República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1010283-3 B1

(22) Data do Depósito: 25/03/2010

(45) Data de Concessão: 06/04/2021

(54) Título: SALMONELLA ENTERICA APRESENTANDO N-GLICANO DE C.JEJUNI OU DERIVADOS DO MESMO, SEU USO, MÉTODO DE PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, ALIMENTO OU RAÇÃO, ADITIVO ALIMENTAR OU DE RAÇÃO COMPREENDENDO A MESMA

(51) Int.Cl.: C12N 1/20; C12N 1/36; C07K 14/205; A61K 39/106.

(30) Prioridade Unionista: 27/03/2009 EP 09004445.4.

(73) Titular(es): EIDGENOESSISCHE TECHNISCHE HOCHSCHULE ZUERICH.

(72) Inventor(es): KARIN ILG; MARKUS AEBI; UMESH AHUJA; SABA AMBER; FLAVIO SCHWARZ.

(86) Pedido PCT: PCT EP2010001884 de 25/03/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/108682 de 30/09/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 27/09/2011

(57) Resumo: SALMONELLA ENTERICA APRESENTANDO N-GLICANO DE C. JEJUNI OU DERIVADOS DO MESMO. A presente invenção refere-se à Salmonella enterica compreendendo pelo menos um operon pgl de Campylobacter jejuni ou um derivado funcional do mesmo e apresentando pelo menos um N-glicano de Campylobacter jejuni ou um derivado de N-glicano do mesmo em sua superfície celular. Além disso, a invenção está direcionada a usos médicos e composições farmacêuticas, bem como a métodos para tratar e/ou prevenir infecções por Campylobacter e opcionalmente por Salmonella e a métodos para produzir estas cepas de Salmonella.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"*SALMONELLA ENTERICA* APRESENTANDO N-GLICANO DE *C. JEJUNI* OU DERIVADOS DO MESMO, SEU USO, MÉTODO DE PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, ALIMENTO OU RAÇÃO, ADITIVO ALIMENTAR OU DE RAÇÃO COMPREENDENDO A MESMA".**

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se à *Salmonella enterica* compreendendo pelo menos um operon *pgl* de *Campylobacter jejuni* ou um derivado funcional do mesmo e apresentando pelo menos um N-glicano de *Campylobacter jejuni* ou um derivado de N-glicano do mesmo em sua superfície celular. Além disso, a invenção está direcionada a usos médicos, composições farmacêuticas, aditivos alimentares e de rações , assim como a métodos para tratar e/ou prevenir infecções por *Campylobacter*, em particular aquelas causadas por *C. jejuni, C. lari, C. coli, C. upsaliensis,* e *C. fetus,* e opcionalmente infecções por *Salmonella* e métodos para produzir estas cepas de *Salmonella*.

ANTECEDENTES RELEVANTES DA INVENÇÃO

[002] *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) é um patógeno transportado pelos alimentos que é a principal causa de gastroenterite aguda humana nos países desenvolvidos. Seus hospedeiros usuais são animais de criação, em particular aves e gado bovino. A infecção com *C. jejuni* também é associada a várias consequências de longo prazo, as mais graves sendo as doenças autoimunes denominadas síndrome de Miller-Fisher e síndrome de Guillain-Barré. Estas são provocadas por anticorpos do hospedeiro mamífero contra o mimetismo de estruturas dos gangliosídeos dos mamíferos na superfície do patógeno que então ataca também os gangliosídeos do hospedeiro. Este mimetismo molecular é uma das razões pelas quais atualmente não existem disponíveis vacinas eficientes contra *C. jejuni* porque ele exclui o uso de

células atenuadas ou mortas de *C. jejuni* como vacinas.

[003] A Patente US 2007/065461 ensina uma vacina composta de pelo menos um polissacarídeo capsular (CPS) de *C. jejuni* opcionalmente ligado *in vitro* a uma proteína carregadora. Injeção deste conjugado em camundongos e macacos protegeu contra o posterior desafio intranasal com *C. jejuni*. A produção desta vacina requer isolamento e purificação do CPS assim como ligação química à proteína carregadora e etapas de purificação adicionais.

[004] Poly et al. (Infection and Immunity, 75:3425-3433, 2008) descrevem cepas de *C. jejuni* sem as estruturas que mimetizam os gangliosídeos que estão sendo atualmente testadas como candidatos à vacina.

[005] Inicialmente a glicosilação foi considerada especificamente um fenômeno eucariótico, mas posteriormente foi demonstrado que ela é comum nos domínios de Archaea e Eubacteria. As ligações O e N bacterianas são formadas com uma gama de açúcares maior do que aquelas observadas em glicoproteínas eucarióticas. A N-glicosilação glicosídica de proteínas em procariotos foi demonstrada pela primeira vez em *C. jejuni.* (Szymanski et al., Molecular Microbiology 32:1022-1030, 1999). O mecanismo de glicosilação da *C. jejuni* já foi caracterizado e foi até mesmo transferido com sucesso para *E. coli*, onde foi demonstrada N-glicosilação ativa de proteínas (Wacker et al., Science, 298:1790-1793, 2002). O loco genético de *C. jejuni* denominado *pgl* (para glicosilação de proteínas) está envolvido na glicosilação de diversas proteínas. Seu silenciamento mutacional resulta na perda de imunogenicidade de diversas proteínas.

[006] O pedido de patente US 2006/0165728 A1 identifica um heptassacarídeo específico e altamente imunogênico que é comum a pelo menos várias espécies de *Campylobacter* e numerosas cepas que são importantes como patógenos humanos e veterinários. O

heptassacarídeo tem a fórmula (I) a seguir:

GalNAc-a1,4-GalNAc-a1,4-[Glc-ß-1,3]GalNAc-a1,4-Gal-NAc-a1,4-GalNAc-a1,3-Bac,

[007] em que Bac (também denominado bacilosamina) é 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesóxi-D-glicopiranose, GalNAc é N-acetil-galactosamina e Glc é glicose. Esta porção glicana é um componente de diversas gliproteínas. Na *C. jejuni* o *N*-glicano é importante para a interação da *C. jejuni* com as células hospedeiras. Mutações no mecanismo de glicosilação levam a uma colonização diminuída nos tratos intestinais de camundongos. Além disso, composições farmacêuticas compreendendo seja (i) o referido heptassacarídeo ou um conjugado do mesmo ou (ii) um anticorpo voltado contra o referido heptassacarídeo são sugeridas para uso na vacinação de animais de criação, especificamente em aves.

[008] O gênero *Salmonella* é um membro da família *Enterobacteriaceae*. O gênero é composto de bacilos Gram-negativos que são anaeróbicos facultativos e flagelados (móveis). Eles possuem três antígenos principais, o antígeno "H" ou flagelar, o antígeno "O" ou somático (parte da porção LPS) e o antígeno "Vi" ou capsular (denominado "K" em outras *Enterobacteriaceae*). A *Salmonellae* também possui a endotoxina LPS característica das bactérias Gram-negativas. A LPS é composta de três domínios: A parte lipídio A, também conhecida com endotoxina, âncora de moléculas de LPS na membrana externa com suas cadeias de ácidos graxos. Ela é conectada através do núcleo interno consistindo em heptoses e KDO (ácido 3-desóxi-D-mano-octulosônico) com o núcleo externo contendo hexoses e *N*-acetil-hexoses. Ligada à última glicose do núcleo externo encontra-se a região do antígeno O polimérico. Esta região é composta de 16 a >100 repetições de uma estrutura de oligossacarídeo contendo quatro a seis monossacarídeos. A parte lipídio A endotóxica provoca febre e

pode ativar fatores do complemento, de cinina e de coagulação.

[009] Durante algum tempo as cepas de *Salmonella* foram interessantes para produzir e apresentar imunógenos bacterianos. Por exemplo, os genes codificando as enzimas para a biossíntese do antígeno O de *Shigella* foram genomicamente integrados em uma cepa de vacinação *aroA* da *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, que então produziu um LPS híbrido (Fält et al., Microbial Pathogenesis 20:11-30, 1996). Também, conjuntos necessários para a biossíntese do antígeno O de *Salmonella dysenteriae* foram clonados em um vetor de expressão estável, que foi então transferido para a cepa Ty21a de vacinação contra a febre tifóide. A cepa resultante produz LPS híbrido e induz imunidade protetora contra desafio com *S. dysenteriae* (DE Qui Xu et al., Vaccine 25: 6167-6175, 2007).

[0010] A Patente US 6.399.074 B1 revela uma vacina de *Salmonella* de vida atenuada para proteger pássaros contra infecção por micróbios gram-negativos patogênicos aviários. A vacina é uma cepa recombinante de *Salmonella* expressando o antígeno O de um micróbio gram-negativo patogênico aviário tal como *E. coli* O78 que é patogênico em aves. A cepa recombinante de *Salmonella* não expressa o antígeno O de *Salmonella* devido a uma mutação na polimerase rfz (nova nomenclatura genética wzy) do antígeno O.

[0011] Tendo em vista as técnicas anteriores acima, o objetivo da presente invenção é fornecer uma composição de vacina eficaz e segura, facilmente produzida em massa, de longa duração e com baixo custo, para prevenir e/ou tratar infecções por *Campylobacter* em seres humanos e animais, em particular em animais de criação, mais particularmente em aves.

[0012] Este objetivo é resolvido oferecendo-se em um primeiro aspecto uma *Salmonella enterica* que compreende pelo menos um operon *pgl* de *Campylobacter jejuni* ou um derivado funcional do mesmo

e apresenta pelo menos um N-glicano de *Campylobacter jejuni* ou um derivado de N-glicano do mesmo em sua superfície celular.

[0013] A cepa de *Salmonella* útil na presente invenção pode ser qualquer cepa que seja ou que possa ser suficientemente atenuada para permitir sua administração não patológica em seres humanos e/ou animais na forma viva e/ou morta. Cepas de *Salmonella* preferidas são as cepas de *Salmonella enterica* selecionadas do grupo que consiste nas cepas *Salmonella* Typhimurium, enteriditis, heidelberg, gallinorum, hadar, agona, kentucky, typhi e infantis, mais preferivelmente nas cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. A *Salmonella* Typhimurium é especialmente útil para uso em vacinação porque sua sequência genômica já foi completamente caracterizada e muitos estudos em animais confirmam seu uso médico seguro.

[0014] O termo "operon *pgl*" conforme usado neste relatório refere-se a qualquer conjunto de N-glicosilação fisiologicamente ativo de genes de *C. jejuni* capazes de N-glicosilar estruturas homólogas ou heterólogas produzidas pela cepa de *Salmonella* da invenção. O operon *pgl* em *C. jejuni* codifica todas as enzimas necessárias para a síntese do heptassacarídeo N-glicano de *C. jejuni*, seu transporte através da membrana interna e sua transferência para proteínas. *PglD, E, F* codificam as enzimas envolvidas na biossíntese de bacilosamina, PglC transfere bacilosamina fosforilada para undecaprenil-fosfato e PglA, H e J acrescentam resíduos GalNAc. A ramificação Glc é presa por PglI. A transferência do heptassacarídeo completo ocorre por meio da ação de PglK e a oligossacariltransferase PglB transfere o N-glicano para a proteína.

[0015] Um derivado funcional de um operon *pgl* é um conjunto de genes derivados de qualquer operon *pgl* de *C. jejuni* tendo deleções, mutações e/ou substituições de nucleotídeos ou genes integrais, porém ainda capazes de produzir um oligossacarídeo ou polissacarídeo ligável

que pode ser ligado às estruturas homólogas ou heterólogas produzidas pela cepa de *Salmonella* da invenção. Um ou mais operons *pgl* ou derivados dos mesmos podem ser integrados no cromossoma da cepa de *Salmonella* ou eles podem ser introduzidos como parte de pelo menos um plasmídeo. A integração cromossômica é preferida porque ela é mais estável em comparação com vetores plasmídicos, cuja perda poderia ocorrer durante a propagação. Deve ser observado que a cepa de *Salmonella* da invenção pode compreender mais de um operon *pgl* ou derivado do mesmo produzindo um ou mais N-glicanos ou derivados dos mesmos. Na verdade, é preferível que a cepa da invenção tenha mais de um tipo de operon *pgl* resultando em mais de uma estrutura N-glicano, o que pode ser vantajoso para esclarecer uma resposta imunológica mais diversificada em um ser humano ou animal contra diferentes cepas de *C. jejuni*.

[0016] Deve-se observar também que o nível de expressão do N-glicano de *C. jejuni* pode ser opcionalmente regulado pelo uso de diferentes promotores a montante do operon *pgl*, incluindo, porém sem limitação, promotores de genes de proteínas ribossômicas, por exemplo *spc* ou *rpsm* assim como promotores de genes codificadores de resistência a antibióticos como *bla* ou promotores similares e de preferência fortes. Este tipo de regulação está disponível para operons *pgl* codificados por plasmídeos ou genomicamente integrados. Além disso, a estabilidade do plasmídeo pode ser opcionalmente aumentada com a inclusão de genes essenciais no plasmídeo e ao mesmo tempo com a deleção desses genes no genoma da cepa de Salmonella da invenção. Alvos preferidos abrangem, por exemplo, os genes codificando as tRNA-transferases como CysS.

[0017] Em uma modalidade preferida, a cepa de *Salmonella* da invenção é uma cepa compreendendo pelo menos um operon *pgl*, onde um ou mais genes para a biossíntese de bacilosamina são inativados

por mutação e/ou por deleção parcial ou completa, de preferência por deleção parcial e/ou completa dos genes D, E, F, G. Em uma modalidade mais preferida os genes *pglE, F* e *G* do operon *pgl* são completamente deletados e o gene *pglD* é parcialmente deletado, por exemplo a estrutura de leitura aberta (ORF) de *pglD* termina depois de 270 pares de bases (a ORF de comprimento integral contém 612 pares de bases).

[0018] Em uma outra modalidade preferida, o gene *pglB* do operon *pgl* é inativado, o que significa que a oligossacariltransferase B correspondente ou não é expressa ou é pelo menos enzimaticamente inativada. O produto gênico *pglB* transfere o N-glicano para um sítio aceptor de polipeptídios específico descrito mais adiante. A inativação da transferase leva ao fato de o N-glicano ou derivado de N-glicano ser exclusivamente ligado ao núcleo do lipídio A aceptor de antígeno O na *Salmonella*.

[0019] Em uma modalidade mais preferida, o derivado de *pgl* é um derivado em que um ou mais genes para a biossíntese de bacilosamina, *pg D, E, F, G,* e a transferência são inativados e o gene *pglB* também é inativado. Esta modalidade leva à troca de GlcNAc por bacilosamina resultando na apresentação celular aumentada assim como na transferência do heptassacarídeo modificado para o núcleo do lipídio A no lugar de para aceptores de polipeptídios.

[0020] O pelo menos um N-glicano de *C. jejuni* ou um derivado de N-glicano do mesmo pode ser qualquer N-glicano produzido por qualquer operon *pgl* de *Campylobacter jejuni* ou um derivado funcional do mesmo. Naturalmente é preferível que o N-glicano ainda seja imunogênico, isto é, produza uma resposta imunológica específica para *C. jejuni.*

[0021] Em uma modalidade preferida, o N-glicano é o heptassacarídeo de fórmula (I) descrito acima, isto é, GalNAc-a1,4-

GalNAc-a1,4-[Glc-ß-1,3] GalNAc-a1,4-Gal-NAc-a1,4-GalNAc-a1,3-Bac, em que Bac (também denominado bacilosamina) é 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesóxi-D-glicopiranose.

[0022] O operon *pgl* preferido, em que os genes para a biossíntese de bacilosamina são inativados, de preferência majoritariamente ou completamente deletados, leva à síntese de um derivado de N-glicano, isto é, o heptassacarídeo de fórmula (II), sendo GalNAc-a1,4-GalNAc-a1,4-[Glc-ß-1,3]GalNAc-a1,4-Gal-NAc-a1,4-GalNAc-a1,3-GlcNAc.

[0023] Surpreendentemente, o derivado de N-glicano de fórmula (II) é apresentado em quantidades mais altas que o N-glicano de fórmula (I) na superfície das células das cepas de *Salmonella* da presente invenção e também é imunogênico. Este fato está experimentalmente confirmado na seção de exemplos abaixo.

[0024] Em uma modalidade preferida o(s) N-glicano(s) ou derivado(s) resultante(s) de pelo menos um operon *pgl* ou derivado do mesmo podem ser ligados a pelo menos um polipeptídio homólogo ou heterólogo de *Salmonella* que será eventualmente transferido e apresentado na superfície celular. De preferência o pelo menos um N-glicano ou derivado de N-glicano é ligado a um polipeptídio compreendendo pelo menos uma sequon de consenso N-Z-S/T (vide Nita-Lazar M et al., Glycobiology. 2005;15(4):361-7), de preferência D/E - X - N - Z - S/T (SEQ ID Nº: 1), onde X e Z podem ser qualquer aminoácido natural exceto Pro (vide Kowarik et al. EMBO J. 2006;25(9):1957-66).

[0025] O polipeptídio ligado ao N-glicano (derivado) pode ser qualquer tipo de polipeptídio tal como um polipeptídio puro (somente aminoácidos) ou um polipeptídio pós-translacionalmente modificado, por exemplo, um polipeptídio ligado a um lipídio.

[0026] Para polipeptídios heterólogos como veículos dos (derivados de) N-glicanos é preferível que eles compreendam a sequência de sinal

MKKILLSVLTTFVAVVLAAC (SEQ ID Nº. 2) direcionando o conjugado N-ligado para a membrana externa da célula e onde o motivo LAAC (SEQ ID Nº. 3) é usado para acilação do resíduo cis teína, que ancora o polipeptídio na membrana externa (vide também Kowarik et al., EMBO J. May 3;25(9):1957-66, 2006).

[0027] Na modalidade mais preferida, pelo menos um N-glicano ou derivado do mesmo resultante de pelo menos um operon *pgl* ou derivado do mesmo é ligado ao núcleo do lipídio A da *Salmonell*a ou uma funcionalidade equivalente derivada do mesmo. O núcleo do lipídio A da *Salmonella* é uma estrutura oligossacarídica consistindo em hexoses, N-acetil-hexoses, heptoses e KDO (ácido 3-desóxi-D-mano-octulosônico) ligado por meio de duas glicosaminas a seis cadeias de ácido graxo ancorando a estrutura na membrana externa da bactéria. Um derivado funcionalmente equivalente do núcleo do lipídio A é um derivado capaz de aceitar um ou mais glicanos ou derivados dos mesmos e apresentar os mesmos na superfície celular. Observa-se que neste caso o N-glicano ou derivado do mesmo não é N-ligado porque o lipídio A da estrutura da *Salmonella* não é um polipeptídio. O N-glicano é de preferência ligado ao GlcII no núcleo do lipídio A ou de um derivado funcional do mesmo.

[0028] De preferência pelo menos um N-glicano ou derivado do mesmo substitui as cadeias laterais do antígeno O no LPS (lipopolissacarídeo). O núcleo interno e externo do lipídio A da *Salmonella* permanece inalterado ao passo que a biossíntese do antígeno O é abolida através de mutação de wbaP. O N-glicano é então transferido pela ligase WaaL do antígeno O e ligado ao resíduo GlcII da estrutura oligossacarídica do núcleo externo do lipídio A.

[0029] É preferível e para usos médicos altamente importantes que a cepa de *Salmonella* da invenção não provoque efeitos patogênicos quando administrada a um animal ou a um ser humano na forma viva

e/ou inativada. O especialista na técnica conhece muitas maneiras de atenuar espécies virulentas de *Samonella* por mutação. As mutações preferidas para atenuar cepas de *Salmonella* para uso na presente invenção são selecionadas do grupo que consiste em pab, pur, aro, aroA, asd, dap, nadA, pncB, galE, pmi, fur, rpsL, ompR, htrA, hemA, cdt, cya, crp, phoP, phoQ, rfc, poxA e galU. Uma ou mais destas mutações podem estar presentes. As mutações aroA, cya e/ou crp são mais preferidas.

[0030] Os genes da biossíntese do antígeno O da *Salmonella* são agrupados no loco rfb, uma região hipervariável do DNA do cromossoma da *Salmonella*. Inativação parcial ou total foi associada à atenuação de cepas de *Salmonella*. Por outro lado, o antígeno O também é um determinante antigênico importante para induzir imunidade em um hospedeiro.

[0031] Em uma modalidade particularmente preferida, a cepa de *Salmonella* da presente invenção é atenuada por inativação parcial ou total da expressão do antígeno O, de preferência por uma ou mais mutações e/ou deleções no conjunto de genes rfb, mais preferivelmente no gene wbaP, e ainda mais preferivelmente deleção do gene wbaP.

[0032] Deve ficar entendido que conforme usado neste relatório, os termos "locos rfb" e "gene wbaP" pretendem abranger qualquer loco e gene correspondentes em qualquer cepa de *Salmonella* que seja capaz de expressar o antígeno O ou antígenos relacionados.

[0033] O produto gênico wbaP é a fosfogalactosil-transferase que inicia a biossíntese do antígeno O pela adição de fosfogalactose ao undecaprenilfosfato. Sua inativação/deleção leva à abolição completa da síntese do antígeno O, cujo açúcar produzido compete com os (derivados de) N-glicanos da *C. jejuni* pelo carregador lipídico undecaprenilfosfato e pela transferência pela ligase WaaL. A N-glicosilação da proteína induzida pelo loco *pgl* e a síntese do antígeno

O wzy-dependente são processos homólogos nas bactérias. Foi descoberto que a ligase WaaL do antígeno O da *Salmonella* relaxou a especificidade do substrato e que ela pode transferir o N-glicano de *C. jejuni* para o núcleo do lipídio A da *Salmonella*.

[0034] Portanto, em uma modalidade mais preferida a cepa de *Salmonella* da invenção é mutada no gene wbaP inativando a enzima fosfogalactosil-transferase. Deve ser observado que este tipo de inativação do antígeno O ainda não foi descrito com a intenção de vacinação e é superior aos mutantes negativos para o antígeno O atualmente conhecidos, porque ela é geneticamente definida e permite aumentar a quantidade de (derivados de) N-glicanos de *C. jejuni* apresentados na superfície celular de cepas de *Salmonella*.

[0035] Por conseguinte e como uma invenção independente, a presente invenção também refere-se a uma cepa de *Salmonella* mutada, de preferência deletada, e, portanto, inativa no gene wbaP, que é útil para usos em vacinas de cepas de *Salmonella* como tais assim como cepas de *Salmonella* como veículos de antígenos heterólogos, de preferência glicosilados, mais preferivelmente antígenos N-glicosilados.

[0036] Em uma modalidade mais preferida, a invenção refere-se à *Salmonella enterica*, de preferência uma cepa serovar typhimurium, que

(a) compreende

(i) pelo menos um operon *pgl* de *Campylobacter jejuni* ou um derivado funcional do mesmo, de preferência pelo menos um opéron *pgl*, onde um ou mais genes para a biossíntese de bacilosamina são inativados e

(ii) mutações e/ou deleções no gene wbaP que levam à inativação completa da biossíntese do antígeno O,

(b) e apresenta pelo menos um N-glicano de *Campylobacter jejuni* ou um derivado de N-glicano do mesmo, de preferência (I) GalNAc-a1,4-GalNAc-a1,4-[Glc-ß-1,3]GalNAc-a1,4-Gal-NAc-a1,4-

GalNAc-a1,3-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesóxi-D-glicopiranose e/ou (II) GalNAc-a1,4-GalNAc-a1,4-[Glc-ß-1,3]GalNAc-a1,4-Gal-NAc-a1,4-GalNAc- a1,3-GlcNAc em sua superfície celular.

[0037] As cepas de *Salmonella* da invenção descritas acima são altamente imunogênicas e produzem respostas imunológicas contra infecções por *C. jejuni*. Além disso, depois de preparadas, elas podem ser facilmente propagadas e produzidas em massa. Como uma vantagem adicional, sua administração a um animal ou a um ser humano proporciona imunidade contra infecções por *C. jejuni* e *Salmonella*. Elas podem ser administradas como vacinas mortas ou vivas, as vacinas vivas possibilitando propagação prolongada e estímulo imunológico sistemática no hospedeiro assim como respostas imunológicas completas sem adjuvantes.

[0038] Assim sendo, a presente invenção também refere-se ao uso médico das cepas vivas ou mortas de *Salmonella* da presente invenção, em particular para preparar um medicamento, de preferência uma vacina.

[0039] De preferência, o medicamento é útil para a prevenção e/ou o tratamento de infecções por *Campylobacter jejuni* e opcionalmente por *Salmonella*, de preferência infecções em animais de criação, mais preferivelmente em gado bovino e aves, ainda mais preferivelmente em aves tais como frangos, perus, gansos e patos.

[0040] Um terceiro aspecto da presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica, alimento ou ração (aditivo) compreendendo a *Salmonella enterica* morta ou viva da presente invenção e um excipiente fisiologicamente aceitável.

[0041] Por exemplo, uma composição farmacêutica da presente invenção pode ser preparada por crescimento em média ou grande escala das cepas de *Salmonella* da invenção contendo seja pelo menos um operon *pgl* codificado por plasmídeo ou integrado em um

cromossoma ou um derivado do mesmo. Estas cepas de *Salmonella* podem ser usadas diretamente ou podem ser formuladas para acomodar o alvo específico do ser humano ou animal e a via de administração específica. Composições farmacêuticas compreendendo *Samonella* viva são preferidas por motivos óbvios.

[0042] Alternativamente, a invenção refere-se a um alimento ou ração para seres humanos ou animais, de preferência animais de criação, mais preferivelmente aves, compreendendo a *Salmonella enterica* morta ou viva da presente invenção e um excipiente fisiologicamente aceitável e/ou substâncias de grau alimentício. Por exemplo, tal ração pode reduzir bastante a colonização por *C. jejuni* de bandos de aves e consequentemente reduzir a chance de infecções humanas por *C. jejuni* e também de infecções por *Salmonella* através de carne contaminada.

[0043] Um quarto aspecto da presente invenção refere-se a um método para o tratamento e/ou a prevenção de infecções por *C. jejuni* e opcionalmente de infecções por *Salmonella*, compreendendo a administração de uma composição farmacêutica, alimento ou ração à base de *Salmonella enterica* da presente invenção a um ser humano ou animal com necessidade da mesma em uma quantidade fisiologicamente ativa.

[0044] Para uso terapêutico e/ou profilático, as composições farmacêuticas da invenção podem ser administradas em qualquer forma de dosagem convencional de qualquer maneira convencional. As vias de administração incluem, porém sem limitação, as vias intravenosa, intramuscular, subcutânea, intranasal, intrassinovial, por infusão, sublingual, transdérmica, oral (por exemplo, gavagem), tópica ou por inalação. Os modos de administração preferidos são oral, intravenoso e intranasal, oral e intranasal sendo mais preferidos.

[0045] A *Salmonella* da invenção pode ser administrada isolada ou

em combinação com adjuvantes que aumentam a estabilidade e/ou a imunogenicidade da bactéria, facilitam a administração das composições farmacêuticas que os contém, proporcionam dissolução ou dispersão aumentadas, aumentam a atividade de propagação, proporcionam terapia adjunta, entre outros, inclusive outros princípios ativos.

[0046] As formas farmacêuticas de dosagem da *Salmonella* descrita nesta invenção incluem veículos e/ou adjuvantes farmaceuticamente aceitáveis conhecidos pelos especialistas na técnica. Estes veículos e adjuvantes incluem, por exemplo, trocadores de íons, alumina, estearato de alumina, lecitina, proteínas séricas, substâncias tamponantes, água, sais, eletrólitos, substâncias à base de celulose, gelatina, água, petrolato, óleo animal ou vegetal, óleo mineral ou sintético, solução salina, dextrose ou outros compostos sacarídios e glicólicos tais como etileno glicol, propileno glicol ou polietileno glicol, antioxidantes, lactato etc. As formas de dosagem preferidas incluem comprimidos, cápsulas, soluções, suspensões, emulsões, pós-reconstituíveis e emplastros transdérmicos. Métodos para preparar as formas de dosagem são bastante conhecidos, vide, por exemplo, H. C. Ansel & N. G. Popovish, Pharmaceutical *Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 5th ed., Lea & Febiger (1990) e, em particular, Pastoret et al., Veterinary Vaccinology, Elsevier March 1999). Os níveis e as necessidades de dosagem são bastante conhecidos na literatura e podem ser escolhidos pelos especialistas na técnica entre os métodos e técnicas disponíveis adequados para um paciente particular. Como o especialista na técnica vai perceber, doses mais baixas ou mais altas podem ser necessárias dependendo de fatores particulares. Por exemplo, as doses e os regimes de tratamento específicos vão depender de fatores tais como o perfil de saúde geral do paciente (humano ou animal), a gravidade e o curso do distúrbio do paciente ou

predisposição do paciente ao mesmo, e o critério ou médico ou veterinário assistente.

[0047] Em uma modalidade preferida para vacinação oral, o regime consiste na administração de *Salmonella* contendo o operon *pgl* ou derivado do mesmo seja em plasmídeo ou integrado no cromossoma no 1° ou 2° dia após a chocagem dos pintos com cerca de 10^6 cfu (unidades formadoras de colônias) por pinto com um reforço no 14° ou 21° dia após a chocagem com a mesma quantidade de bactérias. Estas duas administrações vão proporcionar estímulo suficiente para o sistema imunológico produzir uma resposta contra N-glicano de *C. jejuni* ou contra derivados do mesmo e também contra proteínas de *Salmonella* para proporcionar proteção contra uma posterior colonização dos frangos. Uma alternativa para a vacinação de pintos é por injeção intravenosa da bactéria inativada, por exemplo, inativada por calor ou inativada por formalina no 1° ou 2° dia após a chocagem e um reforço no 14° ou 21° dia. Como uma outra alternativa, os pintos também podem ser vacinados apenas uma vez em um momento posterior com até 3 semanas de idade, seja por via intravenosa com a bactéria inativada por calor ou inativada por formalina ou por via intragástrica com a bactéria viva.

[0048] E por fim, porém não menos importante, a presente invenção refere-se a um método para produzir *Salmonella enterica* de acordo com a invenção, compreendendo as etapas de

(i) introduzir na *Salmonella enterica*, de preferência por pelo menos um vetor plasmídico ou por integração genômica, pelo menos um operon *pgl* de *C. jejuni* ou um derivado funcional do mesmo, de preferência pelo menos um operon *pgl*, onde um ou mais, de preferência todos os genes para a biossíntese de bacilosamina são inativados, e

(ii) de preferência introduzir mutações e/ou deleções no gene wbaP levando à inativação completa da biossíntese do antígeno O.

[0049] A seguir, a presente invenção será ainda ilustrada com referência a modalidades específicas e a experiências que não devem ser interpretadas como limitativas do escopo da invenção apresentadas pelas reivindicações anexas.

FIGURAS

[0050] A **figura 1** é uma ilustração esquemática de uma exibição de N-glicano de *C. jejuni* em *S. enterica* sv. Typhimurium.

A) mostra a transferência de N-glicano de *C. jejuni* para um núcleo do lipídio A de *S.* Typhimurium em uma cepa produtora do antígeno O e apresentando o operon pgl_{mut} ("mut" significa que PglB é inativado por 2 mutações pontuais);

B) mostra a *S.* Typhimurium cepa *ΔwbaP* sem antígeno O e apresentando um operon $pgl3_{mut}$ no qual os genes para a biossíntese de bacilosamina são deletados;

C) ilustra as deleções no operon $pgl3_{mut}$.

[0051] A **figura 2** demonstra a exibição de *N*-glicanos de *C. jejuni* em *S. enterica* sv. Typhimurium

A) mostra um imunoblot de *N*-glicano anti*C. jejuni* de um SDS-PAGE de extratos de células integrais do tipo selvagem e Δ*wbaP* tratados com proteinase K de *S.* Typhimurium de cepas portadoras dos plasmídeos indicados e demonstra a exibição de *N*-glicano de *C. jejuni* no núcleo do lipídio A de *S. Typhimurium*.

B) é um SDS-PAGE colorido com prata (quadro da esquerda) e um imunoblot do antígeno O grupo B anti-*Salmonella* (quadro da direita) de um SDS-PAGE de extratos de células integrais do tipo selvagem e Δ*wbaP* tratados com proteinase K de *S.* Typhimurium. Ele confirma a falta do antígeno O polimérico na cepa Δ*wbaP*.

C) mostra um imunoblot de *N*-glicano anti*C. jejuni* de um SDS-PAGE de *S. Typhimurium* cepa ΔwbaP com um vetor vazio integrado (controle) ou com um operon $pgl3_{mut}$ integrado e comprova a

expressão de N-glicano de *C. jejuni* no núcleo do lipídio A de *S.* Typhimurium ΔwbaP com um operon $pgl3_{mut}$ integrado.

D) retrata no quadro da esquerda um imunoblot usando soro de um camundongo infectado por via intravenosa com *S. Typhimurium* Δ*wbaP* morta por calor apresentando *N*-glicano de *C. jejuni* com GlcNAc na extremidade de redução e codificada por $pgl3_{mut}$. O reconhecimento de células *C. jejuni* do tipo selvagem, mas não de células 81-176*pglB* de *C. jejuni,* é evidente. O quadro da direita mostra um SDS-PAGE corado com Coomassie das amostras usadas na análise do imunoblot do soro de camundongos.

[0052] A **figura 3** retrata os testes *in vitro* usados para demonstrar a atenuação de *S.* Typhimurium Δ*wbaP*

A) mostra uma sensibilidade aumentada de *S.* Typhimurium Δ*wbaP* ao complemento em soro humano: a morte mediada por complemento da cepa do tipo selvagem de serovar Typhimurium resistente à canamicina, M939, Δ*wbaP::cat* negativa para antígeno O (SKI11) e Δ*wbaP::*pKI9 mutante complementada (SKI33) foi testada por incubação de uma mistura 1:1:1 de *Salmonella* do tipo selvagem, Δ*wbaP* e Δ*wbaP::*pKI9 (SKI33) para os tempos indicados junto com 20% de soro humano ou 20% de soro humano inativado por calor. A sobrevivência foi analisada por plaqueamento em meios de diferenciação.

B) representa o resultado da configuração experimental de A), porém diferindo no uso de soro inativado por calor. Nenhuma das cepas teve sua sobrevivência afetada.

C) ilustra a deficiência de *S.* Typhimurium Δ*wbaP* na motilidade de natação comparada com a S. Typhimurium do tipo selvagem e com cepa imóvel *fliGHI*:Tn*10*.

[0053] A **figura 4** demonstra uma capacidade de colonização reduzida para *S.* Typhimurium Δ*wbaP* em um experimento de

coinfecção com *S.* Typhimurium tipo selvagem.

A) representa graficamente os índices de competitividade (CI; (mutante/tipo selvagem) saída / (mutante/tipo selvagem) entrada) de serovar Typhimurium Δ*wbaP* (SKI12) e tipo selvagem determinados 1-3 dias após infecção em fezes e 4 dias após infecção no conteúdo cecal demonstrando uma capacidade de colonização reduzida de *S.* Typhimurium ∆*wbaP* quando comparada com o tipo selvagem.

B) CI no mLN, baços e fígados 4 dias após a infecção.

EXEMPLOS

CEPAS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

[0054] Um sumário das cepas bacterianas usadas para as experiências relacionadas nos exemplos está apresentado na tabela 1. As bactérias foram desenvolvidas em meio Luria-Bertani (LB) (10 g/l triptona Bacto, 5 g/l extrato de levedura Bacto, 5 g/l NaCl). Placas de LB ágar foram suplementadas com 1,5% (p/v) de ágar. Os antibióticos foram usados nas seguintes concentrações finais: ampicilina (amp) a 100 µg/ml, canamicina (kan) a 50 µg/ml, cloranfenicol (cam) a 25 µg/ml, estreptomicina (strep) a 50 µg/ml, tetraciclina (tet) a 10 µg/ml.

Exemplo 1 - Exibição de *N*-glicano de *C. jejuni* no núcleo do lipídio A de *Salmonella enterica* sv. Typhimurium

[0055] A biossíntese do antígeno O Wzy-dependente e a biossíntese de *N*-glicano de *C. jejuni* são processos homólogos (Feldman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA.;102(8):3016-21, 2005) que começam ambos com a união de uma estrutura oligossacarídica a um ligador undecaprenilpirofosfato. A homologia das duas vias assim como a especificidade para substrato relaxada da *S. enterica* sv. Typhimurium antígeno O ligase WaaL (Fält et al., Microbial Pathogenesis 20:11-30, 1996; De Qui Xu et al., Vaccine 25: 6167-6175, 2007) foi explorada quanto à possibilidade de combinar as duas vias para exibir o *N*-glicano de *C. jejuni* no núcleo do lipídio A de *Salmonella*.

[0056] Um plasmídeo contendo o operon *pgl*$_{mut}$ de *C. jejuni* com PglB inativado (pACYC*pgl*$_{mut}$; Wacker et al. 2002) foi introduzido em uma cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium por eletroporação. Como controle negativo o vetor vazio correspondente pACYC184 foi usado.

[0057] Os glicoconjugados dos transformantes foram testados quanto à exibição do N-glicano de *C. jejuni* por SDS-PAGE e subsequente imunoblot com um antissoro de N-glicano anti*C. jejuni* (Amber 2008). As amostras foram preparadas da seguinte maneira: O equivalente de 2 OD_{600}/ml de culturas em crescimento na fase log de *S. enterica* sv Typhimurium contendo seja pACYC184 seja pACY*pgl*$_{mut}$ foi centrifugado a 16.000 *g* por 2 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspendidas em 100 µl de tampão de amostra Lämmli (Tris-HCl 0,065 M pH 6,8, 2 % SDS (p/v), 5 % ß-mercaptoetanol (v/v), 10 % de glicerina (v/v), 0,05 % de azul de bromofenol (p/v)) e lisadas por 5 minutos a 95℃. Depois de esfriar para a temperatura ambiente, proteinase K (Gibco/Life Technologies) foi adicionada (concentração final 0,4 mg/ml) e incubada por 1 hora a 60 ℃ antes de carregar quantidades iguais para uma eletroforese em gel de dodecilsulfato de sódio poliacrilamida a 15 % (SDS-PAGE). Para detectar N-glicano de *C. jejuni*, um antissoro policlonal de coelho contra N-glicano de *C. jejuni* foi usado (S. Amber, PhD.-thesis, ETH Zurique, Department of Biological Science. Zurique, 2008). A visualização dos sinais foi feita com o conjugado IgG-HRP de cabra anticoelho (Santa Cruz) e ECL (Amersham) conforme recomendação do fabricante.

[0058] N-glicano de *C. jejuni* pôde ser detectado no núcleo do lipídio A de S. enterica sv. Typhimurium quando pACYC*pgl*$_{mut}$ estava presente nas células (figura 2A faixa 2) mas não quando o vetor vazio havia sido introduzido nas células (figura 2A faixa 1). Isto mostra que a *S. enterica* sv *Typhimurium WaaL* transfere N-glicano de *C. jejuni* do

undecaprenilpirofosfato para o núcleo do lipídio A.

Exemplo 2 - Construção de uma deleção *wbaP* em *Salmonella enterica* sv Typhimurium e exibição aumentada de *N*-glicano de *C. jejuni* na cepa negativa para o antígeno O

[0059] Foi suposto que a deleção da biossíntese do antígeno O abolia a competição entre a via da biossíntese do antígeno O e a biossíntese de N-glicano de *C. jejuni* para o undecaprenilfosfato veículo de lipídio.

[0060] A construção de um mutante por deleção de *wbaP* da *S. Typhimurium* tipo selvagem SL1344 foi feita da maneira descrita (Datsenko & Wanner, PNAS USA 97(12): 6640-5, 2000). Os iniciadores RfbP H1P1 (para sequência vide tabela 1) e RfbP H2P2 combinando com o DNA gabarito do plasmídeo pKD3, que é portador de um gene de resistência ao cloranfenicol flanqueado por sítios FRT (alvo de reconhecimento de FLP) foram sintetizados. Estes iniciadores também contêm 40 a 45 nucleotídeos adicionais correspondendo a regiões diretamente a montante e a jusante do gene *wbaP*. Eles foram usados para amplificar um cassete de genes para deleção "in frame" de *wbaP* da maneira descrita (Datsenko & Wanner, vide acima). Depois da expressão induzida por arabinose da λ Red recombinase do plasmídeo pKD46 em *S.* Typhimurium tipo selvagem cepa SL1344 a recombinase trocou o gene-alvo pelo cassete de cloranfenicol do produto de PCR introduzido por eletroporação. Os transformantes foram selecionados por plaqueamento em placas de clorafenila a 37°C por uma noite e a presença do gene *cat* na posição correta no genoma foi confirmada por PCR. O clone resultante resistente à cloranfenila (*wbaP::cat*) foi denominado SKI11. A remoção do cassete de resistência a cloranfenicol foi possível usando pCP20 codificando a FLP recombinase reconhecendo as regiões FRT flanqueadoras e a cepa resultante foi denominada SKI12 depois de verificação por PCR (vide também Ilg,

Endt et al., Inf. Immun., 77, 2568, June 2009).

[0061] Análise fenotípica dos glicoconjugados da cepa resultante foi realizada por SDS-PAGE seguida por subsequente coloração dos glicoconjugados com prata. Para SDS-PAGE, as amostras foram preparadas das seguintes maneiras: O equivalente de 2 OD_{600}/ml de culturas em crescimento na fase log de *S.* Typhimurium tipo selvagem ou *S.* Typhimurium Δ*wbaP* (SKI12) foi centrifugado a 16.000 *g* por 2 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspendidas em 100 µl de tampão de amostra Lämmli (Tris-HCl 0,065 M pH 6,8, 2 % SDS (p/v), 5 % ß-mercaptoetanol (v/v), 10 % glicerina (v/v), 0,05 % azul de bromofenol (p/v)) e lisadas por 5 minutos a 95℃. Depois de esfriar para a temperatura ambien te, proteinase K (Gibco/Life Technologies) foi adicionada (concentração final 0,4 mg/ml) e incubada por 1 hora a 60 ℃ antes de carregar qua ntidades iguais para uma eletroforese em gel de dodecilsulfato de sódio poliacrilamida a 12 % (SDS-PAGE). Para detectar o antígeno O de *S. Typhimurium*, antissoro O de *Salmonella* grupo B fatores 1, 4, 5, 12 (Difco) foi usado. A visualização dos sinais foi feita com o conjugado IgG-HRP de cabra anticoelho (Santa Cruz) e ECL (Amersham) conforme recomendação do fabricante. Para coloração, o método de Tsai e Frasch foi usado (Tsai & Frasch, Anal. Biochem. 119(1): 115-9, 1982).

[0062] A deleção do gene codificando a fosfogalactosil-transferase WbaP em *S. enterica* tipo selvagem levou à abolição da biossíntese do antígeno O como visível na figura 2B. SDS-PAGE com subsequente coloração dos glicoconjugados com prata assim como uma SDS-PAGE seguida por um imunoblot com antiantissoro O específico para *Salmonella* grupo B mostram o padrão de escada de lipopolissacarídeos típico do antígeno O polimérico para a *S. enterica* sv. Typhimurium cepa tipo selvagem e a ausência deste padrão na cepa Δ*wbaP*.

[0063] Esta *S. enterica* sv. Typhimurium ΔwbaP SKI12 negativa

para o antígeno O foi testada quanto a sua capacidade de exibir N-glicano de *C. jejuni* em sua superfície celular. Os plasmídeos pACYCpglmut ou pACYC184 foram introduzidos por eletroporação. Os glicoconjugados para os transformantes foram analisados da maneira descrita no exemplo 1. Foi possível detectar N-glicano de *C. jejuni* em intensidades mais altas na faixa contendo a cepa ΔwbaP em comparação com o tipo selvagem (figura 2A faixa 4 versus faixa 2). Não foi possível detectar N-glicano de *C. jejuni* quando o vetor vazio pACYC184 estava presente na *S. enterica* sv. Typhimurium ΔwbaP SKI12. Isto demonstra que na cepa ΔwbaP mais N-glicano de *C. jejuni* é transferido para o núcleo do lipídio A.

Exemplo 3: Construção de um operon pglmut de *C. jejuni* alterado levando a uma exposição aumentada de N-glicano de *C. jejuni* em *Salmonella enterica* sv. Typhimurium

[0064] Na *C. jejuni*, o N-glicano é sintetizado como o heptassacarídeo GalNAc5(Glc)-Bac, onde Bac, o açúcar na extremidade de redução, é 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesóxi-glicopiranose. Em *E. coli* e *S. Typhimurium* Bac não é sintetizado a não ser que o mecanismo de biossíntese do N-glicano de *C. jejuni* seja expresso de forma heteróloga. Foi mostrado que em células de *E. coli* tipo selvagem coexpressando o mecanismo de biossíntese do N-glicano de *C. jejuni* são sintetizados dois tipos diferentes de N-glicano, um com Bac na extremidade de redução e um com GlcNAc. Este fenômeno pôde ser atribuído à ação de WecA, uma UDP-GlcNAc: undecaprenilfosfato GlcNAc-1-fostato transferase envolvida na biossíntese de glicolipídios (Linton D. et al., Mol. Microbiol.,55(6):1695-703, 2005). Como sabemos que a *Salmonella enterica* sv Typhimurium antígeno O ligase WaaL pode transferir estruturas contendo GlcNAc para o núcleo do lipídio A foi especulado que um N-glicano contendo GlcNAc seria um melhor substrato para WaaL do que um N-glicano contendo Bac. Foi construído

um operon pgl_{mut} que foi deletado nos genes para a biossíntese de bacilosamina, a saber pglD,E,F,G. Os genes codificando PglE, F, G foram completamente deletados ao passo que um gene codificando PglD foi parcialmente deletado. A estrutura de leitura aberta (ORF) pglD no operon pgl alterado termina depois de 270 pares de bases ao passo que a ORF de comprimento integral contém 612 pares de bases. O procedimento para construir este operon pgl_{mut} alterado foi realizado usando *E. coli* DH5α como a cepa hospedeira para propagação do plasmídeo e é o seguinte: pACYCpglmut DNA foi digerido com Alw44I e SmaI, e em seguida a projeção Alw44I foi introduzida com o fragmento DNA polimerase I Klenow e religada. O operon resultante foi denominado pACYCpgl3mut e foi transformado na cepa ΔwbaP. Os glicoconjugados dos transformantes resultantes foram analisados da maneira descrita no exemplo 1. Foi possível N-glicano de *C. jejuni* em intensidades mais altas na faixa contendo a cepa ΔwbaP com o operon pgl3mut do que na faixa contendo a cepa ΔwbaP sem o operon pglmut, quando comparada com o tipo selvagem (figura 2A faixa 5 versus faixa 4). Considerando-se tudo isto, a cepa ΔwbaP com pgl3mut mostra as intensidades mais altas quando investigada com antissoro de N-glicano anti*C. jejuni* e portanto demonstra os níveis mais altos de N-glicano de *C. jejuni* exibidos no núcleo do lipídio A de *Salmonella enterica* sv Typhimurium.

Exemplo 4: Integração do operon pgl3mut no genoma de *Salmonella enterica* sv Typhimurium cepa Δ wbaP negativa para o antígeno O

[0065] Para garantir exibição contínua do N-glicano de *C. jejuni* no núcleo do lipídio A de *Salmonella enterica* sv Typhimurium cepa ΔwbaP *in vivo*, o operon pgl3mut foi integrado no genoma da cepa ΔwbaP SKI12 a jusante do gene pagC.

[0066] Todas as etapas de clonagem envolvendo um plasmídeo

suicida com o oriR6K foram efetuadas em *E. coli* CC118λpir. O plasmídeo suicida integrativo final pKI15 foi construído da seguinte maneira: Uma sequência de 512 bp homóloga à região-alvo no genoma de Salmonella foi amplificada por PCR com os iniciadores 3' PagC Fw NotI e 3' PagC Rev SacII (vide sequência na tabela 1). O fragmento de DNA resultante foi inserido com SacII e NotI no pSB377 e o plasmídeo foi denominado pKI14 depois de verificação da sequência de inserção. O PKI15 foi construído por digestão de DNA de pACYCpgl3mut com BamHI e EheI com digestão simultânea de pKI14 com BamHI e SmaI. O fragmento de 11083 bp cortado do pACYCpgl3mut foi então ligado com o esqueleto de pKI14. Como a eletroporação de plasmídeos suicidas em cepas de *Salmonella* é muito ineficiente, os pKI15 ou pKI14 foram primeiro introduzidos em *E. coli* Sm10λpir para conjugação por eletroporação. Sm10λpir contendo pKI15 ou pKI14 foi então conjugada com SKI12. Para conjugação os equivalentes de 4 OD600 de culturas em fase log tardia de Sm10λpir contendo pKI15 e SKI12 foram centrifugados e lavados três vezes com 1 ml de LB. As pelotas foram ressuspendidas em 100 µl de LB, combinadas e espalhadas com um diâmetro de 3 cm sobre uma placa de LB ágar que foi então incubada por uma noite a 37°C. As bactérias foram removidas da placa por meio de lavagem desta na manhã seguinte com 1 ml de LB e diversas diluições plaqueadas sobre LB (+strep+tet) buscando conjugantes. As cepas resultantes foram denominadas SKI34 (SKI12::pKI14) e SKI35 (SKI12::pKI15).

[0067] Para analisar a presença de N-glicano de *C. jejuni* no núcleo do lipídio A das cepas negativas para o antígeno O contendo ou o conjunto pgl3mut integrado ou o vetor vazio integrado como um controle negativo, extratos de células integrais de SKI34 e SKI35 foram preparados e analisados da maneira descrita no exemplo 1. A figura 2C é um imunoblot detectado com antissoro de N-glicano de anti*C. jejuni*

que mostra sinais intensos na faixa 2 contendo SKI35, porém nenhum sinal para a faixa 1 contendo SKI34. Isto demonstra a transferência eficiente de N-glicano de *C. jejuni* para o núcleo do lipídio A de *Salmonella enterica* sv Typhimurium de um operon pgl3mut integrado.

Exemplo 5: Imunogenicidade do glicano codificado pelo operon *pgl3*$_{mut}$

[0068] Para investigar a imunogenicidade do glicano codificado por *pgl3*$_{mut}$ camundongos foram infectados com bactérias SKI12 +pML*pgl3*$_{mut}$ inativadas por calor e o soro dos mesmos foi testado quanto à presença de anticorpos N-glicano anti*C. Jejuni*. A experiência foi realizada da seguinte maneira:

Experiências com infecção em camundongos

[0069] Infecções por *Salmonella* foram realizadas em gaiolas individualmente ventiladas no RCHCI, Zurique, de maneira já descrita (Stecher, Hapfelmeier et al., Infection Infect Immun. 2004 Jul;72(7):4138-50 2004). Para a infecção intravenosa os camundongos receberam uma injeção de 5 x 10^5 CFU de S. Typhimurium SL1344Δ*wbaP* inativada com calor (SKI12) e portadora de pMLBAD (controle) ou pML*pgl3*$_{mut}$ na veia terminal. Depois da análise dos soros no 29° dia após a infecção, os camundongos receberam novamente uma injeção das mesmas cepas bacterianas no 36° dia e os soros foram analisados no 50° dia.

Análise do soro dos camundongos

[0070] Os soros dos camundongos foram analisados quanto à produção de anticorpos para *N*-glicano de anti*C. jejuni* pelo imunoblot contra extratos de células integrais de 81-176 e 81-176*pglB* de *C. jejuni* (controle negativo). 81-176*pglB de C. jejuni* não produz proteínas glicosiladas e serviu como controle negativo. Extratos de células integrais foram preparados por colheita de *C. jejuni* de placas com crescimento bacteriano confluente com 1 ml de PBS. Depois de ajustar

as amostras com PBS à mesma densidade ótica, as células foram coletadas por centrifugação por 2 minutos a 16000 x g à temperatura ambiente. As células foram lisadas por 5 minutos a 95°C em tampão de amostra Lämmli (Tris-HCl a 0,065M pH 6,8, 2% de SDS (p/v), 5% de β-mercaptoetanol (v/v), 10% de glicerina (v/v), 0,05% de azul de bromofenol (p/v)) adicionado até completar os mesmos volumes finais que aqueles determinados anteriormente com PBS para dar a mesma quantidade de células em cada amostra. Isto foi confirmado separando-se volumes iguais de cada amostra por SDS-PAGE seguido por coloração das proteínas com azul de Coomassie. Adicionalmente, a proteína AcrA glicosilada e não glicosilada foi usada para visualização de uma resposta imunológica contra N-glicano de *C. jejuni*. Para análise dos soros dos camundongos, volumes iguais dos extratos de células integrais assim como quantidades de AcrA glicosilada e não glicosilada foram separados por SDS-PAGE seguido pela transferência das proteínas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno para detecção de imunoblot. Os soros dos camundongos serviram como antissoros primários na primeira etapa de incubação. IgG ligadas foram identificadas por um conjugado IgG-HRP anticamundongo (Bethyl Laboratories). A detecção foi realizada com ECL (Amersham) de acordo com a instrução do fabricante.

[0071] A figura 2D) mostra a presença de N-glicano-IgG anti*C. jejuni* nos soros dos camundongos 61 dias após reinfecção. Os anticorpos não reconheceram a AcrA não glicosilada nem os extratos de proteína não glicosilados de *C. jejuni* mostrando assim especificidade para o glicano. Não foi possível observar qualquer reação específica para N-glicano de *C. jejuni* com os soros dos camundongos infectados com as cepas de controle (dados não mostrados).

Exemplo 6: Fenótipo atenuado de *S. Typhimurium* Δ*wbaP*

[0072] A atenuação de S*. Typhimurium* Δ*wbaP* foi testada em várias

abordagens *in vitro* e uma abordagem *in vivo*. A abordagem *in vitro* consistiu em testar o mutante assim como o tipo selvagem quanto a sua resistência sérica, motilidade e resistência à polimixina B mímica de peptídio antimicrobiano. A capacidade de colonização da Δ*wbaP* foi analisada em uma experiência de coinfecção *in vivo*.

Análise da resistência sérica

[0073] A atividade bactericida do complemento foi testada essencialmente da maneira descrita (Bengoechea, Najdenski et al. 2004). Em suma, serovar Typhimurium *wbaP*::*cat* (SKI11), M939, um derivado resistente à canamicina de serovar Typhimurium cepa SL1344 do tipo selvagem (*aph* integrado a jusante de *sopE*) e células de serovar Typhimurium Δ*wbaP::*pKI9 (SKI33) retiradas de culturas em crescimento exponencial foram misturadas em quantidades iguais ($3x10^8$ cfu/ml para M393; $4x10^8$ cfu/ml para SKI11 e SKI33) e diluídas $5x10^4$ vezes antes do uso em 1 x PBS estéril. Esta cultura bacteriana diluída foi misturada 1:1 com 20 % de soro humano não contendo anticorpos contra serovar Typhimurium LPS e incubada a 37°C com leve agitação. Alíquotas foram retiradas em 0, 15 e 30 minutos depois da mistura e a atividade do complemento foi extinguida por adição de Caldo Infusão de Cérebro e Coração. As alíquotas foram mantidas em gelo até serem plaqueadas em LB (strep, kan) selecionando para o tipo selvagem, LB (Sm, Cam) selecionando para *wbaP*::*cat* e LB (Sm, Tet) para determinar a CFU de Δ*wbaP*::pKI9. O mesmo experimento foi realizado usando soro onde o complemento foi inativado por calor a 56°C por 30 minutos. Os dados estão mostrados como a média de log CFU ± desvios-padrão. A figura 3A mostra a resistência sérica diminuída de *S. Typhimurium* Δ*wbaP* quando comparada com o tipo selvagem. Depois de 30 minutos de incubação com 20% de soro humano as contagens para Δ*wbaP* foram sessenta vezes mais baixas que no início do período de incubação. A figura 3B representa as mesmas cepas

incubadas com soro inativado por calor como controle negativo.

Ensaio da motilidade de natação

[0074] Como a motilidade das bactérias é um fator de virulência conhecido a motilidade das bactérias foi testada em placas de ágar mole (0,3% (p/v) ágar, 5 g/l de NaCl, 10 g/l de Bacto triptona). 1 µl de culturas de uma noite de serovar Typhimurium tipo selvagem (SL1344), serovar Typhimurium Δ*wbaP* (SKI12), serovar Typhimurium Δ*wbaP::*pKI9 (SKI33) ou serovar Typhimurium *fliGHI*::Tn*10* (M933) foram colocados no meio das placas e a motilidade foi quantificada medindo-se o diâmetro da halo visível depois de 4,75 horas e 9,5 horas de incubação a 37℃. Cada experimento foi realizado em triplicat a em duas ocasiões diferentes e os dados estão mostrados como a média ± desvios-padrão. Como visível na figura 3C a motilidade foi fortemente reduzida em Δ*wbaP* (SKI12) em comparação com o tipo selvagem, porém ainda mais alta que no controle sem motilidade *fliGHI*::Tn*10.*

Análise da resistência à polimixina B

[0075] O equivalente de 1 OD_{600}/ml de culturas em crescimento exponencial de serovar Typhimurium tipo selvagem cepa SL1344 ou serovar Typhimurium Δ*wbaP* (SKI12) foi centrifugado, ressuspendido em 150 µl de 1x PBS estéril frio e diluído 5×10^6 vezes antes do uso. Para o ensaio, 45 µl das culturas diluídas foram misturados com 5 µl de polimixina B (Sigma, 1 µg/ml concentração final) ou 5 µl de PBS e incubados por 1 hora a 37°C com leve agitação. Depois da adição de 80 µl de LB, as bactérias foram plaqueadas em placas de LB-ágar contendo estreptomicina. A eficiência de sobrevivência foi calculada dividindo-se a CFU (unidades formadoras de colônias) da cultura tratada com peptídio pela CFU da cultura não tratada e multiplicando-se por 100. O ensaio foi realizado em triplicata em dois experimentos independentes e os dados estão mostrados como a média ± desvios-padrão. A resistência diminuída à polimixina B da *S.* Typhimurium

Δ*wbaP* em comparação com o tipo selvagem está mostrada na figura 3D.

Capacidade de colonização de ⊿wbaP em uma experiência de coinfecção

[0076] A capacidade de colonização da *S. Typhimurium ⊿wbaP* foi testada em uma experiência de coinfecção na qual camundongos foram infectados por via intragástrica com a *⊿wbaP* mutante assim como a cepa do tipo selvagem. Camundongos C57BL/6 (SPF; colônia da RCHCI, Zurique) foram previamente tratados por gavagem com 20 mg de estreptomicina. Após 24 horas, os camundongos foram inoculados com 5×10^7 CFU da cepa serovar Typhimurium ou com misturas de cepas conforme indicado. As cargas bacterianas (CFU) em pelotas fecais frescas, nodos linfáticos mesentéricos (mLNs), baço, e conteúdo cecal foram determinadas por plaqueamento em placas de ágar MacConkey (50 µg/ml de estreptomicina) de maneira já descrita (Barthel, Hapfelmeier et al. 2003). Os índices de competitividade (CI) foram determinados de acordo com a fórmula CI = (mutante/tipo selvagem) saída / (mutante/tipo selvagem) entrada depois do plaqueamento. Uma experiência de coinfecção de serovar Typhimurium tipo selvagem (M939) e da cepa Δ*wbaP* (SKI11) foi realizada. 5 camundongos tratados com estreptomicina foram infectados por via intragástrica com uma mistura 1:2 (total 5×10^7 CFU) da cepa Δ*wbaP* (SKI11) e da cepa do tipo selvagem. A relação das 2 cepas (CI; índice de competitividade, vide Materiais e Métodos) foi determinada nas fezes no 1°, 2° e 3° dias p.i. Uma diminuição nas contagens da Δ*wbaP* em comparação com o tipo selvagem foi detectada (escala de um log por dia) e comprovou que a cepa Δ*wbaP* (SKI11) apresentava realmente uma grave deficiência de competitividade em comparação com a cepa do tipo selvagem serovar Typhimurium no trato intestinal ($p > 0.05$; figura 4A). Além disso, o CI das duas cepas em sítios sistêmicos (mLN, fígado,

baço) no 4° dia p.i. também demonstrou uma deficiência de competitividade significativa da serovar Typhimurium Δ*wbaP* (SKI12). Não obstante, a deficiência foi menos significativa que no intestino (figura 4B).

TABELA 1: Cepas, plasmídeos e iniciadores para deleção de *wbaP* usados neste estudo

cepas de Salmonella enterica sv Typhimurium		
Cepa	Genótipo e fenótipo	Fonte ou referência
SL1344	tipo selvagem; $strep^R$	Hoiseth, S. K. and B. A. Stocker, Nature 291:238-239, 1981
SKI11	SL1344ΔwbaP::cat; $strep^R$, cam^R	este estudo
SKI12	SL1344ΔwbaP; $strep^R$	este estudo
SKI34	SKI12::pKI14; $strep^R$, tet^R	este estudo
SKI35	SKI12::pKI15; $strep^R$, tet^R	este estudo
cepas de Escherichia coli		
DH5a	SupE44 ΔlacU169 (Φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Hanahan, D., J. Mol. Biol., 5,166(4):557-80, 1983
CC118 λpir	Δ(ara-leu), araD, ΔlacX74, galE, galK, phoA20, thi-1, rpsE, rpoB, argE(Am), recA, λpir	Herrero, M., V. de Lorenzo, and K. N. Timmis. J Bacteriol 172:6557-6567.
Sm10λpir	thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4 2-Tc::Mu λpir; kan^R	Miller, V. L. and J. J. Mekalanos. J. Bacteriol. 170:2575-2583, 1988.
Plasmídeos		
Plasmídeo	Genótipo	Fonte ou referência
pSB377	tet^R oriR6K	Mirold et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:9845-9850, 1999.
pKD3	bla FRT cat FRT PS1 PS2 oriR6K	Datsenko, K. A. and B. L. Wanner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:6640-6645, 2000.
pKD46	bla P_{BAD} gam bet exo pSC101 oriTS	Datsenko, K. A., and B. L. Wanner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:6640-6645, 2000.

Continuação

pCP20	bla cat cI857 λP_R flp pSC101 oriTS	Datsenko, K. A., and B. L. Wanner,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:6640-6645, 2000
pACYC184	Cm^R, Tc^R, ori p15A	New England Biolabs
$pACYCpgl_{mut}$	Cm^R, ori p15A; conjunto de C. jejuni pgl com $pglB^{W458A,D459A}$ clonado em pACYC184	Science, 298(5599):1790-3, 29. Nov. 2002
$pACYCpgl3_{mut}$	Cm^R, ori p15A; C. jejuni pgl cluster with $pglB^{W458A,D459A}$ cloned in pACYC184, deletion of pglE, F, G and 3'- half of pglD	Este estudo
pKI14	Tet^R, oriR6K, região 3' de 500bp de PagC clonado em pSB377	Este estudo
pKI15	Tet^R, oriR6K, conjunto de C. jejuni pgl3mut com $pglB^{W458A,D459A}$ clonado em pKI15	Este estudo
Iniciadores para deleção de wbaP		
RfbP H1P1	CTTAATATGCCTATTTTATTTACATTATGCACGGTCAGAGGGTGAGGATTAAGTG TAGGCTGGAGCTGCTTC (SEQ ID Nº: 4)	
RfbP H2P2	GATTTTACGCAGGCTAATTTATACAATTATTATTCAGTACTTCTCGGTAAGCCATA TGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCC (SEQ ID NO: 5)	
Iniciadores para integração de $pgl3_{mut}$		
3' PagC Fw NotI	AAGCGGCCGCGCATAAGCTATG CGGAAGGTTC (SEQ ID NO: 6)	
3' PagC Rev SacII	ACCGCGGGACACTGAGGTAATA ACATTATACG (SEQ ID NO: 7)	

REIVINDICAÇÕES

1. *Salmonella enterica*, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos um operon *pgl* (de glicosilação de proteína) de *Campylobacter jejuni* e que apresenta pelo menos um N-glicano de *Campylobacter jejuni* ou um derivado de N-glicano do mesmo em sua superfície celular, em que um ou mais genes para biossíntese de bacilosamina são inativados por mutação e/ou por deleção parcial ou completa, de preferência por deleção parcial e/ou completa dos genes *pgl D, E, F*.

2. *Salmonella enterica,* de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que é selecionada do grupo que consiste em *Salmonella* typhimurium, enteriditis, heidelberg, gallinorum, hadar, agona, kentucky e infantis, mais preferivelmente cepas de *Salmonella enterica* serovar typhimurium.

3. *Salmonella enterica,* de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos um operon *pgl*, em que o produto gênico *pglB* é inativado por mutação e/ou por deleção.

4. *Salmonella enterica,* de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que pelo menos um derivado de N-glicano tem a fórmula (II)

GalNAc-a1,4-GalNAc-a1,4-[Glc-ß-1,3]GalNAc-a1,4-Gal-NAc-a1,4-GalNAc- a1,3-GlcNAc.

5. *Salmonella enterica,* de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que o(s) N-glicano(s) ou derivado(s) é (são) ligado(s) a pelo menos um polipeptídio de *Salmonella* homólogo ou heterólogo que é (são) transferido(s) e apresentado(s) na superfície celular, de preferência ligado(s) a pelo menos um polipeptídio compreendendo pelo menos uma sequon de consenso N-Z-S/T, mais preferivelmente D/E - X - N - Z - S/T (SEQ ID

N°: 1), em que X e Z podem ser qualquer aminoácido natural à exceção de Pro.

6. *Salmonella enterica,* de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que pelo menos um N-glicano ou derivado do mesmo é ligado ao núcleo do lipídio A de Salmonella.

7. *Salmonella enterica,* de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que a cepa de *Salmonella* é atenuada, de preferência por mutações em genes selecionados do grupo de genes que consiste nos genes em pab, pur, aro, aroA, asd, dap, nadA, pncB, galE, pmi, fur, rpsL, ompR, htrA, hemA, cdt, cya, crp, phoP, phoQ, rfc, poxA e galU, mais preferivelmente mutações aroA, cya e crp.

8. *Salmonella enterica,* de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que a cepa de *Salmonella* é atenuada por inativação parcial ou total da expressão do antígeno O, de preferência por uma ou mais mutações e/ou deleções do conjunto de genes rfb, mais preferivelmente no gene wbaP, ainda mais preferivelmente deleções do gene wbaP.

9. *Salmonella enterica,* de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que é de preferência uma cepa serovar typhimurium, em que

(a) compreende

(i) pelo menos um operon *pgl* de *Campylobacter jejuni*, em que um ou mais genes para a biossíntese de bacilosamina são inativados e

(ii) mutações e/ou deleções no gene wbaP que levam a completar a inativação da biossíntese do antígeno O,

(b) e apresentar em sua superfície celular pelo menos um N-glicano de *Campylobacter jejuni* ou um derivado de N-glicano do mesmo,

de preferência (II) GalNAc-a1,4-GalNAc-a1,4-[Glc-ß-1,3]GalNAc-a1,4-Gal-NAc-a1,4-GalNAc-a1,3-GlcNAc.

10. Uso de *Salmonella enterica*, de preferência *Salmonella enterica* viva, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que é para preparar um medicamento, de preferência uma vacina.

11. Uso, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que é para preparar um medicamento, de preferência uma vacina para a prevenção e/ou o tratamento de infecções por *Campylobacter jejuni* e opcionalmente *Salmonella*, de preferência infecções em animais de criação, mais preferivelmente em gado bovino e aves, mais preferivelmente em aves.

12. Composição farmacêutica, alimento ou ração, aditivo alimentar ou de ração, caracterizado pelo fato de que compreende *Salmonella enterica*, de preferência *Salmonella enterica* viva, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, e opcionalmente excipientes fisiologicamente aceitáveis.

13. Método para produzir *Salmonella enterica* como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de

(i) introduzir na *Salmonella enterica* por meio de pelo menos um vetor plasmidial ou por integração genômica pelo menos um operon *pgl* de *C. jejuni* ou um derivado funcional do mesmo, de preferência pelo menos um operon *pgl*, em que um ou mais, de preferência todos os genes para a biossíntese de bacilosamina são inativados, e

(ii) de preferência introduzir mutações e/ou deleções no gene wbaP levando à inativação completa da biossíntese do antígeno O.

FIG. 1

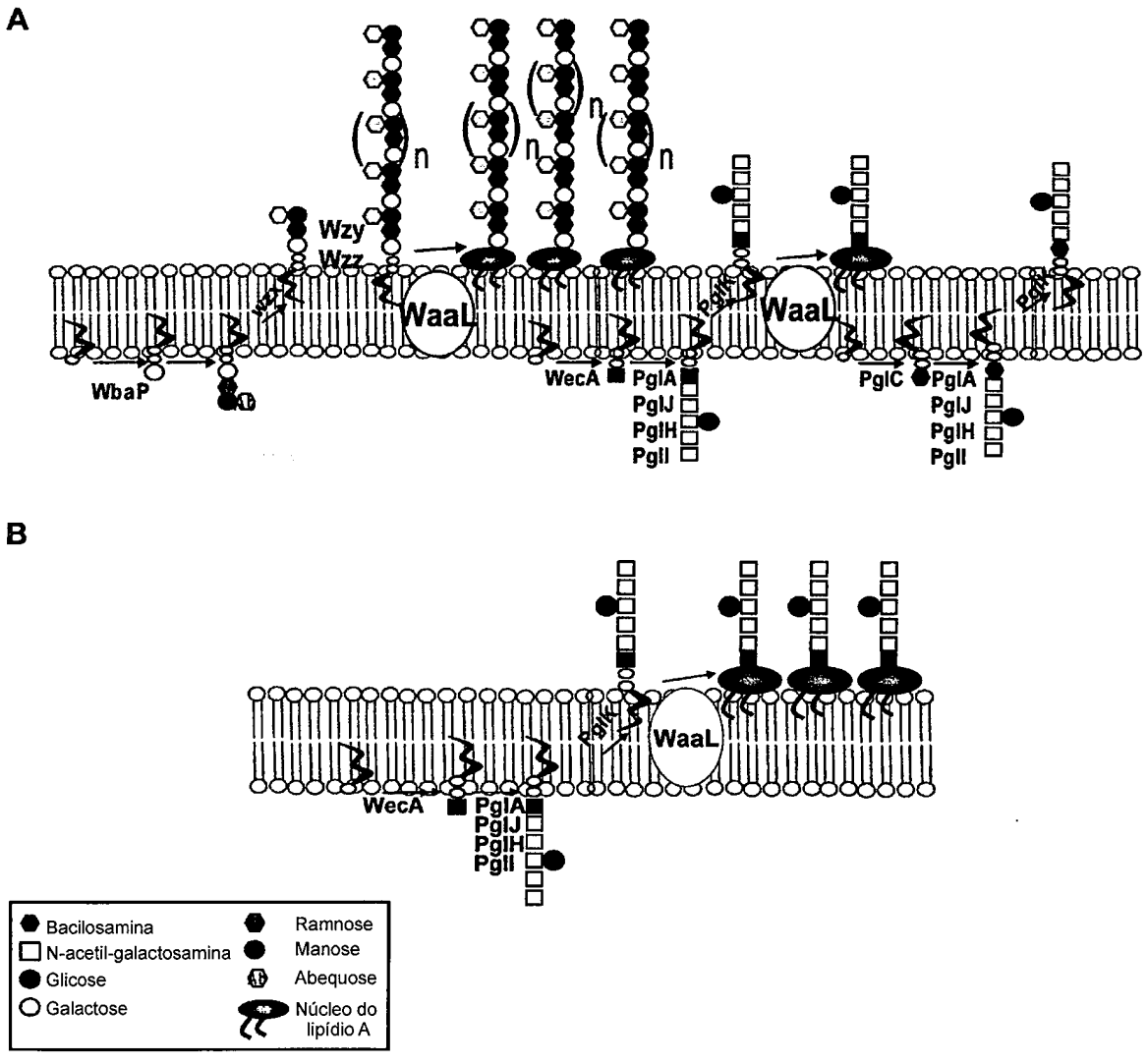

A
Wzy
Wzz
WaaL
WaaL
WbaP
WecA
PglA
PglJ
PglH
PglI
PglC
PglA
PglJ
PglH
PglI
B
WaaL
WecA
PglA
PglJ
PglH
PglI
Bacilosamina
N-acetil-galactosamina
Glicose
Galactose
Ramnose
Manose
Abequose
Núcleo do lipídio A
C
Deletado em pgl3mut
gne
pglK
pglH
pglI
pglJ
pglB$_{mut}$
pglA
pglC
pglD
pglE
pglF
pglG

FIG. 2

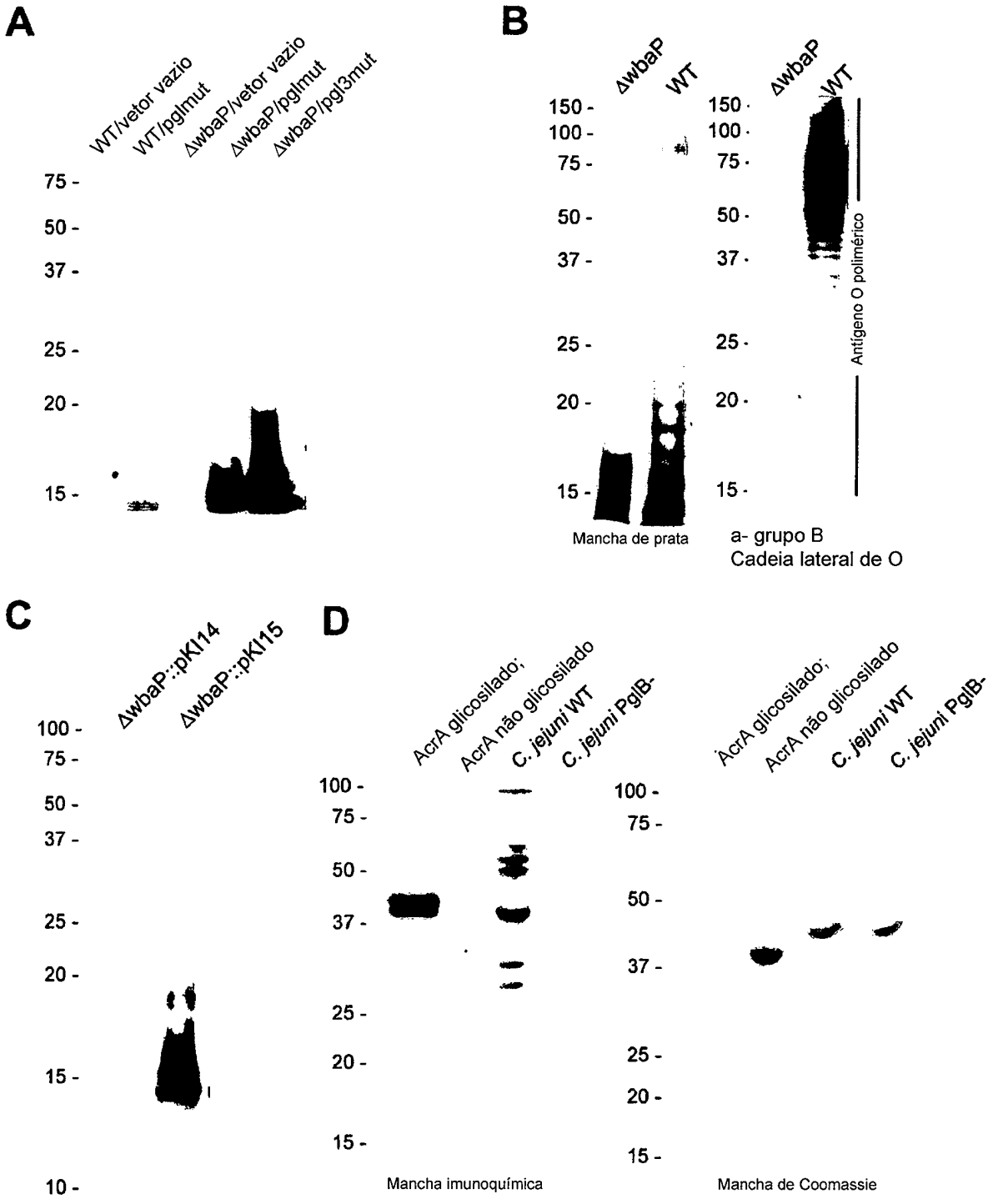

A
WT/vetor vazio
WT/pglmut
ΔwbaP/vetor vazio
ΔwbaP/pglmut
ΔwbaP/pgl3mut
75 -
50 -
37 -
25 -
20 -
15 -
B
ΔwbaP
WT
150 -
100 -
75 -
50 -
37 -
25 -
20 -
15 -
Antígeno O polimérico
Mancha de prata
a- grupo B
Cadeia lateral de O
C
ΔwbaP::pKI14
ΔwbaP::pKI15
100 -
75 -
50 -
37 -
25 -
20 -
15 -
10 -
D
AcrA glicosilado;
AcrA não glicosilado
C. jejuni WT
C. jejuni PglB-
100 -
75 -
50 -
37 -
25 -
20 -
15 -
Mancha imunoquímica
Mancha de Coomassie

FIG. 3

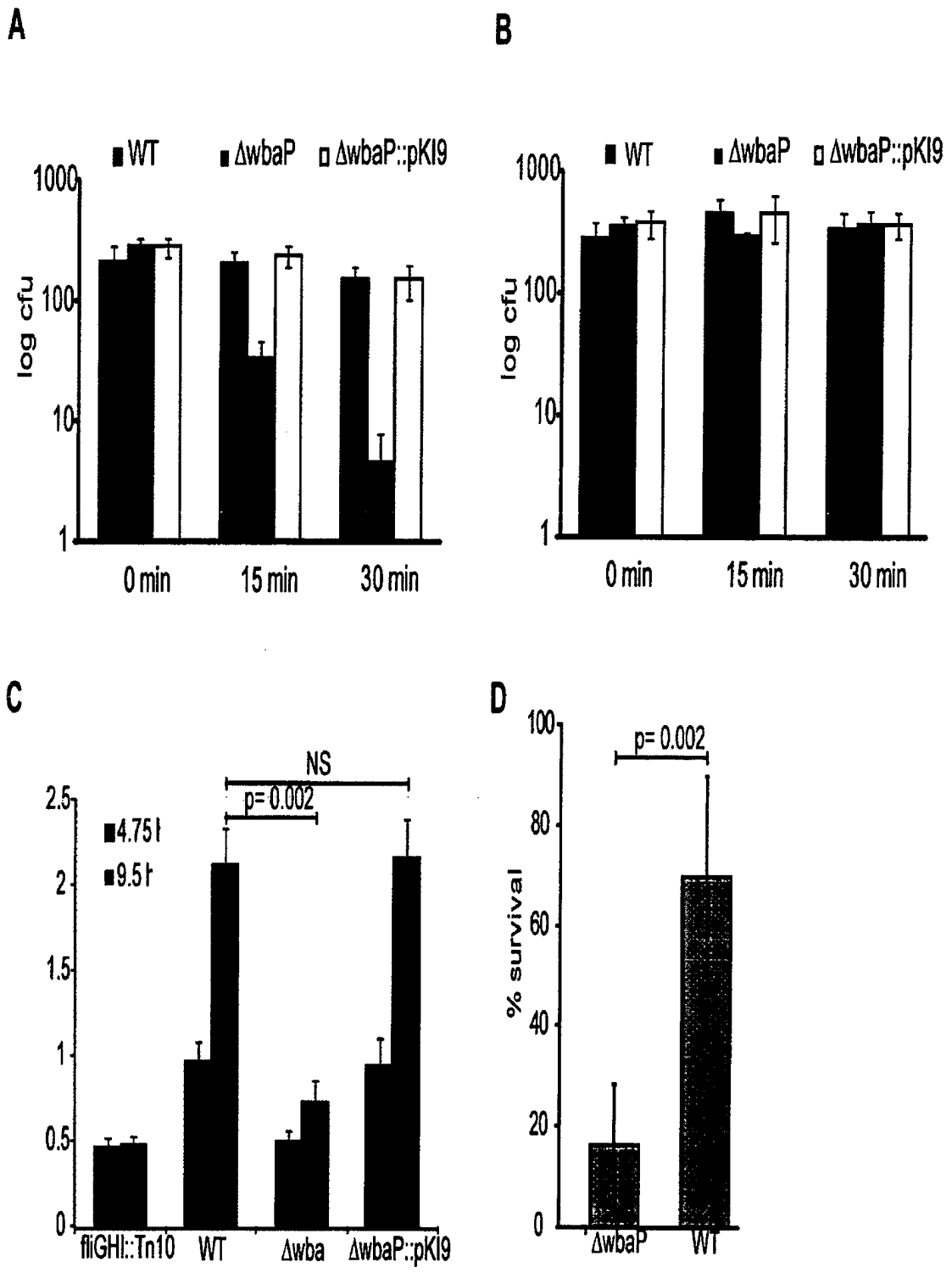
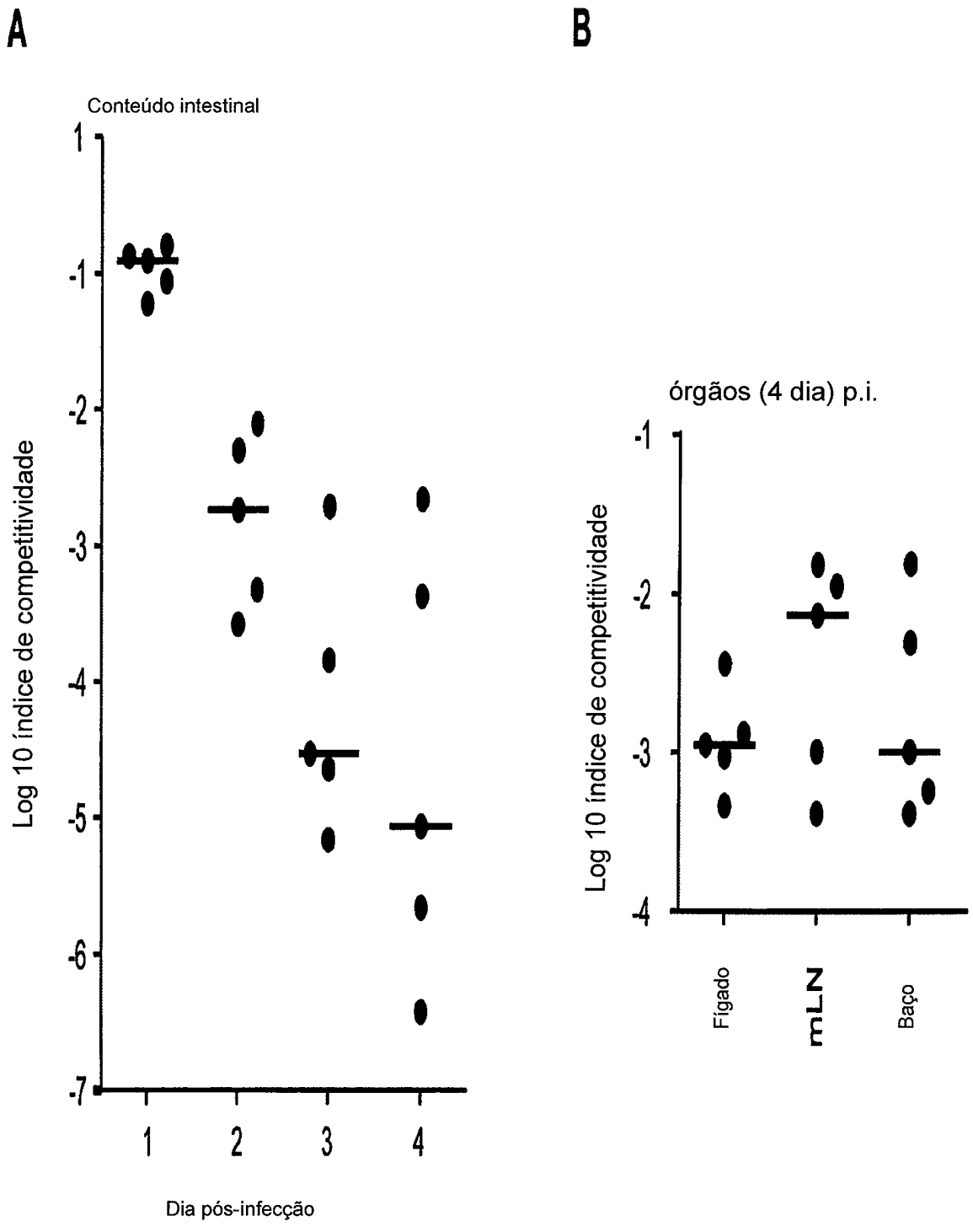

A
WT
ΔwbaP
ΔwbaP::pKI9
1000
100
10
1
log cfu
0 min
15 min
30 min
B
WT
ΔwbaP
ΔwbaP::pKI9
1000
100
10
1
log cfu
0 min
15 min
30 min
C
NS
p= 0.002
4.75 l
9.5 l
2.5
2
1.5
1
0.5
0
fliGHI::Tn10
WT
Δwba
ΔwbaP::pKI9
D
p= 0.002
100
80
60
40
20
0
% survival
ΔwbaP
WT

FIG. 4


A
Conteúdo intestinal
Log 10 índice de competitividade
1
-1
-2
-3
-4
-5
-6
-7
1
2
3
4
Dia pós-infecção
B
órgãos (4 dia) p.i.
Log 10 índice de competitividade
-1
-2
-3
-4
Fígado
mLN
Baço