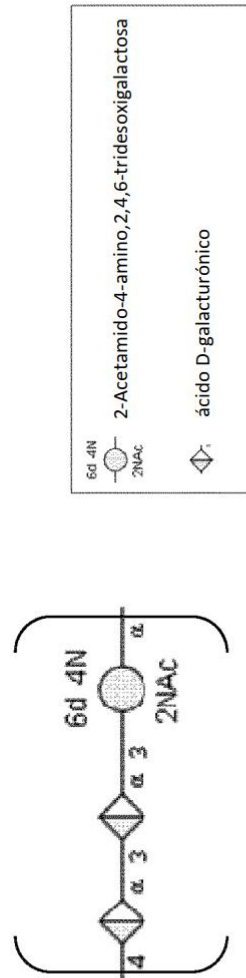


Fig. 3.

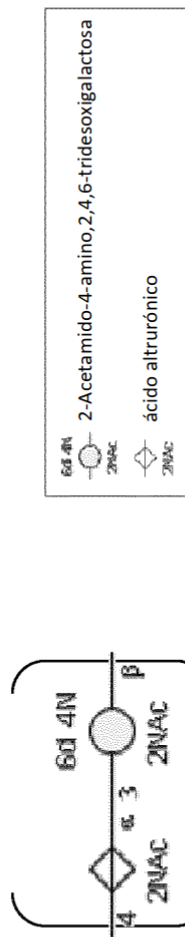


Fig. 4.

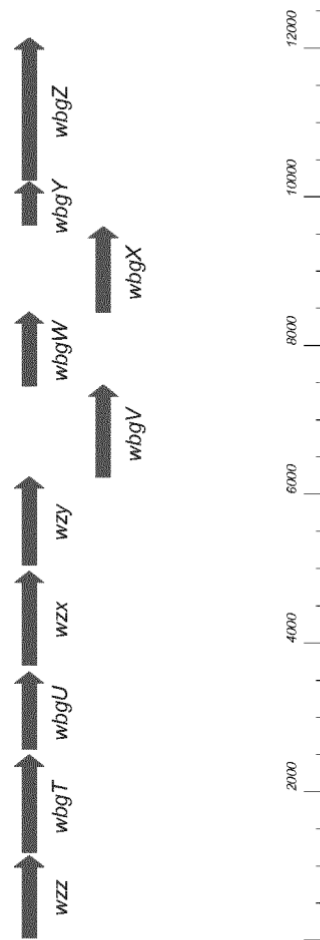


Fig. 5.

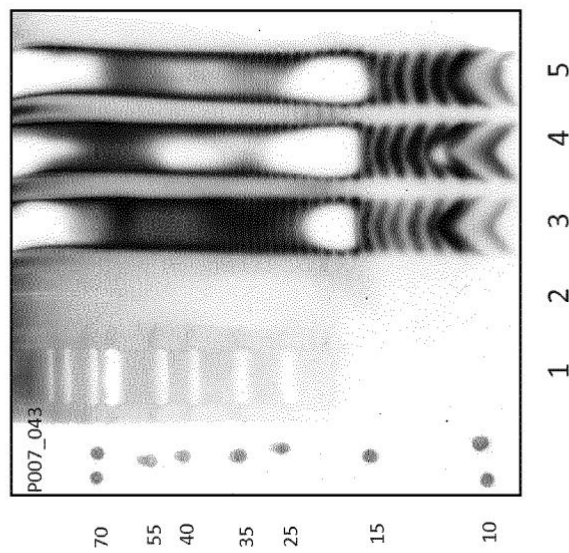


Fig. 6.

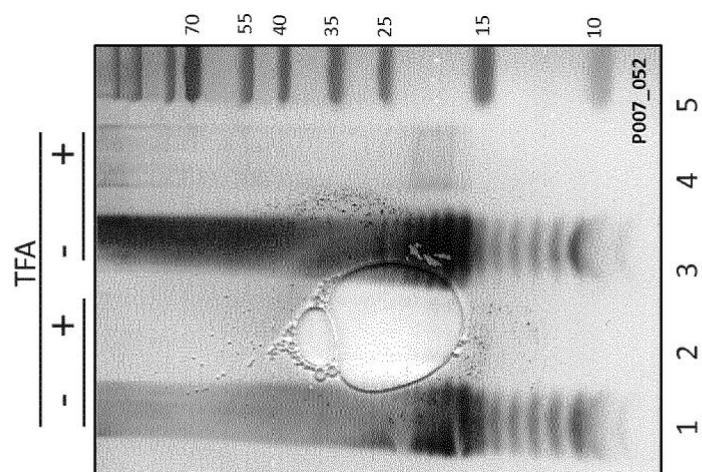


Fig. 7.

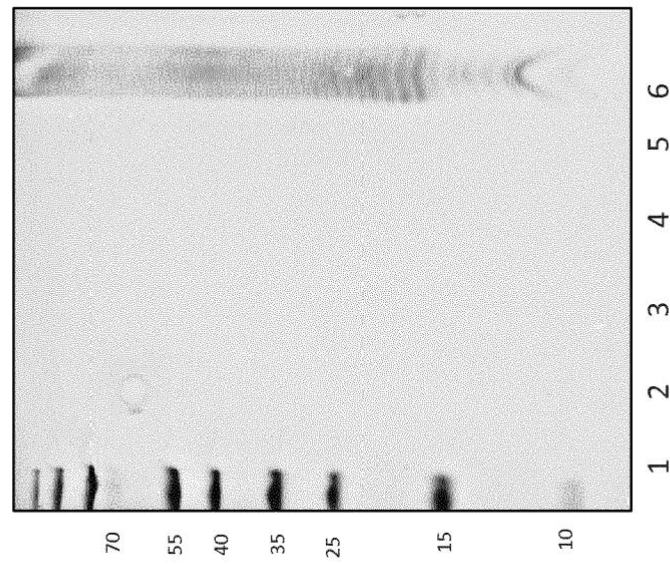


Fig. 8.

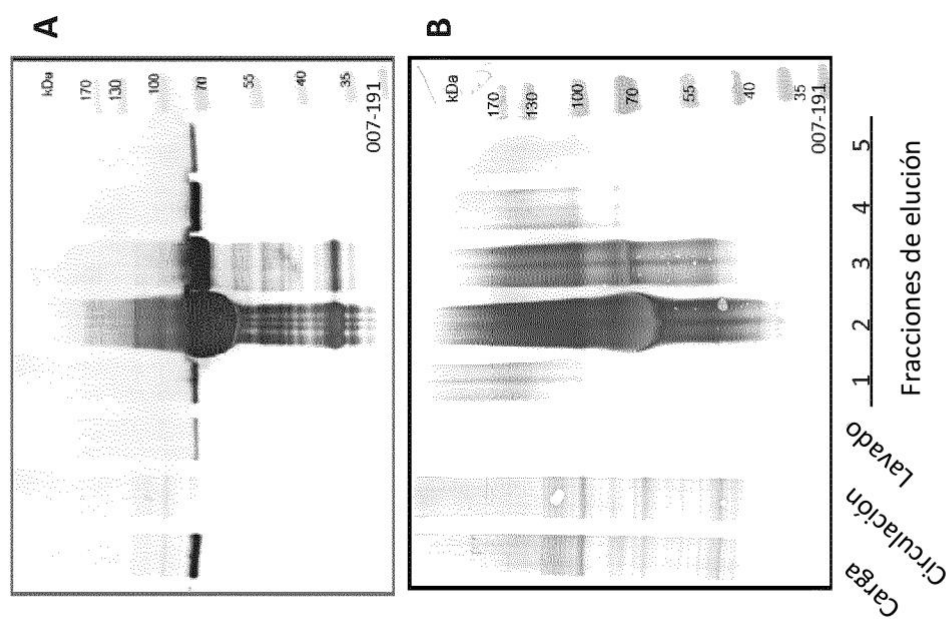


Fig.9.

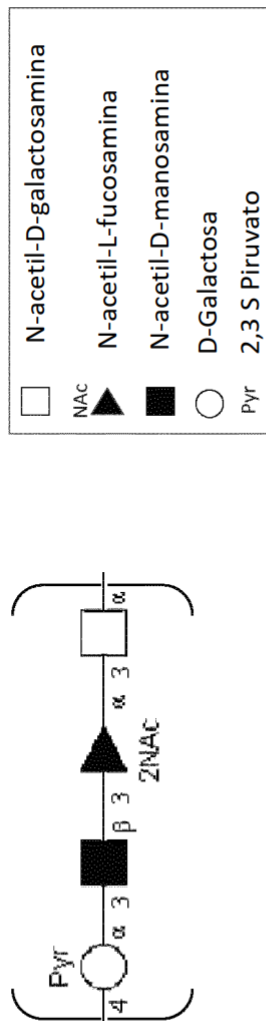


Fig. 10.

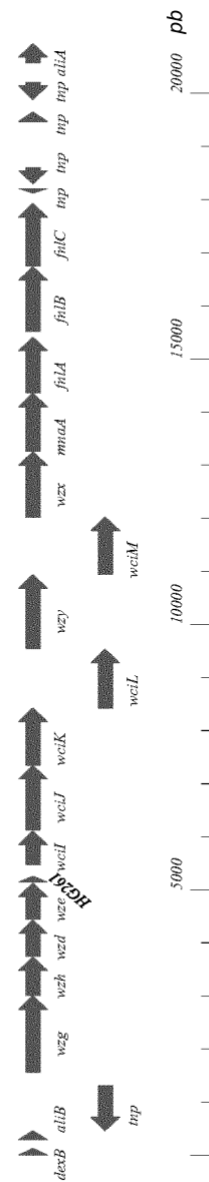


Fig. 11.

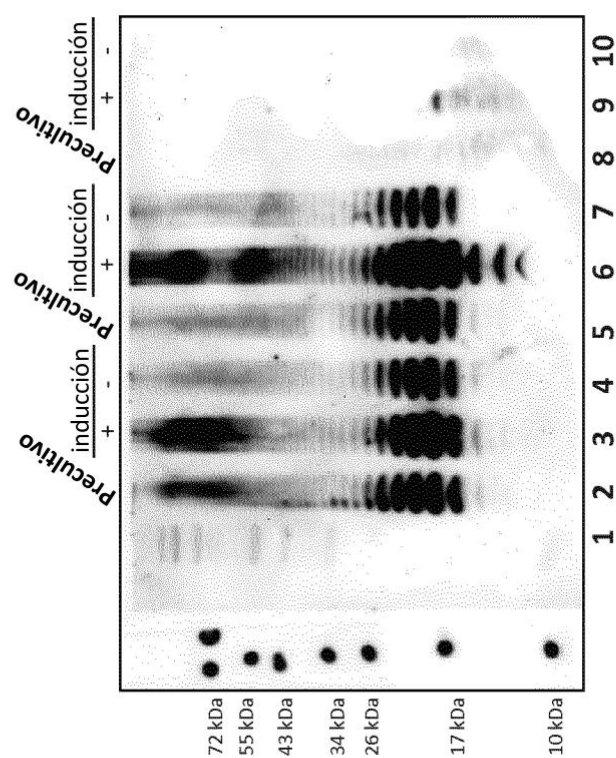


Fig. 12.

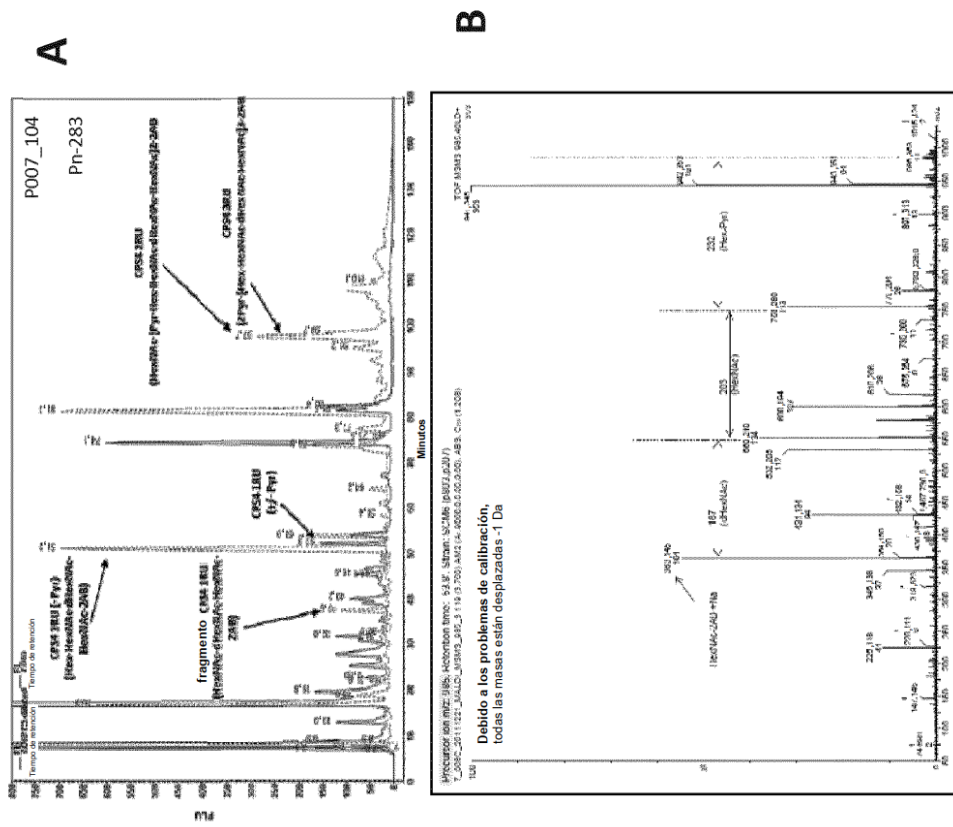


Fig. 13.

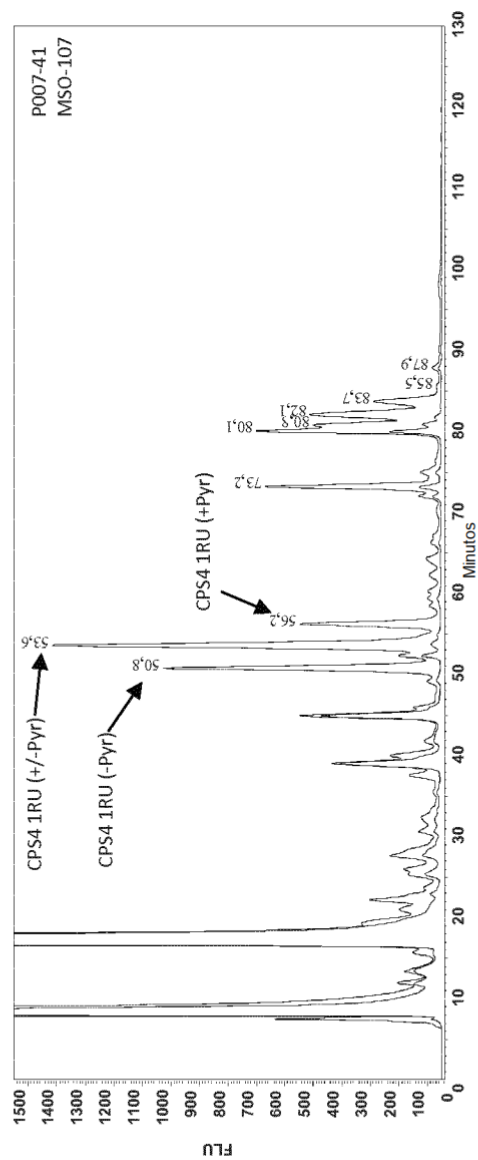


Fig. 14.

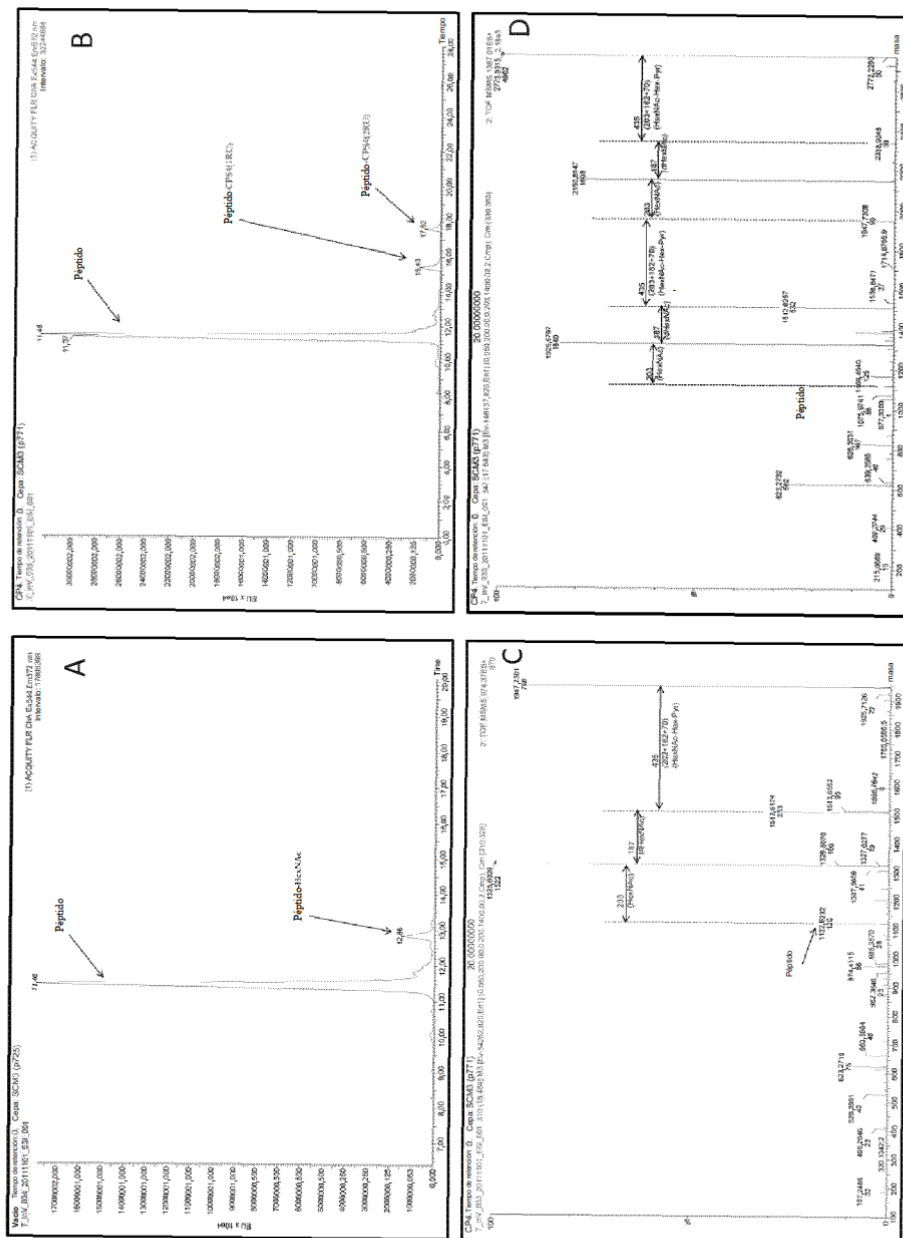


Fig. 15.

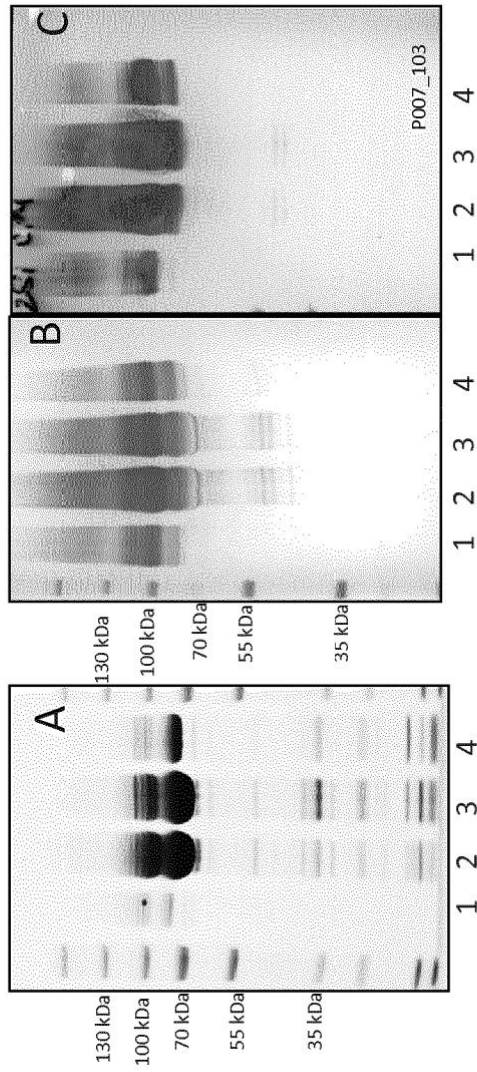


Fig. 16.

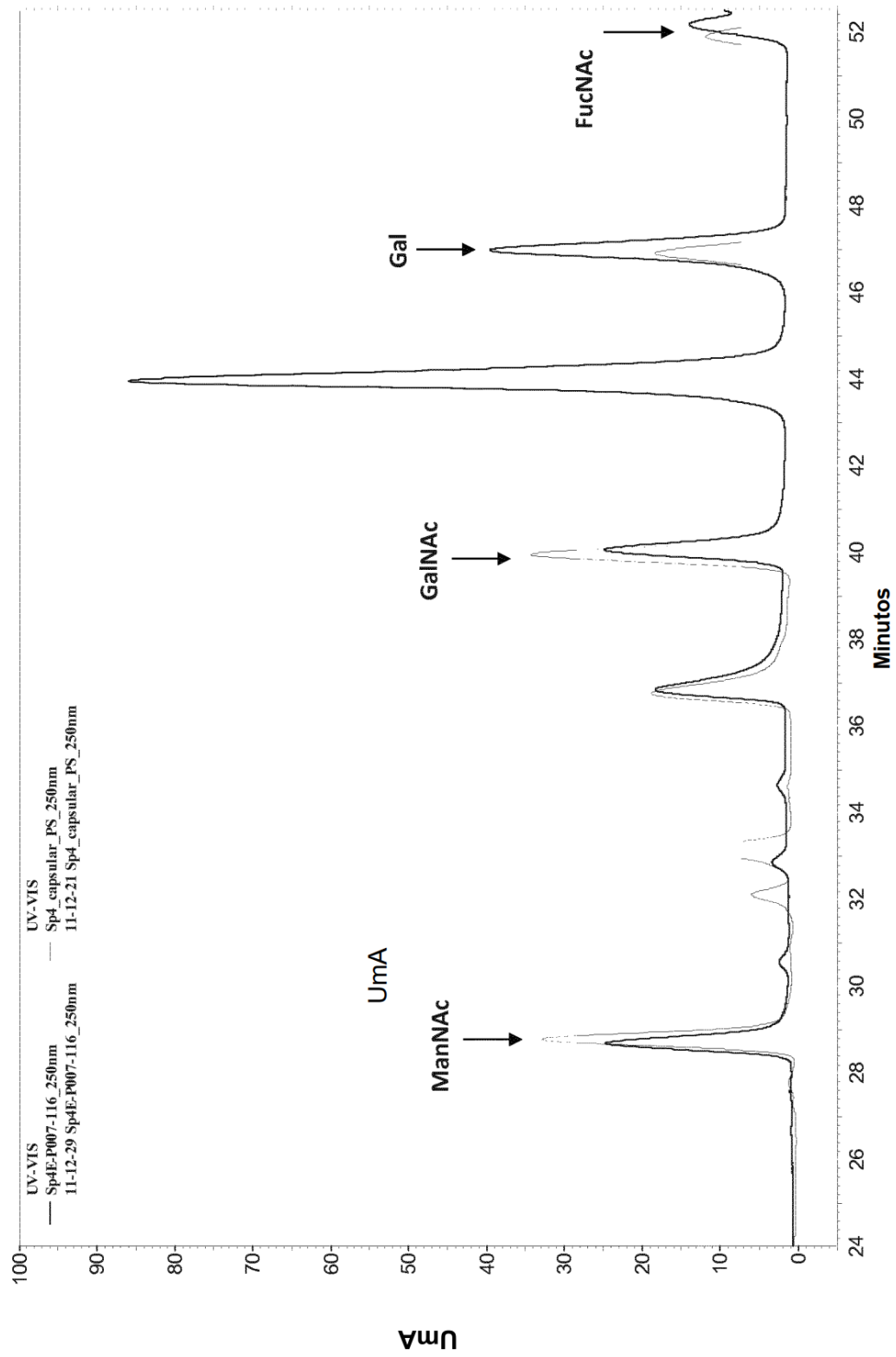


Fig. 17.

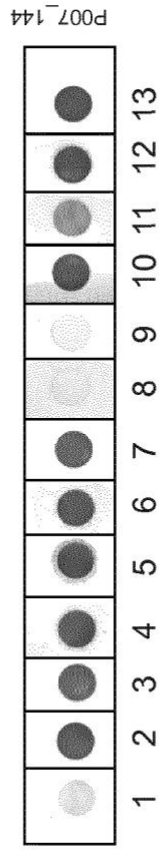


Fig. 18.

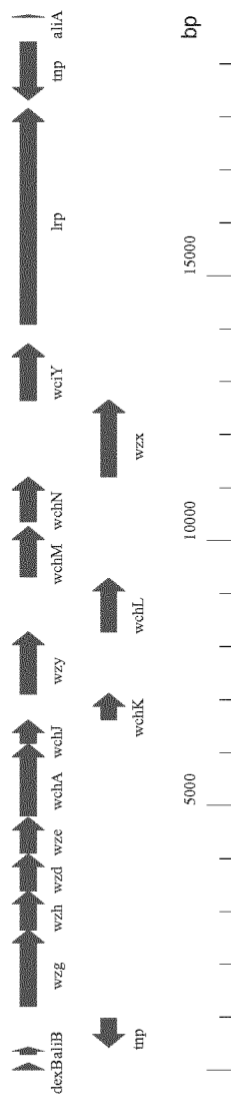


Fig. 19.

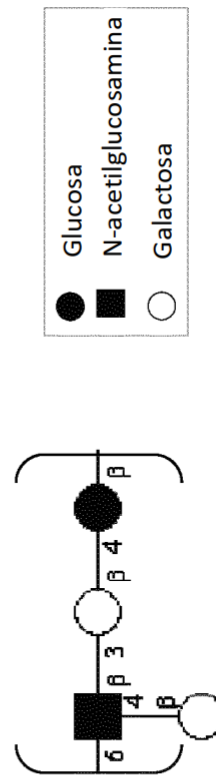


Fig. 20.



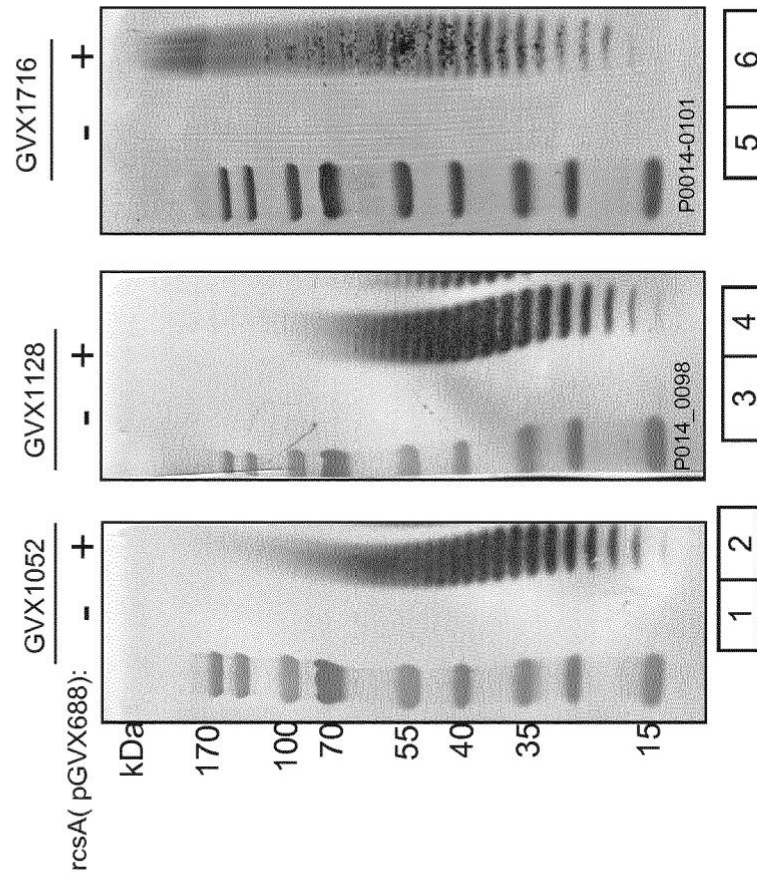


FIG. 22

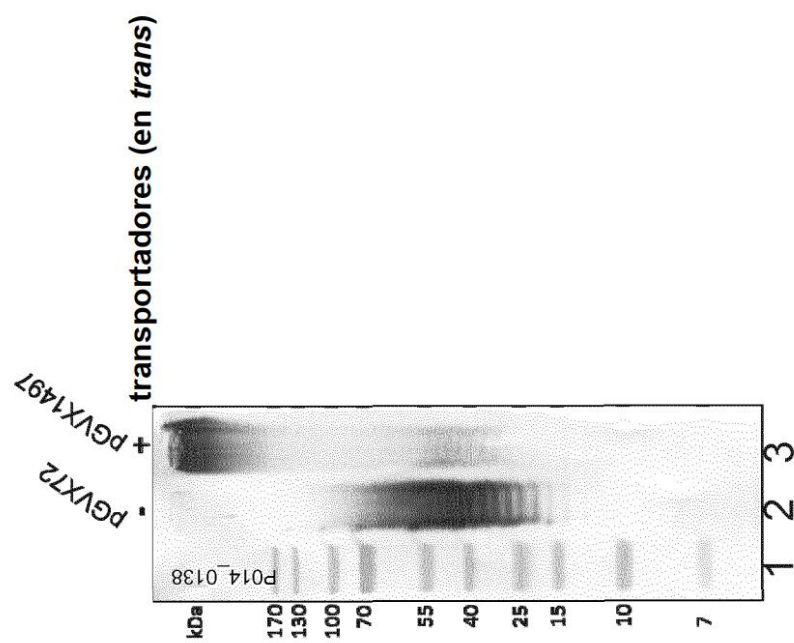


FIG. 23

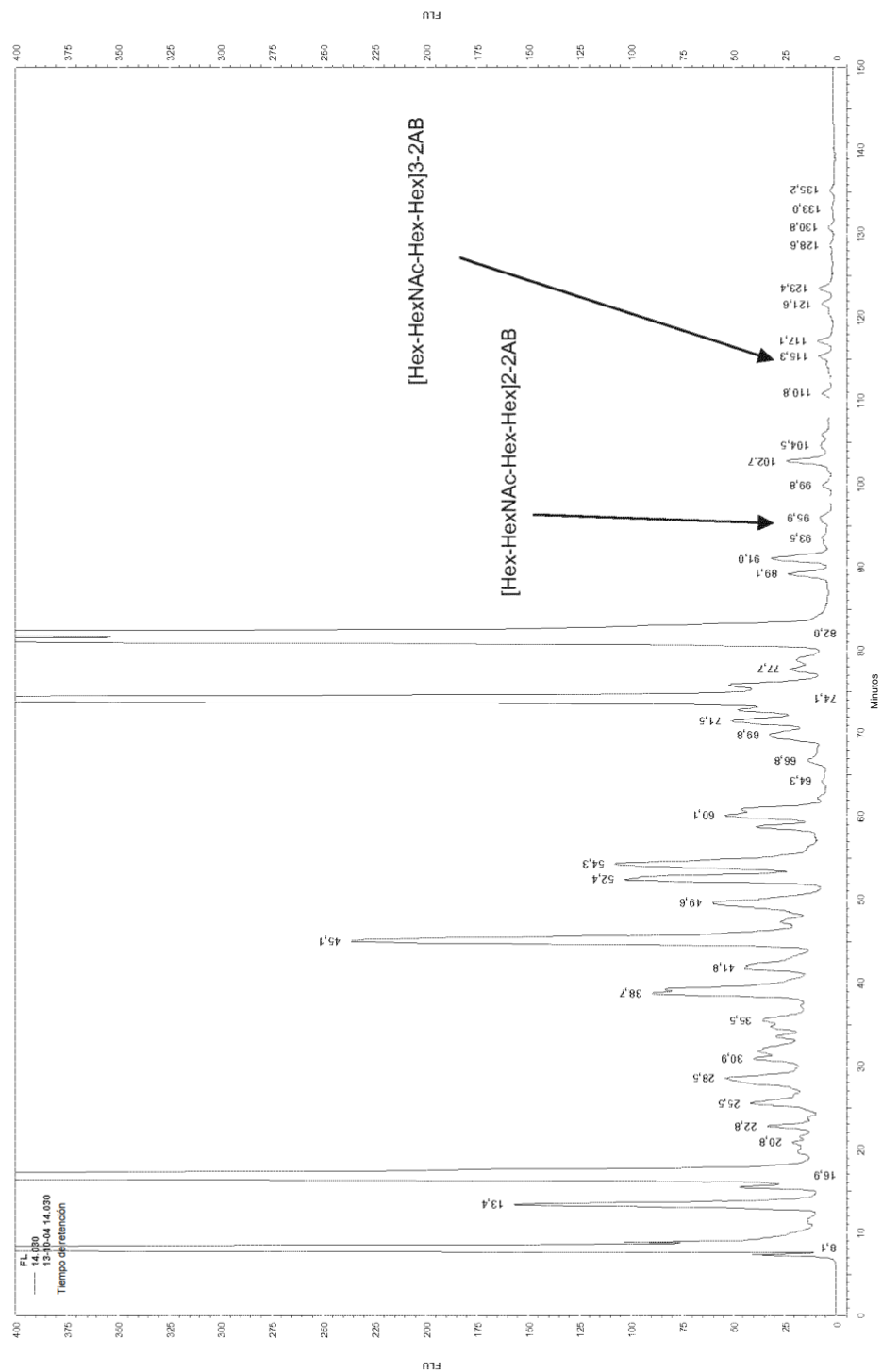


FIG. 24