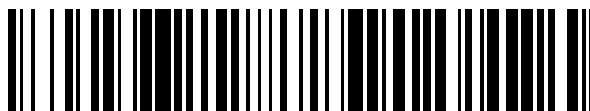


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 061**

51 Int. Cl.:

C12P 21/00 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C07K 14/205 (2006.01)

C07K 14/25 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2006 E 14199949 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2853600**

54 Título: **Proteínas N-glicosiladas recombinantes procedentes de células procariotas**

30 Prioridad:

11.05.2005 EP 05010276

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

06.03.2019

73 Titular/es:

**ETH ZÜRICH (100.0%)
ETH Transfer Rämistrasse 101
8092 Zürich, CH**

72 Inventor/es:

**AEBI, MARKUS;
KOWARIK, MICHAEL y
AHUJA, UMESH**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 703 061 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

Proteínas N-glicosiladas recombinantes procedentes de células procariotas

La presente invención se refiere a proteínas N-glicosiladas recombinantes, que comprenden una o más secuencia o secuencias consenso de aminoácidos N-glicosilados optimizados introducidas, a ácidos nucleicos que codifican estas proteínas, así como a vectores correspondientes y células hospedadoras. Además, la presente invención se dirige al uso de dichas proteínas, ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras para preparar medicamentos. Adicionalmente, la presente invención proporciona métodos para producir dichas proteínas.

Antecedentes de la invención

La glicosilación de proteínas ligada a N es un proceso esencial y conservado que tiene lugar en el retículo endoplásmico de organismos eucariotas. Es importante para el plegamiento de las proteínas, la oligomerización, la estabilidad, el control de calidad, la clasificación y el transporte de proteínas secretoras y de membrana (Helenius, A. y Aebi, M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. Annu. Rev. Biochem. 73, 1019-1049).

La glicosilación de proteínas tiene una profunda influencia sobre la antigenicidad, la estabilidad y la vida media de una proteína. Además, la glicosilación puede ayudar a la purificación de proteínas mediante cromatografía, por ejemplo, cromatografía de afinidad con ligandos de lectina unidos a una fase sólida que interaccionan con restos glicosilados de la proteína. Por lo tanto, es una práctica establecida producir de forma recombinante muchas proteínas glicosiladas en células eucariotas para obtener patrones de glicosilación de utilidad biológica y farmacéutica.

Solo en los últimos años se ha demostrado que una bacteria, el agente patógeno *Campylobacter jejuni* transmitido por los alimentos, también puede N-glicosilar sus proteínas (Szymanski, et al. (1999). Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*, Mol. Microbiol. 32, 1022-1030). La maquinaria necesaria para la glicosilación está codificada por 12 genes que se agrupan en el locus denominado *pgl*. La alteración de la N-glicosilación afecta a la invasión y la patogénesis de *C. jejuni* pero no es letal como en la mayoría de los organismos eucariotas (Burda P. y M. Aebi, (1999). The dolichol pathway of N-linked glycosylation. Biochim Biophys Acta 1426(2):239-57). Es posible reconstituir la N-glicosilación de las proteínas de *C. jejuni* mediante una expresión recombinante del locus *pgl* y de la glicoproteína aceptora en *E. coli* al mismo tiempo (Wacker et al. (2002). N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. Science 298, 1790-1793).

En la solicitud de Patente Europea n.º 03 702 276.1 (Patente Europea 1 481 057), una invención anterior de los presentes inventores, se describe un organismo procariota en el que se introduce un ácido nucleico que codifica (i) glicosiltransferasas específicas para el acoplamiento de un oligosacárido sobre un vehículo lipídico, (ii) una proteína diana recombinante que comprende una secuencia de consenso "N - X - S/T", en la que X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina, y (iii) una oligosacáril transferasa de *C. jejuni* (OTasa) que une covalentemente dicho oligosacárido con la secuencia de consenso sobre la proteína diana. Dicho organismo procariota produce N-glicanos con una estructura específica que se define por el tipo de las glicosiltransferasas específicas.

Aun cuando la presencia de la secuencia de consenso de N-glicosilación conocida en una proteína permite la N-glicosilación de proteínas diana recombinantes en organismos procariotas que comprenden la oligosacáril transferasa (OTasa) de *C. jejuni*, la N-glicosilación de algunas proteínas diana es frecuentemente ineficaz.

El documento WO 03074687 describe un sistema para la producción de glicoproteínas recombinantes en *E. coli* utilizando la proteína AcrA como una proteína modelo.

Wacker et al., Science, American Association for the Advancement of Science, EE.UU., Vol 298, 29 de noviembre de 2002, págs.1790-1793, describen el sistema de glicosilación ligado a N del locus *pgl* obtenido a partir de la bacteria *Campylobacter jejuni* y transferido funcionalmente a *E. coli*.

Nita-Lazar et al, Glycobiology, vol 15, n.º 4, abril de 2005, págs. 361-367, describen los requisitos de la secuencia de polipéptidos del receptor para la N-glicosilación en la N-glicosilación reconstituida de la proteína modelo AcrA en *E. coli*.

El objeto de la presente invención es proporcionar proteínas, así como medios y métodos para producir dichas proteínas que tienen una eficiencia optimizada para la N-glicosilación que pueden producirse en organismos procariotas *in vivo*. Otro objeto de la presente invención se dirige a la introducción más eficiente de N-glicanos en proteínas recombinantes para modificar la antigenicidad, la estabilidad y la actividad biológica, profiláctica y/o terapéutica de dichas proteínas. Un objeto adicional es el suministro de una célula hospedadora que muestra de manera eficiente en su superficie proteínas N-glicosiladas recombinantes de la presente invención.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una proteína N-glicosilada recombinante, que comprende una o más de las siguientes secuencia o secuencias consenso de aminoácidos optimizados N-glicosilados:

D/E- X- N- Z-S/T,

en la X y Z pueden ser cualquier aminoácido natural excepto Pro, en la que al menos una de dichas secuencia o secuencias consenso de aminoácidos optimizados N-glicosilados se introducen recombinantemente en dicha proteína, y en la que dicha proteína es la exoproteína de *P. aeruginosa*.

Se descubrió sorprendentemente que la introducción de secuencia o secuencias de aminoácidos específicas parciales (secuencia o secuencias de consenso optimizadas) en las proteínas da lugar a proteínas que se N-glicosilan de manera eficiente con la oligosacaril transferasa (OST, OTasa) de *Campylobacter* spp., preferentemente *C. jejuni*, en estas posiciones introducidas.

La expresión "secuencia o secuencias parciales de aminoácidos" tal como se usa en el contexto de la presente invención también se denominará "secuencia o secuencias de consenso optimizadas". La secuencia de consenso optimizada se N-glicosila con la oligosacaril transferasa (OST,_[MW1] OTasa) de *Campylobacter* spp., preferentemente *C. jejuni*, mucho más eficientemente que la secuencia de consenso normal "N - X - S/T", conocida en la técnica anterior.

En general, la expresión "proteína N-glicosilada recombinante" se refiere a cualquier polipéptido u oligopéptido heterólogo producido en una célula hospedadora que no comprende de forma natural el ácido nucleico que codifica dicha proteína. En el contexto de la presente invención, esta expresión se refiere a una exoproteína de *P. aeruginosa* producida de forma recombinante en cualquier célula hospedadora, por ejemplo, una célula hospedadora eucariota o procariota, preferentemente una célula hospedadora procariota, por ejemplo, *Escherichia* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Helicobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., más preferentemente *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella typhimurium* etc., en las que el ácido nucleico que codifica dicha proteína se ha introducido en dicha célula hospedadora y en las que la proteína codificada está N-glicosilada por la OTasa de *Campylobacter* spp., preferentemente *C. jejuni*, siendo dicha enzima transferasa de origen natural o habiéndose introducido de forma recombinante en dicha célula hospedadora.

De acuerdo con el código de una letra aceptado internacionalmente para los aminoácidos, las abreviaturas D, E, N, S y T significan ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, serina y treonina, respectivamente. Las proteínas de acuerdo con la invención difieren de las proteínas naturales o de la técnica anterior en que una o varias de las secuencia o secuencias de consenso optimizadas D/E - X - N - Z - S/T se introduce o introducen y se N-glicosilan. Por lo tanto, las proteínas de la presente invención difieren de las proteínas de origen natural de *C. jejuni* que también contienen la secuencia de consenso optimizada pero no comprenden ninguna secuencia de consenso optimizada adicional (introducida).

La introducción de la secuencia de consenso optimizada puede lograrse mediante la adición, delección y/o sustitución de uno o más aminoácidos. La adición, delección y/o sustitución de uno o más aminoácidos con el fin de introducir la secuencia de consenso optimizada puede lograrse mediante estrategias de síntesis química bien conocidas por los expertos en la materia, tales como la síntesis química de péptidos facilitada por una fase sólida. Alternativamente y de forma preferida para polipéptidos más grandes, las proteínas de la presente invención pueden prepararse mediante técnicas recombinantes convencionales.

Las proteínas de la presente invención tienen la ventaja de que pueden producirse con alta eficiencia y en cualquier hospedador procariota que comprende un operón *pgl* funcional procedente de *Campylobacter* spp., preferentemente de *C. jejuni*. OTasas alternativas preferidas procedentes de *Campylobacter* spp. para la puesta en práctica de los aspectos y las realizaciones de la presente invención, son *Campylobacter coli* y *Campylobacter lari* (véase Szymanski, C.M. y Wren, B.W. (2005). Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens. Nat. Rev. Microbiol. 3: 225-237). El operón funcional *pgl* puede estar presente de forma natural cuando dicho hospedador procariota es *Campylobacter* spp., preferentemente *C. jejuni*. Sin embargo, como se ha demostrado antes en la técnica y se ha mencionado anteriormente, el operón *pgl* puede transferirse a las células y permanecer funcional en dicho nuevo entorno celular.

La expresión "operón *pgl* funcional procedente de *Campylobacter* spp., preferentemente de *C. jejuni*" se entiende que se refiere a la agrupación de ácidos nucleicos que codifican la oligosacaril transferasa funcional (OTasa) de *Campylobacter* spp., preferentemente de *C. jejuni*, y una o más glicosil transferasas más específicas, capaces de ensamblar un oligosacárido sobre un vehículo lipídico, y en la que dicho oligosacárido puede transferirse desde el vehículo lipídico a la proteína diana que tiene una o más secuencia o secuencias de aminoácidos optimizadas: D/E - X N - Z - S/T, mediante la OTasa. Debe entenderse que la expresión "operón *pgl* funcional de *Campylobacter* spp., preferentemente de *C. jejuni*" en el contexto de esta invención no se refiere necesariamente a un operón como una unidad transcripcional singular. La expresión meramente requiere la presencia de los componentes funcionales para la N-glicosilación de la proteína recombinante en una célula hospedadora. Estos componentes pueden transcribirse como uno o varios ARNm distintos y pueden estar regulados juntos o por separado. Por ejemplo, la expresión también incluye componentes funcionales situados en el ADN genómico y plásmido o plásmidos en una célula hospedadora. Para el propósito de la eficiencia, se prefiere que todos los componentes del operón *pgl* funcional estén regulados y se expresen simultáneamente.

Es importante darse cuenta que solo la oligosacaril transferasa funcional (OTasa) debe proceder de *Campylobacter* spp., preferentemente de *C. jejuni*, y que la una o varias glicosiltransferasas específicas capaces de ensamblar un oligosacárido sobre un vehículo lipídico pueden proceder de la célula hospedadora o pueden introducirse de forma recombinante en dicha célula hospedadora, siendo la única limitación funcional que el oligosacárido ensamblado por dicha glicosiltransferasas pueda transferirse desde el vehículo lipídico a la proteína diana que tiene una o más secuencias de consenso optimizadas por la OTasa. Por lo tanto, la selección de la célula hospedadora que comprende glicosiltransferasas específicas naturales y/o glicosiltransferasas específicas incapacitantes naturales en dicho hospedador, así como la introducción de glicosiltransferasas específicas heterólogas, permitirá que los expertos en la materia varíen los N-glicanos unidos al sitio de consenso de N-glicosilación optimizado en las proteínas de la presente invención.

Como resultado de lo anterior, la presente invención proporciona el diseño individual de patrones de N-glicanos sobre las proteínas de la presente invención. Por tanto, las proteínas pueden individualizarse por su patrón de N-glicano para satisfacer las necesidades biológicas, farmacéuticas y de purificación.

En una realización preferida, las proteínas de la presente invención pueden comprender una pero también más de una, preferentemente al menos dos, preferentemente al menos 3, más preferentemente al menos 5 de dichas secuencias de aminoácidos N-glicosiladas optimizadas.

La presencia de una o más secuencia o secuencias de aminoácidos N-glicosiladas optimizadas en las proteínas de la presente invención puede ser una ventaja para aumentar su antigenicidad, aumentar su estabilidad, afectar a su actividad biológica, prolongar su vida media biológica y/o simplificar su purificación.

La secuencia de consenso optimizada puede incluir cualquier aminoácido excepto prolina en la posición o posiciones X y Z. La expresión "cualquier aminoácido" se entiende que incluye aminoácidos naturales comunes y raros, así como derivados sintéticos y análogos de aminoácidos que seguirán permitiendo que la secuencia de consenso optimizada se N-glicosile con la OTasa. Los aminoácidos de origen natural, comunes y raros son los preferidos para X y Z. X y Z pueden ser iguales o diferentes.

Nótese que X y Z pueden diferir en una proteína para cada secuencia de consenso optimizada de acuerdo con la presente invención.

El N-glicano unido a la secuencia de consenso optimizada se determinará por las glicosiltransferasas específicas y su interacción cuando se ensambla el oligosacárido sobre un vehículo lipídico para la transferencia mediante la OTasa. Los expertos en la materia pueden diseñar el N-glicano variando el tipo o tipos y la cantidad de glicosiltransferasas específicas presentes en la célula hospedadora deseada.

Los N-glicanos se definen en el presente documento como mono, oligo o polisacáridos de composiciones variables que están ligados a un nitrógeno ϵ -amídico de un residuo de asparagina en una proteína, a través de un enlace N-glicosídico. Preferentemente, los N-glicanos transferidos por la OTasa están ensamblados sobre un anclaje lipídico de undecaprenol-pirofosfato que está presente en la membrana citoplásmica de las bacterias Gram negativas o positivas. Están implicados en la síntesis del antígeno O, el polisacárido O y el peptidoglicano (Bugg, T. D. y Brandish, P. E. (1994). From peptidoglycan to glycoproteins: common features of lipid-linked oligosaccharide biosynthesis. FEMS Microbiol Lett 119, 255-262; Valvano, M. A. (2003). Export of O-specific lipopolysaccharide. Front Biosci 8, s452-471).

En una realización preferida, la proteína recombinante de la presente invención comprende uno o varios N-glicanos seleccionados del grupo de N-glicanos procedentes de *Campylobacter* spp., preferentemente de *C. jejuni*, los N-glicanos obtenidos a partir de oligosacáridos y polisacáridos transferidos al polisacárido O que forma el antígeno O en bacterias Gram negativas o polisacáridos capsulares de bacterias Gram positivas, preferentemente: *P. aeruginosa* O9, O11; *E. coli* 07, 09, 016, 0157 y *Shigella dysenteriae* O1 y variantes modificadas genéticamente de los mismos, obtenidas a través de la inserción o delección de glicosiltransferasas y epimerasas que afectan a la estructura del polisacárido.

En una realización preferida adicional la proteína recombinante de la presente invención comprende dos o más N-glicanos distintos.

Por ejemplo, pueden prepararse N-glicanos diferentes sobre la misma proteína mediante el control de la regulación temporal de la expresión de glicosiltransferasas específicas, usando promotores tempranos o tardíos, o la introducción de factores para iniciar, silenciar, potenciar y/o reducir la actividad promotora de glicosiltransferasas específicas individuales. Los promotores y factores adecuados que regulan su actividad están a disposición de los expertos en la materia rutinaria y no se explicarán adicionalmente.

En una realización preferida adicional la presente invención proporciona proteínas recombinantes en las que bien la proteína modificada y/o el N-glicano o N-glicanos son terapéutica y/o profilácticamente activos. La introducción de al menos una secuencia de consenso optimizada y N-glicosilada puede modificar o incluso introducir una actividad terapéutica y/o profiláctica en una proteína. En una realización más preferida, es la proteína y/o el N-glicano o N-

glicanos los que son inmunogénicamente activos. En este caso, la N-glicosilación o N-glicosilaciones introducidas pueden tener un efecto modificador sobre la actividad biológica de las proteínas y/o introducir nuevos sitios antigénicos y/o pueden enmascarar la proteína para evitar etapas de degradación y/o aumentar la vida media.

Las proteínas recombinantes de la presente invención pueden dirigirse de manera eficiente a la membrana externa y/o a la superficie de las células hospedadoras, preferentemente bacterias, más preferentemente bacterias Gram negativas. Para facilitar la presentación en superficie y/o la localización en la membrana externa, se prefiere que la proteína recombinante de la invención comprenda además al menos una secuencia polipeptídica capaz de dirigir dicha proteína recombinante a la membrana externa y/o a la superficie celular de una bacteria, preferentemente una bacteria Gram negativa.

En una realización preferida, la proteína recombinante de la invención es una en la que dicha secuencia polipeptídica dirigida se selecciona del grupo que consiste en péptidos señal de tipo II (Paetzel, M., Karla, A., Strynadka, N.C. y Dalbey, R.E. 2002. Signal peptidases. Chem Rev 102: 4549-4580) o proteínas de la membrana externa (revisado en Wernerus, H. y Stahl, S. 2004. Biotechnological applications for surface-engineered bacteria. Biotechnol Appl Biochem 40: 209-228.^[mk2]), seleccionadas preferentemente del grupo que consiste en la proteína de longitud completa o los péptidos señal OmpH1 de *C. jejuni*, JlpA de *C. jejuni*, proteínas de la membrana externa de *E. coli*, preferentemente OmpS, OmpC, OmpA, OprF, PhoE, LamB, Lpp'OmpA (una proteína de fusión para tecnología de presentación en superficie; véase Francisco, J.A., Earhart, C.F. y Georgiou, G. 1992. Transport and anchoring of beta-lactamase to the external surface of Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 2713-2717) y la proteína Inp de *Pseudomonas aeruginosa*.

En un aspecto diferente, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante de acuerdo con la invención. Preferentemente, dicho ácido nucleico es ARNm, ADN o APN, más preferentemente un ARNm o un ADN, lo más preferentemente un ADN. El ácido nucleico puede comprender la secuencia que codifica dicha proteína y, además, otras secuencias, tales como secuencias reguladoras, por ejemplo, promotores, potenciadores, codones de parada, codones de inicio y genes necesarios para regular la expresión de la proteína recombinante a través de las secuencias reguladoras mencionadas, etc. La expresión "ácido nucleico que codifica una proteína recombinante de acuerdo con la invención" se refiere a un ácido nucleico que comprende dicha secuencia codificadora y opcionalmente cualquier secuencia de ácido nucleico adicional, independientemente de la información de la secuencia, siempre y cuando el ácido nucleico sea capaz de producir la proteína recombinante de la invención en una célula hospedadora que contiene un operón *pgl* funcional de *Campylobacter* spp., preferentemente de *C. jejuni*. Más preferentemente, la presente invención proporciona ácidos nucleicos aislados y purificados ligados funcionalmente a un promotor, preferentemente ligados a un promotor seleccionado del grupo que consiste en promotores procariotas inducibles y constitutivos conocidos, más preferentemente el promotor de tetraciclina, el promotor de arabinosa, el promotor de salicilato, los promotores *lac*-, *trc*- y *tac* (Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in Escherichia coli. Curr Opin Biotechnol 10, 411-421; Billman-Jacobe, H. (1996). Expression in bacteria other than Escherichia coli. Curr Opin Biotechnol 7, 500-504). Dichos ácidos nucleicos ligados funcionalmente se pueden usar, por ejemplo, para la vacunación. La invención también proporciona un vector que comprende un ácido nucleico de la invención.

Adicionalmente, otro aspecto de la presente invención se refiere a una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico y/o un vector de acuerdo con la presente invención. El tipo de célula hospedadora no es limitante, siempre que se adapte a un operón *pgl* funcional procedente de *C. jejuni* y a uno o varios ácidos nucleicos que codifican la proteína o proteínas diana recombinantes de la presente invención. Las células hospedadoras preferidas son células hospedadoras procariotas, más preferentemente bacterias, lo más preferentemente aquellas seleccionadas del grupo que consiste en *Escherichia coli* ssp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* ssp., *Shigella* spp., *Helicobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., preferentemente *Escherichia coli*, más preferentemente las cepas de *E. coli* Top10, W3110, CLM24, BL21, SCM6 y SCM7 (Feldman et al., (2005). Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 102, 3016-3021; Alaimo, C., Catrein, I., Morf, L., Marolda, C. L., Callewaert, N., Valvano, M. A., Feldman, M. F., Aebi, M. (2006). Two distinct but interchangeable mechanisms for flipping of lipid-linked oligosaccharides. EMBO Journal 25, 967-976) y las cepas de *S. enterica* SL3261 (*Salmonella enterica* sv. Typhimurium LT2 (delta) *aroA*, véase Hoiseth, S.K. y Stocker, B.A. 1981, Aromatic-dependent Salmonella typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines. Nature 291:238-239), SL3749 (*Salmonella enterica* sv. Typhimurium LT2 *waaL*, véase Kaniuk et al., J. Biol. Chem. 279: 36470-36480) y SL3261Δ*waaL*.

En una realización más preferida, la célula hospedadora de acuerdo con la presente invención es una que es útil para dirigir a la membrana externa y/o para la presentación en la superficie de proteínas recombinantes de acuerdo con la invención, preferentemente una, en la que dicha célula hospedadora es una bacteria Gram negativa recombinante que tiene:

i) un genotipo que comprende secuencias de nucleótidos que codifican

a) al menos una glicosiltransferasa específica natural o recombinante para el acoplamiento de un oligosacárido sobre un vehículo lipídico,

- b) al menos una oligosacaril transferasa procariota natural o recombinante (OTasa) procedente de *Campylobacter* spp., preferentemente de *C. jejuni*,
- c) al menos una proteína recombinante de acuerdo con la invención, preferentemente una proteína que comprende adicionalmente un polipéptido dirigido, y

ii) un fenotipo que comprende una proteína N-glicosilada recombinante de acuerdo con la invención que se encuentra en y/o sobre la membrana externa de la bacteria Gram negativa.

La célula hospedadora para la realización anterior se selecciona preferentemente del grupo que consiste en *Escherichia* ssp., *Campylobacter* spp., *Shigella* spp., *Helicobacter* ssp. y *Pseudomonas* spp., *Salmonella*, ssp., preferentemente *E. coli*, más preferentemente las cepas de *E. coli* Top10, W3110, CLM24, BL21, SCM6 y SCM7 y las cepas de *S. enterica* SL3261, SL3749 y SL3261ΔwaaL. (Véase Hoiseth, S.K. y Stocker, B.A. 1981. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291: 238-239), SL3749 (Kaniuk, N.A., Vinogradov, E. y Whitfield, C. 2004. Investigation of the structural requirements in the lipopolysaccharide core acceptor for ligation of O antigens in the genus *Salmonella*: WaaL "ligase" is not the sole determinant of acceptor specificity. *J Biol Chem* 279: 36470-36480).^[mk4]

Debido a que las proteínas preferidas de la presente invención pueden tener una actividad terapéutica o profiláctica por sí mismas y/o debido a los sitios de N-glicosilación introducidos, pueden utilizarse para la preparación de un medicamento. La exoproteína de *P. aeruginosa* en la que se ha introducido la secuencia de consenso N-glicosilada optimizada es útil para la preparación de un medicamento (Wyszynska, A., Raczko, A., Lis, M. y Jagusztyn-Krynicka, E. K. (2004). Oral immunization of chickens with avirulent *Salmonella* vaccine strain carrying *C. jejuni* 72Dz/92 cjaA gene elicits specific humoral immune response associated with protection against challenge with wild-type *Campylobacter*. *Vaccine* 22, 1379-1389).

Además, los ácidos nucleicos y/o los vectores de acuerdo con la invención también son útiles para la preparación de un medicamento, preferentemente para su uso en terapia génica.

Por otra parte, una célula hospedadora de acuerdo con la invención, preferentemente una que tiene un fenotipo que comprende una proteína recombinante N-glicosilada de la invención que está ubicada en la membrana externa y/o sobre la membrana externa de una bacteria, preferentemente una bacteria Gram negativa, más preferentemente una de las bacterias Gram negativas mencionadas anteriormente, es particularmente útil para la preparación de un medicamento.

Más preferentemente, una proteína de la invención se utiliza para la preparación de un medicamento para la vacunación terapéutica y/o profiláctica de un sujeto en necesidad del mismo.

En una realización más preferida la presente invención se refiere al uso de un ácido nucleico y/o un vector descrito de acuerdo con la invención en la preparación de un medicamento para la vacunación terapéutica y/o profiláctica de un sujeto en necesidad del mismo, preferentemente mediante terapia génica.

Las células hospedadoras de la invención que presentan dichas proteínas recombinantes N-glicosiladas son particularmente útiles para la preparación de vacunas, porque las proteínas N-glicosiladas presentadas están profusamente presentes en la superficie de la célula hospedadora y son muy accesibles para las células inmunes, en particular, sus N-glicanos hidrófilos, y porque las células hospedadoras tienen el efecto añadido de un adyuvante que, si están vivas, incluso se pueden replicar en cierta medida y amplificar sus efectos de vacunación.

Preferentemente, la célula hospedadora para la puesta en práctica de los aspectos médicos de esta invención es una célula hospedadora atenuada o muerta.

Otra ventaja de la utilización de las células hospedadoras de la invención para la preparación de medicamentos, preferentemente vacunas, es que inducen anticuerpos IgA debido al componente celular.

Preferentemente, dichas células hospedadoras se utilizan de acuerdo con la invención para la inducción de anticuerpos IgA en un animal, preferentemente un mamífero, roedor, ovino, equino, canino, bovino o humano.

Se prefiere que dicho sujeto que requiere la vacunación sea un ave, un mamífero o un pez, preferentemente un mamífero, más preferentemente un mamífero seleccionado entre el grupo que consiste en ganado bovino, ovino, equino, perros, gatos y seres humanos, lo más preferentemente seres humanos. También se prefieren las aves.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica, que comprende al menos una proteína de acuerdo con la invención, y opcionalmente al menos un ácido nucleico, al menos un vector y/o al menos una célula hospedadora de acuerdo con la invención y un excipiente, diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. La preparación de medicamentos que comprenden proteínas o células hospedadoras, preferentemente células hospedadoras atenuadas o muertas, y la preparación de medicamentos que comprenden ácidos nucleicos y/o vectores para la terapia génica, son bien conocidas en la técnica. El esquema de preparación de

la composición farmacéutica final y el modo y los detalles de su administración, dependerán de la proteína, la célula hospedadora, el ácido nucleico y/o el vector utilizado.

Los excipientes, diluyentes y/o adyuvantes adecuados son bien conocidos en la técnica. Un excipiente o un diluyente puede ser un material sólido, semisólido o líquido que puede servir como vehículo o medio para el ingrediente activo. Un experto ordinario en la materia de preparación de composiciones puede seleccionar fácilmente la forma y el modo de administración adecuados, dependiendo de las características particulares del producto seleccionado, la enfermedad o la afección a tratar, el estadio de la enfermedad o la afección y otras circunstancias relevantes (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. 1990)). La proporción y la naturaleza del diluyente o del excipiente farmacéuticamente aceptable vienen determinadas por la solubilidad y las propiedades químicas del compuesto farmacéuticamente activo seleccionado, la ruta de administración elegida y la práctica farmacéutica convencional. La preparación farmacéutica se puede adaptar para uso oral, parenteral o tópico y se puede administrar al paciente en forma de comprimidos, cápsulas, supositorios, solución, suspensiones o similares. Los compuestos farmacéuticamente activos de la presente invención, aunque son eficaces por sí mismos, se pueden formular y administrar en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, tales como sales de adición de ácidos o sales de adición de bases, para fines de estabilidad, conveniencia de cristalización, aumento de la solubilidad y similares.

Se desvela en el presente documento un método para producir proteínas glicosiladas ligadas a N, que comprende las etapas de:

a) proporcionar un organismo recombinante, preferentemente un organismo procariota que comprende ácidos nucleicos que codifican

i) un operón *pgl* funcional procedente de *Campylobacter* spp., preferentemente de *C. jejuni*, y

ii) al menos una proteína diana recombinante que comprende una o más de las siguientes secuencia o secuencias de consenso de aminoácidos N-glicosilados optimizados:

D/E - X - N - Z - S/T,

en la que X y Z pueden ser cualquier aminoácido natural ácido excepto Pro, y en la que se introduce al menos una de dichas secuencia o secuencias de consenso de aminoácidos N-glicosilados optimizados, y

b) cultivar el organismo recombinante en una forma adecuada para la producción y la N-glicosilación de la proteína o proteínas diana.

Preferentemente, la proteína diana es una de las proteínas recombinantes descritas anteriormente de acuerdo con la invención.

En un método preferido, el operón *pgl* funcional procedente de *Campylobacter* spp., preferentemente de *C. jejuni*, comprende ácidos nucleicos que codifican

i) OTasa recombinante procedente de *Campylobacter* spp., preferentemente de *C. jejuni*, y

ii) glicosiltransferasas específicas recombinantes y/o naturales procedentes de *Campylobacter* spp., preferentemente de *C. jejuni*, y/o

iii) glicosiltransferasas específicas recombinantes y/o naturales procedentes de especies distintas de *Campylobacter* spp.,

para el acoplamiento de un oligosacárido sobre un vehículo lipídico para ser transferido a la proteína diana a través de la OTasa.

Por otra parte, se desvela en el presente documento un método para preparar una célula hospedadora de acuerdo con la invención que comprende las etapas de:

i) proporcionar una bacteria Gram negativa,

ii) introducir en dicha bacteria al menos una secuencia nucleotídica que codifica

a) al menos una glicosiltransferasa específica recombinante para el acoplamiento de un oligosacárido sobre un vehículo lipídico, y/o

b) al menos una oligosacaril transferasa (OTasa) recombinante procedente de *Campylobacter* spp., preferentemente de *C. jejuni*, y/o

c) al menos una proteína recombinante de acuerdo con la invención que comprende una o varias de las siguientes secuencia o secuencias de consenso de aminoácidos N-glicosilados optimizados:

D/E - X - N - Z - S/T,

en la que X y Z pueden ser cualquier aminoácido natural excepto Pro, y en la que se introduce al menos una de dichas secuencia o secuencias de consenso de aminoácidos N-glicosilados optimizados, y
 iii) cultivar dicha bacteria hasta que al menos una proteína N-glicosilada recombinante codificada por la secuencia de nucleótidos de c) se encuentre en la membrana externa y/o sobre la membrana externa de la bacteria Gram negativa.

Para la práctica de los métodos anteriores, el organismo procariota recombinante o la célula hospedadora se selecciona preferentemente del grupo de bacterias que consisten en *Escherichia* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Helicobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., preferentemente *Escherichia coli*, preferentemente las cepas de *E. coli* Top10, W3110, CLM24, BL21, SCM6 y SCM7 y las cepas de *S. enterica* SL3261, SL3749 y SL3261Δ*waaL*.

Otro método preferido para producir, aislar y/o purificar una proteína recombinante de acuerdo con la invención comprende las etapas de:

- a) cultivar una célula hospedadora como se define anteriormente,
- b) eliminar la membrana externa de dicha bacteria Gram negativa recombinante y
- c) recuperar dicha proteína recombinante.

Los métodos ejemplares para la retirada de la membrana externa de una célula, preferentemente una célula procariota, más preferentemente una célula bacteriana Gram negativa, son métodos de tratamiento enzimático adecuados, solubilización con detergente y choque osmótico y método de prensa francesa.

Se desvela en el presente documento un método, en el que se seleccionan glicotransferasas específicas recombinantes o naturales procedentes de especies distintas de *Campylobacter* spp., preferentemente de *C. jejuni*, del grupo de glicotransferasas y epimerasas procedentes de bacterias, arqueas y/o eucariotas que pueden expresarse funcionalmente en dicha célula hospedadora.

Figuras

La Figura 1 ilustra la N-glicosilación de proteínas Lip obtenidas a partir de las estructuras artificiales A a C (véase el ejemplo 1). Células de *E. coli* Top 10 que son portadoras de un operón *pgl* funcional procedente de *C. jejuni* (Wacker et al., 2002, *supra*) y un plásmido que codifica las estructuras artificiales A (carril 2), B (carril 1) y C (carril 3) o un mutante de la estructura artificial C con la mutación D121A (carril 4). Las proteínas se expresaron y se purificaron a partir de extractos periplásmicos. Se muestra el SDS-PAGE y la tinción con azul brillante de Coomassie de las fracciones proteicas purificadas.

La Figura 2 muestra el análisis de la N-glicosilación de las proteínas diferentes en las que se analizó la N-glicosilación específica de secuencia mediante el operón *pgl* de *C. jejuni* (Wacker et al., 2002, *supra*) en células CLM24 (Feldman et al., (2005). Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 102, 3016-3021) o células Top10 (carriles 1-6 del panel E) o células SCM7 (Alaimo, C., Catrein, I., Morf, L., Marolda, C. L., Callewaert, N., Valvano, M. A., Feldman, M. F., Aebi, M. (2006)). Two distinct but interchangeable mechanisms for flipping of lipid-linked oligosaccharides, EMBO Journal 25, 967-976) (carriles 7, 8 del panel E) que expresan dichas proteínas a partir de un plásmido. Se muestran extractos periplásmicos separados por SDS-PAGE que se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se visualizaron con antisueros específicos. En los paneles A-D, los paneles superiores muestran inmunotransferencias investigadas con antisuero anti AcrA (Wacker et al 2002, *supra*; Nita-Lazar, M., Wacker, M., Schegg, B., Amber, S. y Aebi, M. (2005) The N-X-S/T consensus sequence is required but not sufficient for bacterial N-linked protein glycosylation. Glycobiology 15, 361-367), mientras que los paneles inferiores muestran inmunotransferencias investigadas con antisuero R12 (Wacker et al., 2002, *supra*). + y - indican la presencia del operón *pgl* funcional o mutante en las células. El panel A contiene muestras de AcrA de tipo silvestre soluble con la secuencia señal pelB y el marcador hexa His (carriles 1, 2), AcrA-N273Q (carriles 3, 4) y AcrA-D121A (carril 5). Panel B: AcrA (carriles 1, 2), AcrA-T145D (carril 3), AcrA-N123Q-N273Q-T145D (carriles 4, 5). Panel C: AcrA-F115D-T145D (carriles 1, 2), AcrA-N123Q-N273Q-N272D (carriles 3, 4). Panel D: AcrA-N273Q (carriles 1, 2), ACRA-N273Q-F122P (carriles 3, 4). Panel E: CtxB (carriles 1, 2), CtxB-W88D (carriles 3, 4), CtxB-Q56/DSNIT (carriles 5, 6) y CtxB-W88D- Q56/DSNIT.

La Figura 3 muestra la modificación genética de sitios múltiples de glicosilación en OmpH1. La cepa Δ*waaL* de SCM6 se cotransformó con el plásmido pACYC*pgl* (que codificaba el locus *pgl* completo) y plásmidos que expresaban OmpH1 de tipo silvestre (carril 1), OmpH1^{N139S}-myc (carril 2), OmpH1^{KGN} → NIT, HFGDD → DSNIT-myc (carril 3), OmpH1^{RGD} → NIT, HFGDD-DSNIT-myc (carril 4), OmpH1^{KGN} → NIT, RGD → NIT-myc (carril 5), OmpH1^{KGN} → NIT, RGD → NIT, HFGDD → DSNIT-myc (carril 6) o OmpH1^{RGD} → NIT, V83T-myc (carril 7). Las células se cultivaron en condiciones aerobias, inducidas con arabinosa al 0,5 % durante 3 horas antes del análisis. Los lisados de células completas se precipitaron con TCA después de igualar la densidad óptica de los cultivos, tal y como se describe en la sección de materiales y métodos. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE al 15 % y se transfirieron a una membrana de PVDF. *Primer panel*, inmunotransferencia de lisados de células completas examinadas con

anticuerpos anti-marcador myc. *Panel inferior*, inmunotransferencia de lisados de células completas examinadas con antisuero específico de glicano. Las posiciones de OmpH1 sin glicosilar y glicosilada se indican a la derecha.

La Figura 4. Microscopía de fluorescencia de células que expresaban diversas variantes de OmpH1. Los cultivos de cepas de *E. coli* CLM24 o SCM6 que contenían el plásmido de expresión para OmpH1 de tipo silvestre y sus variantes, se igualaron a una DO₆₀₀ de 0,25/ml. Las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4 y 100 µl de las suspensiones celulares se pipetearon sobre portaobjetos de vidrio gelatinizados y se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 30 min dentro de una cámara humidificada. Todas las etapas posteriores de la marcación con inmunofluorescencia de células completas se realizaron a temperatura ambiente dentro de una cámara humidificada. Las células no unidas se retiraron y el resto se fijó con paraformaldehído al 4 % que contenía PBS, durante 30 min a TA. Es importante destacar que el paraformaldehído no se considera que permeabilice las células, sino que conserva intacta la compartimentación mediante membranas. Las células fijadas se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en tampón de bloqueo que contenía 5 % de BSA en PBS. Después del bloqueo, las células se incubaron con IgG monoclonal de ratón anti-myc (1:50, Calbiochem) y/o antisuero anti-glicano (1:4000) durante 1 h en 100 µl de PBS que contenía 5 % de BSA. Las células se lavaron tres veces con 100 µl de PBS durante 5 min cada vez y se incubaron con anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con FITC (1:250, Jackson ImmunoResearch Laboratories) y/o anticuerpo anti-ratón conjugado con Cy3 (1:250, Jackson ImmunoResearch Laboratories) durante 1 h en 100 µl de PBS que contenía 5 % de BSA. Si era necesario, se añadió 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma) (0,5 µg/ml) en el momento de la incubación con el anticuerpo secundario para teñir el ADN bacteriano. El anticuerpo secundario se eliminó de las células por lavado con PBS, y se montaron cubreobjetos sobre los portaobjetos usando medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories) y se sellaron con esmalte de uñas. La microscopía de fluorescencia se realizó empleando un microscopio Axioplan2 (Carl Zeiss). Las imágenes se combinaron utilizando Adobe Photoshop, versión CS2. Las células SCM6 expresaban OmpH1 (panel A), OmpH1^{N139S} (panel B). OmpH1^{C20S} (panel C), OmpH1^{KGN} → NIT, HFGDD → DSNIT (panel D), OmpH1^{RGD} → NIT, HFGDD-DSNIT (panel E), OmpH1^{KGN} → NIT, RGD → NIT (panel F), OmpH1^{V83T}, KGN → NIT (panel G) y OmpH1^{KGN} → NIT, RGD → NIT, HFGDD → DSNIT (panel H). La primera columna es una fusión de las imágenes en las columnas 2, 3 y 4 representadas en tonos grises sobre fondo negro. Columna 2: fluorescencia azul en tonos grises de la tinción DAPI, columna 3: fluorescencia verde procedente de la fluorescencia específica de glicanos, columna 4: fluorescencia roja procedente de la tinción anti-myc.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar adicionalmente la presente invención y no se pretende de ningún modo que limiten su alcance.

Ejemplos

Selección de AcrA como proteína modelo para optimizar la N-glicosilación

Para optimizar los requisitos de la proteína aceptora para la N-glicosilación, se realizaron estudios detallados sobre la glicoproteína AcrA de *C. jejuni* (Cj0367c). AcrA es una lipoproteína periplásmica de 350 restos de aminoácidos. Se ha mostrado que la secreción en el periplasma, pero no el anclaje lipídico, es un requisito previo para la glicosilación (Nita-Lazar et al., 2005, *supra*). La señal para la exportación puede ser la secuencia señal natural de AcrA o la señal PelB heteróloga cuando se expresa en *E. coli*. De los cinco secuencias potenciales para la glicosilación ligada a N (N117, N123, N147, N273, N274) se utilizan dos iguales en *C. jejuni* y *E. coli* (N123 y N273 (Nita-Lazar et al., 2005, *supra*)). AcrA fue elegida como modelo, ya que es la única N-glicoproteína periplásmica de *C. jejuni* para la que está disponible una información estructural detallada. Recientemente, se ha publicado la estructura cristalina de un homólogo de AcrA, la proteína MexA procedente de la bacteria Gram negativa *P. aeruginosa* (Higgins et al., (2004). Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 101, 9994-9999). Ambas proteínas son miembros de las proteínas denominadas bomba de flujo de salida periplásmico (PEP, (Johnson, J. M. y Church, G. M. (1999) Alignment and structure prediction of divergent protein families: periplasmic and outer membrane proteins of bacterial efflux pumps. J. Mol. Biol. 287, 695-715)). La molécula alargada contiene tres subdominios dispuestos linealmente: una α-hélice, un bucle enrollado de forma antiparalela que se mantiene unido a la base por un dominio de lipoilo, que va seguido de un dominio en barril β de seis cadenas. Los restos 23-28 en el extremo N-terminal y los restos 95-101 en el extremo C-terminal no están estructurados en los cristales. Las secuencias proteicas de MexA y AcrA tienen una identidad del 29,3 % y son similares en un 50 %. Por lo tanto, las dos proteínas probablemente presentan un plegamiento global similar.

Ejemplo 1 Deducción de la secuencia peptídica primaria que desencadena la glicosilación

Se sabe que los dominios de lipoilo similares a los de MexA de *P. aeruginosa* y en consecuencia también en AcrA de *C. jejuni*, forman una proteína compacta que se puede expresar individualmente en *E. coli* (revisado por Berg, A. y de Kok, A. (1997). 2-Oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes. The central role of the lipoyl domain. Biol. Chem, 378, 617-634). Para determinar qué secuencia peptídica aceptora era necesaria para la N-glicosilación por la maquinaria de *pgl* en *E. coli*, se tomó el dominio lipídico de AcrA. Se usó como un andamio molecular para transportar péptidos de diferentes longitudes al periplasma y presentarlos *in vivo* a la maquinaria de *pgl*.

Por lo tanto, se construyó un plásmido que codificaba el dominio lipídico (Lip) y se fusionó N-terminalmente con la secuencia señal de OmpA (Choi J. H. y Lee S. Y. (2004), *Secretory and extracellular production of recombinant proteins using Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64, 625-635) y C-terminalmente con un marcador hexa His. Se llevó a cabo la clonación para poner la expresión génica bajo el control del promotor de arabinosa. Para los límites del dominio Lip, se escogieron posiciones de aminoácidos que aparecían en las mismas posiciones que las de los límites de dominio de la parte del dominio lipídico en MexA. Para examinar diferentes péptidos en cuanto a su capacidad para aceptar un N-glicano, se insertaron tramos de la secuencia entre las dos partes de tipo cabeza de martillo del dominio Lip. Los tramos consistían en secuencias que comprendían el sitio de N-glicosilación N123 de AcrA de *C. jejuni*. Los marcos de lectura abierta resultantes consistían en las secuencias que codificaban la secuencia señal de OmpA, la parte N-terminal de tipo cabeza de martillo de AcrA (D60-D95 (la numeración de los aminoácidos se refiere a la numeración de la secuencia del polipéptido AcrA maduro)), los diferentes tramos que contenían el sitio de glicosilación N123 natural de AcrA (véase más adelante), la parte C-terminal de tipo cabeza de martillo de AcrA-Lip (L167-D210) y el marcador C-terminal his.

La construcción de los plásmidos se llevó a cabo mediante técnicas convencionales de biología molecular. Se insertaron tres tramos que contenían el sitio de glicosilación N123 natural de AcrA de diferentes longitudes, entre las dos mitades de Lip para dar lugar a tres ORF diferentes:

La construcción A contiene A118-S130 que da como resultado una secuencia proteica de:

MKKTAAIAVALAGFATVAQADVIIKPQVSGVIVNKLFKAGDKVKKGQTLFIIEQDQASKDF
NRSKALFSQLDHTTEIKAPFDGTIGDALVNIGDYVSASTTELVRVTNLNPIYADGSHHHHH
H (secuencia 1).

La construcción B contiene F122-E138 que da como resultado una secuencia proteica de:

MKKTAAIAVALAGFATVAQADVIIKPQVSGVIVNKLFKAGDKVKKGQTLFIIEQDQFNRSK
ALFSQSASISQKELDHTTEIKAPFDGTIGDALVNIGDYVSASTTELVRVTNLNPIYADGSHHH
HHH (secuencia 2).

La construcción C contiene D121-A127 que da como resultado una secuencia proteica de:

MKKTAAIAVALAGFATVAQADVIIKPQVSGVIVNKLFKAGDKVKKGQTLFIIEQDQDFNR
SKALDHTTEIKAPFDGTIGDALVNIGDYVSASTTELVRVTNLNPIYADGSHHHHHH
(secuencia 3).

Los tramos subrayados de la secuencia indican el péptido señal de OmpA, se introdujeron restos subrayados individualmente por razones de clonación o para hacer que la proteína fuera resistente a la degradación. Letra negrita: sitio de glicosilación que corresponde a N123 de AcrA. Letra cursiva: marcador hexa-His. Los genes correspondientes se expresaron bajo el control del promotor de arabinosa en la cadena principal del plásmido pEC415 (Schulz, H., Hennecke, H. y Thony-Meyer, L. (1998). *Prototype of a heme chaperone essential for cytochrome c maturation*. Science 281, 1197-1200).

Para comprobar cuál de los tres tramos desencadenaba la glicosilación de las proteínas Lip, se llevaron a cabo experimentos de expresión proteica. Se cultivaron células Top10 de *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.) que eran portadoras de pACYCpgl o pACYCpglmut (Wacker et al., 2002, supra) y un plásmido que codificaba las estructuras artificiales A, B o C, en medio LB que contenía ampicilina y cloranfenicol, a 37 °C, hasta una DO de 0,5. Para la inducción, se añadió una dilución en volumen 1/1000 de una solución de arabinosa al 20 % (p/v) y las células se cultivaron durante otras 2 horas. Las células fueron recogidas a continuación por centrifugación, resuspendidas en Tris/HCl 20 mM, pH 8,5, sacarosa al 20 % (p/v), EDTA 1 mM, PMSF 1 mM y 1 g/l (p/v) de lisozima, y se incubaron a 4 °C durante 1 hora. Se obtuvieron extractos periplásmicos después de recoger los esferoblastos como sedimento de centrifugación y se diluyeron los extractos con una dilución en volumen 1/9 (v/v) de tampón A 10x (NaCl 3 M, Tris/HCl 0,5 M, pH 8,0 e imidazol 0,1 M), y se añadió MgSO₄ hasta 2,5 mM. Se llevó a cabo una purificación por afinidad hacia Ni en columnas de Ni-Sefarosa de Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Suecia) de 1 ml, en tampón A. Las proteínas se eluyeron en tampón A que contenía imidazol 0,25 M.

La Figura 1 muestra el gel SDS-PAGE teñido con azul brillante de Coomassie de las fracciones de elución de picos procedentes de los extractos periplásmicos purificados con Ni. El análisis de la expresión mostraba que la estructura artificial B producía una sola especie proteica destacada (Figura 1, carril 1). Tanto la construcción A como la C

conducían, además de a la proteína destacada, a una segunda banda proteica con menor movilidad electroforética (Figura 1, carriles 2 y 3). El que la especie proteica más pesada estuviera realmente glicosilada se demostró por MALDI-TOF/TOF (no se muestra). El único aminoácido que faltaba en la estructura artificial B pero que estaba presente en A y C era D121, el residuo de aspartato situado 2 posiciones N-terminalmente con respecto al N123 glicosilado. Esto demuestra que D121 desempeña un importante papel en la glicosilación a través de la OTasa. Para verificar que D121 es esencial para la glicosilación, fue mutado a alanina en la estructura artificial C. El análisis de la expresión dio como resultado una sola banda proteica (Figura 1, carril 4), lo que mostraba que D121 es importante para la glicosilación. Además, el hecho de que una proteína artificial de presentación peptídica pueda ser glicosilada muestra que un péptido corto del tipo D/E-X-N-Y-S/T contiene toda la información para que tenga lugar la N-glicosilación ejercida por *C. jejuni*.

Ejemplo 2 Verificación del Ejemplo 1: AcrA-D121A no está glicosilada en N123

Para confirmar los hallazgos de la metodología de presentación peptídica, se insertó una mutación de aspartato a alanina en la posición 121 (D121A; es decir, dos restos antes del N123 glicosilado) en la versión soluble de longitud completa de la proteína AcrA y se analizó si el sitio N123 aún se podía glicosilar en *E. coli*. Con objeto de someter esto a ensayo, se expresó esta AcrA-D121A y se analizó su estado de glicosilación. Para el análisis, se usó una AcrA modificada genéticamente. Difiera del gen original de *C. jejuni* en que contenía la secuencia señal PelB (Choi y Lee, 2004, *supra*) para la secreción al periplasma y un marcador C-terminal hexa His para la purificación. Se ha observado que esta variante de AcrA se secreta, es escindida por el péptido señal y se glicosila como la proteína natural anclada a lípido (Nita-Lazar et al., 2005, *supra*). A continuación, se muestra la secuencia proteica de la proteína AcrA soluble:

MKYLPTAAAGLLLLAAQPAMAMHMSKEEAPKIQMPPQPVTMTSAKSEDLPLSFTYPAK
LVSDYDVIIKPQVSGVIVNKLFKAGDKVKKGQTLFIEQDKFKASVDSAYGQALMAKATFE
NASKDFNRSKALFSKSAISQKEYDSSLATFNNSKASLASARAQLANARIDLDHTEIKAPF
DGTIGDALVNIGDYVSASTTELVRVTNLNPIYADFFISDTDKLNLVRNTQSGKWDLDSIHA
NLNLNGETVQGKLYFIDSVIDANSGTVKAKAVFDNNNSTLLPGAFATITSEGFIQKNGFK
VPQIGVKQDQNDVYVLLVKNGKVEKSSVHISYQNNEYAIIKGLQNGDKIILDNFKKIQVG
SEVKEIGAQLEHHHHHH (secuencia 4)

Los restos subrayados son el péptido señal PelB, los restos en letra cursiva el marcador hexa His y los restos en letra negrita los dos sitios de glicosilación naturales en N123 y N273. Se construyó un plásmido que contenía el ORF para la proteína anterior en el plásmido pEC415 (Schulz et al., 1998), para producir pAcrAper.

El ensayo del estado de la glicosilación de AcrA y sus mutantes (véase más adelante) fue como sigue: se indujo la expresión de AcrA con arabinosa al 0,02 % en células de *E. coli* CLM24 (Feldman et al., 2005, *supra*) en crecimiento exponencial que contenían el operón *pgl*, transportado por el plásmido en su forma activa o inactiva (pACYC*pgl* o pACYC*pglmut* (véase Wacker et al., 2002, *supra*)) y un plásmido que codificaba AcrA (pAcrAper). Después de cuatro horas de inducción, se prepararon extractos periplásmicos del modo descrito anteriormente y se analizaron mediante SDS-PAGE, electrotransferencia e inmunodetección con antisuero anti-AcrA o antisuero R12. El último es específico de proteínas que contienen N-glicano de *C. jejuni* (Wacker et al., 2002, *supra*).

Los dos primeros carriles de la Figura 2A muestran AcrA en ausencia y presencia de un operón *pgl* funcional. Solo aparece una banda en ausencia del operón *pgl* funcional pero tres en presencia del mismo (Figura 2A, panel superior). Éstas se corresponden a AcrA no glicosilada (carril 1) y a AcrA no glicosilada, monoglicosilada y diglicosilada (carril 2). El que las dos proteínas más pesadas del carril 2 estuvieran glicosiladas fue confirmado mediante transferencia Western con R12 (carril 2, panel inferior). Cuando se expresaba el mutante AcrA-N273Q del mismo modo, solo se detectaba AcrA monoglicosilada en presencia del operón *pgl* funcional para la glicosilación (carril 3). Se detectó AcrA no glicosilada en ausencia del locus *pgl* funcional (carril 4). El análisis del mutante AcrA-D121A solo produjo dos bandas, una de ellas glicosilada (carril 5) como se observó con AcrA-N273Q en el carril 3. Esto significa que D121 es esencial para una glicosilación eficaz en la posición 123-125.

Ejemplo 3 Introducción de sitios de glicosilación artificiales en AcrA

Para someter a ensayo si la introducción de un residuo de aspartato podía generar un sitio de glicosilación, se generaron mutantes de AcrA en los que el residuo en la posición -2 de los sitios de glicosilación no utilizados en las posiciones N117 y N147 de AcrA soluble, se había intercambiado por aspartato (F115D, T145D). Luego se examinó si los sitios de glicosilación modificados se podían glicosilar mediante un ensayo igual al descrito en el ejemplo 2. Ambas mutaciones se insertaron individualmente en la secuencia de tipo silvestre de la versión soluble de AcrA o en el mutante doble en el que se habían delecionado ambos sitios de glicosilación utilizados (N123Q y N273Q). Se

prepararon extractos periplásmicos de cultivos inducidos durante 4 horas, se separaron mediante SDS-PAGE y se analizaron por transferencia Western (Figura 2B). Como controles, se desarrollaron las muestras de AcrA glicosilada y no glicosilada de tipo silvestre en el mismo gel (carriles 1 y 2). La mutación T145D afectaba a la posición -2 del secunón de glicosilación N147-S149 no utilizado naturalmente. Después de la expresión de AcrA-T145D, la transferencia Western con antisuero anti-AcrA dio lugar a cuatro bandas, la mayor de ellas con menor movilidad electroforética que la proteína doblemente glicosilada en el carril 2 (carril 3 en la figura 2B). La transferencia con R12 confirmó que la cuarta banda era una AcrA triplemente glicosilada. A pesar de la baja intensidad con respecto al anti-AcrA, la banda más pesada proporcionó la señal más intensa con el antisuero R12 específico de la glicosilación. Cuando se expresaba el mismo mutante AcrA-T145D en ausencia de la secuencia de N-glicosilación natural (AcrA-N123Q-N273Q-T145D), solo se detectó AcrA monoglicosilada en presencia de un operón *pgl* funcional (Figura 2B, carril 4), que no aparecía en ausencia de un operón *pgl* funcional (carril 5). Esto demuestra que la banda más pesada en el carril 4 estaba glicosilada. De esta manera, se generó un sitio de glicosilación optimizado (DFNNS) introduciendo simplemente la mutación T145D.

Para confirmar adicionalmente que es posible introducir un sitio de glicosilación insertando un residuo de aspartato en la posición -2, se cambiaron los sitios N117-S119 y N274-T276 no usados naturalmente para optimizar la N-glicosilación. Con este fin, se generaron otros mutantes (Figura 2C). La expresión de AcrA-F115D-T145D en el sistema descrito anteriormente dio lugar a cinco especies proteínicas detectadas con el antisuero anti-AcrA (carril 2). Esto es indicativo de que tienen lugar cuatro glicosilaciones en la misma molécula de AcrA. Cuando se llevó a cabo la detección con el antisuero R12 específico de N-glicano de *C. jejuni*, se detectó una escalera de cinco bandas. La banda inferior apenas visible es AcrA no glicosilada porque también está presente en ausencia de glicosilación (carril 1); la superior da lugar a una señal intensa debida probablemente a los cinco determinantes antigénicos de una AcrA glicosilada con cuatro plegamientos. De este modo, los dos sitios introducidos (en N117 y N147) y los dos sitios usados naturalmente (N123 y N273) son utilizados y glicosilados por la maquinaria de *pgl*. La expresión de AcrA-N123Q-N273Q-N272D con y sin el operón *pgl* demostró que un tercer sitio de glicosilación introducido artificialmente, N274 (DNNST), también era reconocido por el operón *pgl* (Figura 2C; carriles 3 y 4).

Los experimentos anteriores confirman el hallazgo de que el sitio de N-glicosilación bacteriano reconocido por la OTasa de *C. jejuni* consiste parcialmente en el mismo sitio de consenso que el eucariótico (N - X - S/T, con X≠P) pero, además, se requiere un aspartato en la posición -2 para aumentar la eficacia. Además, demostraron que es posible glicosilar una proteína en un sitio deseado al introducir mediante recombinación una secuencia de consenso optimizada de este tipo.

Ejemplo 4 Verificación de la posición -1 en la secuencia de N-glicosilación optimizada

Se llevó a cabo un experimento adicional para analizar si la posición -1 del sitio de glicosilación bacteriano presenta las mismas restricciones que la posición +1 en eucariotas (Imperiali, B. y Shannon, K.L. (1991). Differences between Asn-Xaa-Thr-containing peptides: a comparison of solution conformation and substrate behaviour with oligosaccharyl-transferase. *Biochemistry* 30, 4374-4380; Rudd, P. M. y Dwek, R. A. (1997) Glycosylation: heterogeneity and the 3D structure of proteins, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 32, 1-100). Se cree que un residuo de prolina en +1 restringe el péptido de tal modo que se inhibe la glicosilación. Para analizar si también se podría observar un efecto similar en la posición -1, se introdujo un residuo de prolina en esa posición del primer sitio usado naturalmente en un mutante puntual que tenía inoperante el segundo sitio natural (AcrA-N273Q-F122P). La expresión control de AcrA-N273Q mostró una proteína monoglicosilada en presencia de un operón *pgl* funcional (Figura 2D; carriles 1 y 2). Sin embargo, AcrA-N273Q-F122P no estaba glicosilada (Figura 2D; carriles 3 y 4). Esto indica que la prolina inhibía la N-glicosilación bacteriana cuando constituye el residuo entre la asparagina y el residuo cargado negativamente de la posición -2.

Las alineaciones de secuencia de todos los sitios conocidos por estar glicosilados por la maquinaria de *pgl* de *C. jejuni* indican que todos ellos comprenden un D o E en la posición -2 (Nita-Lazar et al., 2005, *supra*; Wacker et al., 2002, *supra*; Young et al. (2002), Structure of the N-linked glycan present on multiple glycoproteins in the Gram-negative bacterium, *Campylobacter jejuni*, *J. Biol. Chem.* 277, 42530-42539). De este modo, se estableció que la secuencia de consenso de glicosilación para bacterias se puede optimizar a través de un aminoácido cargado negativamente en la posición -2, para dar lugar a D/E - X - N - Z - S/T, en donde X y Z ≠ P.

Ejemplo de Referencia 1 N-glicosilación de una proteína que no es de *C. jejuni*

Para demostrar que el requisito primario de la secuencia (secuencia de consenso optimizada) es suficiente para la N-glicosilación en bacterias, se examinó si una proteína que no era de *C. jejuni* se podía glicosilar aplicando la estrategia anterior. Como diana de la glicosilación se empleó la subunidad B de la toxina cólica (CtxB). El gen correspondiente se amplificó a partir de *Vibrio cholerae* de tal modo que contenía la secuencia que codificaba la secuencia señal de OmpA en el extremo N-terminal y un marcador hexa His en el extremo C-terminal, justo igual que las estructuras artificiales A a C en el ejemplo 1. El ADN resultante se clonó para reemplazar la estructura artificial A en los plásmidos empleados en el ejemplo 1. Una mutación puntual de W88 a D o una inserción de D detrás de W88 generó un sitio de glicosilación optimizado (DNNKT). Las proteínas CtxB de tipo silvestre y W88D que contenían la secuencia señal y el marcador His se expresaron en *E. coli* Top10 y otros tipos celulares en presencia y ausencia del locus *pgl* funcional de *C. jejuni*. Cuando se analizaron extractos periplásmicos de células Top10 mediante SDS-PAGE,

electrotransferencia e inmunotransferencia consecutiva con un antisuero para CtxB, solo CtxB W88D produjo una banda superior y, por lo tanto, glicosilada en la base del locus *pgl* (Figura 2E; compárense los carriles 3 y 4). También se insertó una secuencia de consenso (DSNIT) al reemplazar G54 o Q56 de CtxB (la última se denomina CtxB-Q56/DSNIT), es decir, en uno de los bucles de los que se había comunicado que contribuyen a la actividad ligante de CtxB relativa al gangliósido GM1. Los carriles 5 y 6 de la Figura 2E muestran que la proteína modificada genéticamente (ejemplificada por la estructura artificial que contiene la secuencia peptídica DSNIT en lugar de Q56, expresada en células Top10) producía una banda de menor movilidad y, por lo tanto, glicosilada en células competentes para glicosilación pero no en células carentes de glicosilación, cuando se analizó de un modo igual al descrito anteriormente. También se mostró que una CtxB que contenía dos manipulaciones, es decir, la inserción de D detrás de W88 así como DSNIT reemplazando a Q56, se glicosilaba doblemente en células SCM7 (Alaimo et al., EMBO Journal 25, 967-976 (2006)) (panel E, carriles 7 y 8). La proteína CtxB glicosilada de forma doble mostrada en el carril 7, se purificó por afinidad hacia Ni²⁺ y se analizó por ESI-MS/MS después de una tripsinización en gel de acuerdo con protocolos convencionales. Se detectaron los glicopéptidos esperados, lo que confirma que la N-glicosilación bacteriana también se puede dirigir a una proteína que no sea de *C. jejuni*, al mutar o insertar la secuencia de consenso optimizada de acuerdo con la invención para una N-glicosilación bacteriana (no se muestra). W3110, CLM24, BL21 (Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.), SCM6 y SCM7 son ejemplos de otras cepas adecuadas a modo de ejemplo de *E. coli* para poner en práctica la presente invención.

A continuación, se indica la secuencia de aminoácidos de la proteína CtxB utilizada en esta memoria (secuencia señal de OmpA recombinante subrayada; marcador hexa His en letra cursiva; W88 en letra negrita).

MKKTAAIAVALAGFATVAQATPQNITDLCAEYHNTQIHNTLNDKIFSATESLAGKREMAIT
FKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTRLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAAISM
ANGSHHHHHH (secuencia 5)

Ejemplo de Referencia 2 Introducción de sitios de N-glicosilación artificiales en la proteína de la membrana externa de *C. jejuni*, OmpH1

Una posible aplicación de la N-glicosilación en las bacterias es la presentación del glicano en la superficie de una célula hospedadora bacteriana con objeto de enlazar el fenotipo con el genotipo y, de este modo, seleccionar mutaciones genéticas específicas. Para mostrar que los N-glicanos se pueden presentar en proteínas de la membrana externa, la proteína OmpH1 se modificó genéticamente de tal modo que contuviera múltiples sitios de consenso optimizados de acuerdo con la invención. Los sitios se modificaron genéticamente en regiones bucle de la proteína, como se dedujo a partir de la estructura cristalina conocida (Muller, A., Thomas, G. H., Horler, R., Brannigan, J. A., Blagova, E., Levnikov, V. M., Fogg, M. J., Wilson, K. S. y Wilkinson, A. J. 2005. An ATP-binding cassette-type cysteine transporter in *Campylobacter jejuni* inferred from the structure of an extracytoplasmic solute receptor protein, Mol. Microbiol. 57, 143-155). Experimentos previos mostraron que los mejores secuencias para la glicosilación se generaban mediante las mutaciones V83T, K59N-G60I-N61T, R190N-G191I-D192T y H263D-F264S-G265N-D266I-D267T. Para la presentación superficial, se quiso evaluar diferentes combinaciones de esos sitios introducidos con objeto de establecer la muestra más específica para N-glicanos. Las combinaciones se generaron en una estructura artificial plasmídica que codificaba OmpH1 de tipo silvestre y se examinaron de una manera similar a la descrita para AcrA. En la Figura 3 se muestra el análisis de diversas variantes de OmpH1 que contienen múltiples secuencias con glicosilación además del secunón existente de tipo silvestre. Se generaron las variantes de OmpH1 con tres (carriles 3, 4, 5 y 7) y cuatro secunones de glicosilación (carril 6). También se incluyeron en el experimento una OmpH1 de tipo silvestre con un único secunón de glicosilación, y un mutante que carecía de la asparagina decisiva para la glicosilación. Todas las variantes sometidas a ensayo en esta memoria no solo mostraron un elevado nivel de eficacia para la glicosilación sino que también se utilizó cada secunón de glicosilación. Los resultados se confirmaron con un inmunosuero específico de N-glicanos de *Campylobacter* (Figura 3, panel inferior).

A continuación, se muestra la secuencia proteica de la proteína OmpH1 de *Campylobacter jejuni* (cepa 81-176), con el marcador myc fijado en letra cursiva:

MKKILLSVLTTFFVAWVLAACGGNSDSKTLNSLDKIKQNGVVRIGVFGDKPPFGYVDEKG
 NNQGYDIALAKRIAKELFGDENKVQFVLVEAANRVEFLKSNKVDIILANFTQTPERAQV
 DFCLPYMKVALGVAVPKDSNITSVEDLKDKTLLLNKGTTADAYFTQDYPNIKTLKYDQNT
 ETFAALMDKRGDALSHDNTLLFAWVKDHPDFKMGIKELGNKDVIAPAVKKGDKEKEFI
 DNLIKLGQEQQFFHKAYDETLKAHFGDDVKADDVVIEGGKILEQKLISEEDL (secuencia 6)

El sitio de glicosilación natural en la proteína está en negrita, la secuencia señal está subrayada.

Ejemplo de Referencia 3 Presentación superficial de N-glicanos procedentes de *C. jejuni* en OmpH1 sobre la membrana externa de células *E. coli*

Con objeto de responder a la pregunta de si se pueden presentar múltiples variantes de OmpH1 glicosiladas en la superficie de células bacterianas, se llevó a cabo una inmunofluorescencia sobre células bacterianas CLM24 o SCM6 (que es SCM7 $\Delta waaL$) que expresaban diversas variantes de OmpH1. En el experimento se incluyó una OmpH1 de tipo silvestre y un mutante que carecía de la asparagina decisiva para la glicosilación. Además, se construyó un mutante C20S con objeto de retener la proteína en el periplasma, sirviendo, así como control en el experimento. La inmunotinción se llevó a cabo sobre las células tratadas con paraformaldehído. El paraformaldehído fija las células sin destruir la estructura celular ni la compartimentación. Para detectar la proteína (fluorescencia roja) y el N-glicano (verde) en la superficie de las células bacterianas, se utilizaron respectivamente inmunosueros específicos para c-Myc y N-glicano, en combinación con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con FITC y Cy3. Además, se empleó 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI; azul) para teñir el ADN bacteriano con el fin de diferenciar inequívocamente las células bacterianas de los desechos celulares. Cuando se tiñeron las células que expresaban OmpH1 de tipo silvestre, se detectó una inmunofluorescencia específica para la proteína y también para el N-glicano (Figura 4A). Cuando se tiñó un mutante que carecía de la asparagina decisiva N139S con el inmunosuero específico, tanto anti-Myc como anti-N-glicano, solo se obtuvieron señales específicas de la proteína, pero no del glicano (panel 4B), lo que indicaba la especificidad del suero inmune específico de N-glicano. Cuando la proteína quedó retenida en el periplasma, como en el mutante C20S, no se detectó inmunofluorescencia roja, específica de la proteína, lo que indicaba que los anticuerpos eran incapaces de difundir dentro de la célula y eran suficientemente competentes para detectar cualquier fenómeno superficial (panel 4C). A continuación, se tiñeron células que expresaban múltiples variantes de OmpH1 diferentes en cuanto a la glicosilación: OmpH1^{KGN} → NIT.HFGDD → DSNIT (panel 4 D), OmpH1^{RGD} → NIT, HFGDD → DSNIT (panel 4 E), OmpH1^{KGN} → NIT, RGD → NIT (panel 4 F), OmpH1^{V83T, KGN} → NIT (panel 4 G) y OmpH1^{KGN} → NIT, RGD → NIT, HFGDD → DSNIT (panel 4 H). Todas las variantes de OmpH1 resultaron doblemente teñidas, lo que indicaba la presencia de proteína glicosilada en la superficie bacteriana. La Figura 4 se representa en escala de grises; la primera columna es una fotografía de fusión de las otras fotografías de la misma fila.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Eidgenoessische Technische Hochschule zuerich

<120> Proteínas N-glicosiladas recombinantes procedentes de células procariotas

<130> P44148EP1/PWC

<140> 10179208.3

<141> 10-05-2006

<150> EP 05010276.3

<151> 11-05-2005

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Lip con sitio de glicosilación N123 de AcrA y marcador hexa His

<400> 1

ES 2 703 061 T3

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

<210> 2
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Lip con sitio de glicosilación N123 de AcrA y marcador hexa His

<400> 2

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

<210> 3
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 703 061 T3

<220>

< 223> Lip con sitio de glicosilación N123 de AcrA y marcador hexa His

<400> 3

5

```

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1      5      10      15

Thr Val Ala Gln Ala Asp Val Ile Ile Lys Pro Gln Val Ser Gly Val
      20      25      30

Ile Val Asn Lys Leu Phe Lys Ala Gly Asp Lys Val Lys Lys Gly Gln
      35      40      45

Thr Leu Phe Ile Ile Glu Gln Asp Gln Asp Phe Asn Arg Ser Lys Ala
50      55      60

Leu Asp His Thr Glu Ile Lys Ala Pro Phe Asp Gly Thr Ile Gly Asp
65      70      75      80

Ala Leu Val Asn Ile Gly Asp Tyr Val Ser Ala Ser Thr Thr Glu Leu
      85      90      95

Val Arg Val Thr Asn Leu Asn Pro Ile Tyr Ala Asp Gly Ser His His
100      105      110

His His His His
115

```

10

<210> 4

< 211> 379

< 212> PRT

< 213> Artificial

15

<220>

< 223> Proteína AcrA con secuencia señal PelB y marcador hexa His

<400> 4

ES 2 703 061 T3

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

ES 2 703 061 T3

Asn Pro Ile Tyr Ala Asp Phe Phe Ile Ser Asp Thr Asp Lys Leu Asn
 210 215 220
 Leu Val Arg Asn Thr Gln Ser Gly Lys Trp Asp Leu Asp Ser Ile His
 225 230 235 240
 Ala Asn Leu Asn Leu Asn Gly Glu Thr Val Gln Gly Lys Leu Tyr Phe
 245 250 255
 Ile Asp Ser Val Ile Asp Ala Asn Ser Gly Thr Val Lys Ala Lys Ala
 260 265 270
 Val Phe Asp Asn Asn Asn Ser Thr Leu Leu Pro Gly Ala Phe Ala Thr
 275 280 285
 Ile Thr Ser Glu Gly Phe Ile Gln Lys Asn Gly Phe Lys Val Pro Gln
 290 295 300
 Ile Gly Val Lys Gln Asp Gln Asn Asp Val Tyr Val Leu Leu Val Lys
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Val Glu Lys Ser Ser Val His Ile Ser Tyr Gln Asn Asn
 325 330 335
 Glu Tyr Ala Ile Ile Asp Lys Gly Leu Gln Asn Gly Asp Lys Ile Ile
 340 345 350
 Leu Asp Asn Phe Lys Lys Ile Gln Val Gly Ser Glu Val Lys Glu Ile
 355 360 365
 Gly Ala Gln Leu Glu His His His His His His
 370 375

<210> 5
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Proteína CtxB con marcador hexa His y secuencia señal de OmpA

<400> 5

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Ala Gln Ala Thr Pro Gln Asn Ile Thr Asp Leu Cys Ala Glu
 20 25 30
 Tyr His Asn Thr Gln Ile His Thr Leu Asn Asp Lys Ile Phe Ser Tyr
 35 40 45

ES 2 703 061 T3

Thr Glu Ser Leu Ala Gly Lys Arg Glu Met Ala Ile Ile Thr Phe Lys
50 55 60
Asn Gly Ala Thr Phe Gln Val Glu Val Pro Gly Ser Gln His Ile Asp
65 70 75 80
Ser Gln Lys Lys Ala Ile Glu Arg Met Lys Asp Thr Leu Arg Ile Ala
85 90 95
Tyr Leu Thr Glu Ala Lys Val Glu Lys Leu Cys Val Trp Asn Asn Lys
100 105 110
Thr Pro His Ala Ile Ala Ala Ile Ser Met Ala Asn Gly Ser His His
115 120 125
His His His His
130

<210> 6
<211> 290
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> OmpH1 con marcador myc

<400> 6

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

ES 2 703 061 T3

Asp Leu Lys Asp Lys Thr Leu Leu Leu Asn Lys Gly Thr Thr Ala Asp
 145 150 155 160
 Ala Tyr Phe Thr Gln Asp Tyr Pro Asn Ile Lys Thr Leu Lys Tyr Asp
 165 170 175
 Gln Asn Thr Glu Thr Phe Ala Ala Leu Met Asp Lys Arg Gly Asp Ala
 180 185 190
 Leu Ser His Asp Asn Thr Leu Leu Phe Ala Trp Val Lys Asp His Pro
 195 200 205
 Asp Phe Lys Met Gly Ile Lys Glu Leu Gly Asn Lys Asp Val Ile Ala
 210 215 220
 Pro Ala Val Lys Lys Gly Asp Lys Glu Leu Lys Glu Phe Ile Asp Asn
 225 230 235 240
 Leu Ile Ile Lys Leu Gly Gln Glu Gln Phe Phe His Lys Ala Tyr Asp
 245 250 255
 Glu Thr Leu Lys Ala His Phe Gly Asp Asp Val Lys Ala Asp Asp Val
 260 265 270
 Val Ile Glu Gly Gly Lys Ile Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
 275 280 285
 Asp Leu
 290

REIVINDICACIONES

1. Una proteína N-glicosilada recombinante, que comprende una o más de las siguientes secuencia o secuencias consenso de aminoácidos optimizados N-glicosilados:

D/E- X- N- Z-S/T,

en la X y Z pueden ser cualquier aminoácido natural excepto Pro, en la que al menos una de dichas secuencia o secuencias consenso de aminoácidos optimizados N-glicosilados se introducen recombinantemente en dicha proteína, y en la que dicha proteína es la exoproteína de *P. aeruginosa*.

2. La proteína recombinante de la reivindicación 1, en la que dicha proteína está N-glicosilada.

3. La proteína recombinante de la reivindicación 1 o 2, que comprende al menos dos, preferentemente al menos tres de dichas secuencias consenso de aminoácidos optimizados N-glicosilados.

4. La proteína recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la proteína comprende uno o más N-glicanos seleccionados del grupo de N-glicanos procedentes de *Campylobacter* spp., preferentemente de *C. jejuni*, los N-glicanos obtenidos a partir de oligosacáridos y polisacáridos transferidos al polisacárido O que forma el antígeno O en bacterias Gram negativas o polisacáridos capsulares de bacterias Gram positivas, preferentemente: *P. aeruginosa* O9, O11; *E. coli* O7, O9, O16, O157 y *Shigella dysenteriae* O1.

5. La proteína recombinante de la reivindicación 4, en la que la proteína comprende uno o más N-glicanos derivados de oligosacáridos y polisacáridos transferidos al polisacárido O que forma el antígeno O en bacterias Gram negativas.

6. La proteína recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la proteína comprende dos o más N-glicanos diferentes.

7. La proteína recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la proteína y/o el N-glicano o N-glicanos son terapéutica y/o profilácticamente activos.

8. La proteína recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la proteína y/o el N-glicano o N-glicanos son inmunogénicamente activos.

9. La proteína recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además al menos una secuencia polipeptídica capaz de dirigir dicha proteína recombinante a la membrana externa de una bacteria Gram negativa.

10. La proteína recombinante de la reivindicación 9, en la que dicha secuencia polipeptídica dirigida se selecciona del grupo que consiste en péptidos señal de tipo II o proteínas de membrana externa, preferentemente seleccionada del grupo que consiste en la proteína de longitud completa o los péptidos señal OmpH1 de *C. jejuni*, JlpA de *C. jejuni*, proteínas de la membrana externa de *E. coli*, preferentemente OmpS, OmpC, OmpA, OprF, PhoE, LamB, Lpp, OmpA y la proteína Inp de *Pseudomonas aeruginosa*.

11. Un ácido nucleico que codifica una proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

12. Un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11.

13. Una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11 y/o un vector de acuerdo con la reivindicación 12.

14. Una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la célula hospedadora es procariota.

15. La célula hospedadora de la reivindicación 14, en la que la célula hospedadora es *Escherichia coli*.

16. Uso de una proteína recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para la preparación de un medicamento.

17. Uso de una proteína recombinante de acuerdo con la reivindicación 16 para la preparación de un medicamento para la vacunación terapéutica y/o profiláctica de un sujeto en necesidad del mismo.

18. Una composición farmacéutica, que comprende al menos una proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un excipiente, diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Fig. 1

1 2 3 4

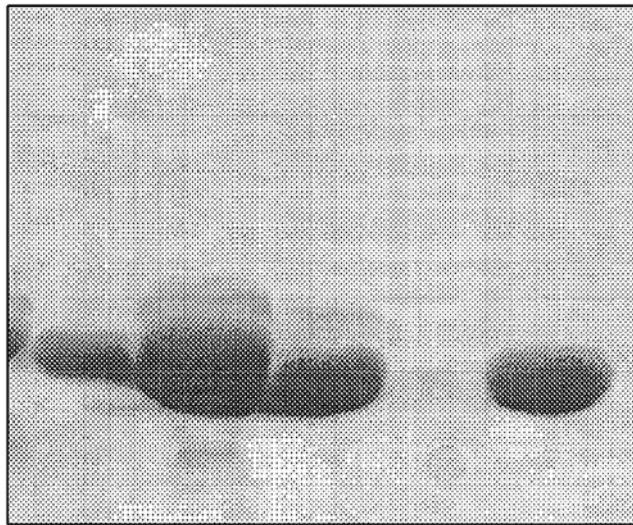


Fig. 2

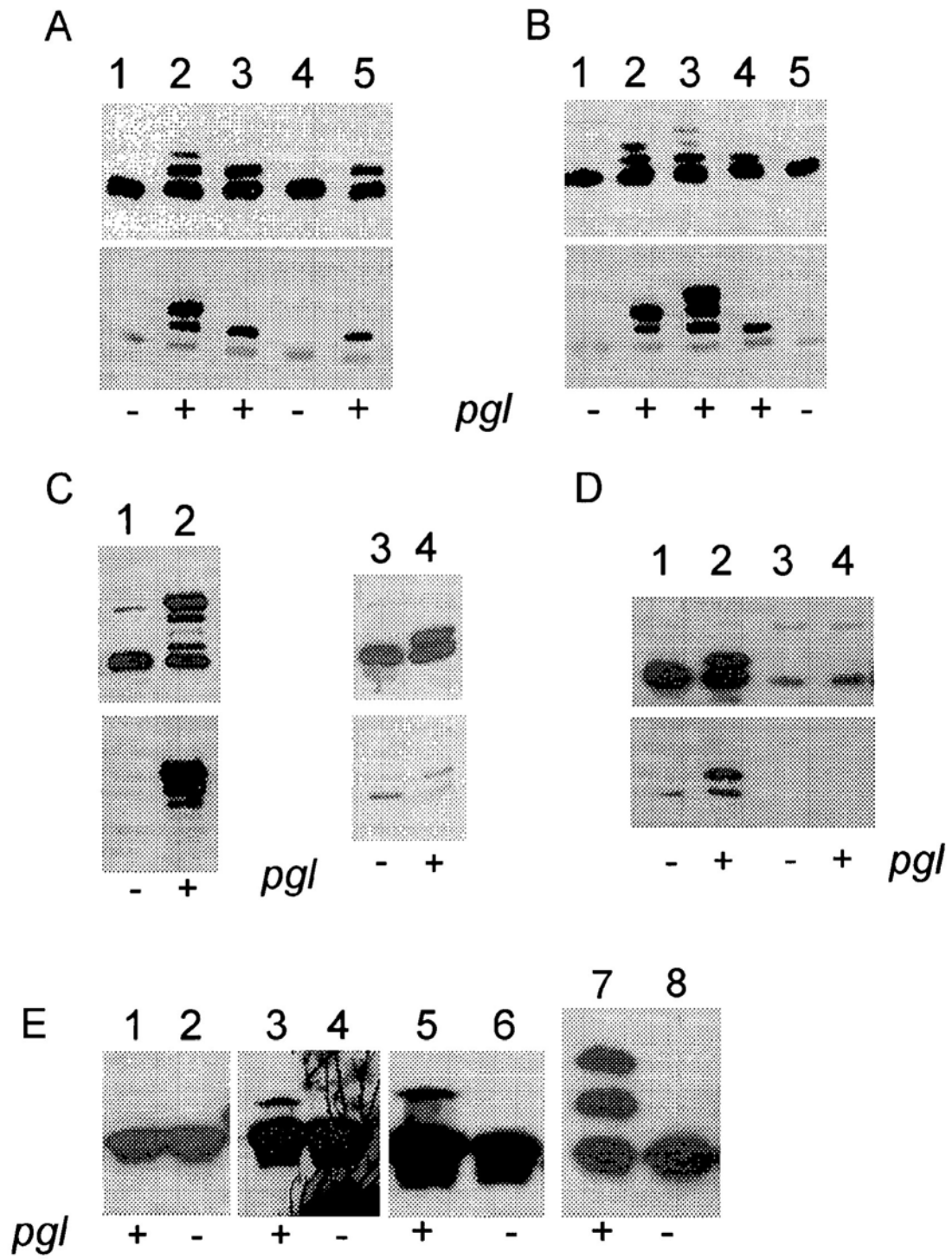


Fig 3

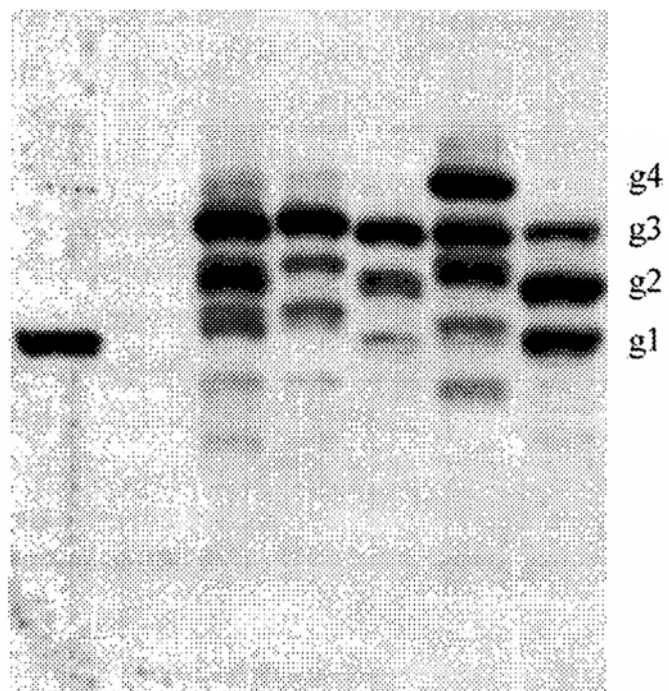
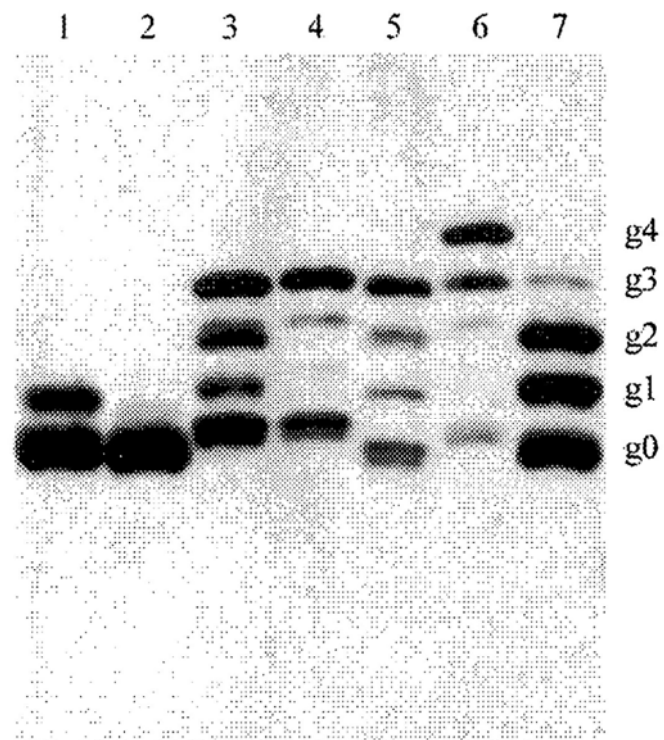


Fig. 4

