

(11) Número de Publicação: **PT 1888761 E**

(51) Classificação Internacional:

**C12P 21/00** (2007.10) **C12N 15/70** (2007.10)  
**C12N 9/10** (2007.10)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2006.05.10**

(30) Prioridade(s): **2005.05.11 EP 05010276**

(43) Data de publicação do pedido: **2008.02.20**

(45) Data e BPI da concessão: **2010.09.29**  
**001/2011**

(73) Titular(es):

**ETH ZURICH**  
**ETH TRANSFER, RÄMISTRASSE 101 8092**  
**ZÜRICH** **CH**

(72) Inventor(es):

**MARKUS AEBI** **CH**  
**MICHAEL KOWARIK** **CH**  
**UMESH AHUJA** **CH**

(74) Mandatário:

**ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA**  
**RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA** **PT**

(54) Epígrafe: **PROTEÍNAS N-GLICOSILADAS RECOMBINANTES DE CÉLULAS PROCARIÓTICAS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A PROTEÍNAS N-GLICOSILADAS RECOMBINANTES, QUE COMPREENDEM UMA OU MAIS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS OPTIMIZADAS, N-GLICOSILADAS, INTRODUZIDAS, ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAM PARA ESTAS PROTEÍNAS, BEM COMO VECTORES E CÉLULAS HOSPEDEIRAS CORRESPONDENTES. ADICIONALMENTE, A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE À UTILIZAÇÃO DAS REFERIDAS PROTEÍNAS, ÁCIDOS NUCLEICOS, VECTORES E CÉLULAS HOSPEDEIRAS PARA A PREPARAÇÃO DE MEDICAMENTOS. ADICIONALMENTE, A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA MÉTODOS PARA PRODUZIR AS REFERIDAS PROTEÍNAS.

RESUMO

**"Proteínas N-glicosiladas recombinantes de células procarióticas"**

A presente invenção refere-se a proteínas N-glicosiladas recombinantes, que compreendem uma ou mais sequências de aminoácidos optimizadas, N-glicosiladas, introduzidas, ácidos nucleicos que codificam para estas proteínas, bem como vectores e células hospedeiras correspondentes. Adicionalmente, a presente invenção refere-se à utilização das referidas proteínas, ácidos nucleicos, vectores e células hospedeiras para a preparação de medicamentos. Adicionalmente, a presente invenção proporciona métodos para produzir as referidas proteínas.

## DESCRIÇÃO

### **"Proteínas N-glicosiladas recombinantes de células procarióticas"**

A presente invenção refere-se a proteínas N-glicosiladas recombinantes, compreendendo introduzidas uma ou mais sequências de consenso de aminoácidos optimizadas, N-glicosiladas, ácidos nucleicos que codificam para estas proteínas, bem como vectores e células hospedeiras correspondentes. Adicionalmente, a presente invenção refere-se à utilização das referidas proteínas, ácidos nucleicos, vectores e células hospedeiras para a preparação de medicamentos. Adicionalmente, a presente invenção proporciona métodos para produzir as referidas proteínas.

#### **Antecedentes da invenção**

A glicosilação de proteínas ligada a N é um processo essencial e conservado que ocorre no retículo endoplasmático de organismos eucarióticos. É importante para o enrolamento de proteínas, oligomerização, estabilidade, controlo de qualidade, selecção e transporte de proteínas secretoras e de membrana (Helenius, A., e Aebi, M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 1019-1049).

A glicosilação de proteínas tem uma influência profunda na antigenicidade, estabilidade e semi-vida de uma proteína. Adicionalmente, a glicosilação pode auxiliar a purificação de proteínas por cromatografia, e.g. cromatografia por afinidade com ligandos de lectina ligados a uma fase sólida que interage com porções glicosiladas da proteína. É, portanto, prática estabelecida produzir muitas proteínas glicosiladas de forma recombinante em células eucarióticas para se obterem padrões de glicosilação biológica e farmaceuticamente úteis.

Apenas em anos recentes foi demonstrado que uma bactéria, o patogénio transportado em alimentos, *Campylobacter jejuni*, também pode N-glicosilar as suas proteínas (Szymanski, et al. (1999). Evidence for a system of general protein glycosylation

in *Campylobacter jejuni*. Mol. Microbiol. 32, 1022-1030). A maquinaria necessária para a glicosilação é codificada por 12 genes que estão agrupadas no designado *locus pgl*. O rompimento da N-glicosilação afecta a invasão e patogénese de *C. jejuni* mas não é letal, como acontece na maioria dos organismos eucarióticos (Burda P. e M. Aebi, (1999). The dolichol pathway of N-linked glycosylation. Biochim Biophys Acta 1426(2):239-57). É possível reconstituir a N-glicosilação de proteínas de *C. jejuni* expressando de forma recombinante o *locus pgl* e a glicoproteína aceitadora em *E. coli* ao mesmo tempo (Wacker et al. (2002). N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. Science 298, 1790-1793).

O Pedido de patente europeia N.º 03 702 276.1 (patente europeia 1 481 057), uma invenção anterior dos presentes inventores, ensina um organismo procariótico no qual é introduzido um ácido nucleico que codifica para (i) glicosiltransferases específicas para a montagem de um oligossacárido num transportador lipídico, (ii) uma proteína alvo recombinante que comprehende uma sequência de consenso "N - X - S/T", em que X pode ser qualquer aminoácido, excepto prolina, e (iii) uma oligossacariltransferase de *C. jejuni* (OTase) que liga de forma covalente o referido oligossacárido à sequência de consenso da proteína alvo. O referido organismo procariótico produz N-glicanos com uma estrutura específica que é definida pelo tipo de glicosiltransferases específicas.

Nita-Lazar et al. (Colycobiology, vol. 15, No. 4 April 2005, p.361-367) revela os requisitos de sequências polipeptídicas aceitadoras para N-glicosilação na N-glicosilação reconstituída da proteína modelo Acra em *E. coli*.

Apesar da presença da sequência de consenso de N-glicosilação conhecida numa proteína permitir a N-glicosilação de proteínas alvo recombinantes em organismos procarióticos, que comprehendem a oligossacariltransferase (OTase) de *C. jejuni*, a N-glicosilação de algumas proteínas alvo é muitas vezes ineficiente.

O objecto da presente invenção é proporcionar métodos para produzir estas proteínas com uma eficiência optimizada

para a N-glicosilação que pode ser produzida em organismos procarióticos *in vivo*. Outro objecto da presente invenção tem por objectivo a introdução mais eficiente de N-glicanos em proteínas recombinantes, para modificar a antigenicidade, estabilidade, actividade biológica, profiláctica e/ou terapêutica das referidas proteínas. Outro objecto é proporcionar uma célula hospedeira que apresenta de forma eficiente as proteínas N-glicosiladas da presente invenção, na sua superfície.

Num primeiro aspecto, a presente invenção proporciona um método para produzir proteínas glicosiladas ligadas a N, compreendendo:

- a) proporcionar ácidos nucleicos para pelo menos uma proteína alvo recombinante,
- b) inserir ácidos nucleicos que codificam para uma ou mais das seguintes sequências de consenso de aminoácidos optimizadas, N-glicosiladas:

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

em que X e Z podem ser qualquer aminoácido natural, excepto Pro, nos referidos ácidos nucleicos de a),

- c) proporcionar um organismo recombinante, de preferência um organismo procariótico compreendendo ácidos nucleicos que codificam para
  - (i) um operão *pgl* funcional de *Campylobacter* spp., de preferência *C. jejuni* e
  - (ii) pelo menos uma proteína alvo recombinante codificada pelos ácidos nucleicos resultantes do passo b),
- d) cultivar o organismo recombinante de um modo adequado para a produção de N-glicosilação da(s) proteína alvo.

Verificou-se, surpreendentemente, que a introdução de (uma) sequência(s) de aminoácidos parcial(ais), específica(s) (sequência(s) de consenso optimizada(s)) em proteínas origina proteínas que são eficientemente N-glicosiladas pela oligossacariltransferase (OST, OTase) de *Campylobacter* spp., de preferência *C. jejuni*, nestas posições introduzidas.

O termo "sequência(s) de aminoácidos parcial(ais)" como é utilizado no contexto da presente invenção, também será referido como "sequência(s) de consenso optimizada(s)". A sequência de consenso optimizada é N-glicosilada pela oligossacariltransferase (OST<sub>[MWI]</sub> OTase) de *Campylobacter* spp., de preferência *C. jejuni*, de forma muito mais eficiente do que a sequência de consenso regular "N - X - S/T" conhecida do estado da técnica.

Em geral, o termo "proteína N-glicosilada recombinante" refere-se a qualquer poli- ou oligopéptido heterólogo produzido numa célula hospedeira que não comprehende naturalmente o ácido nucleico que codifica para a referida proteína. No contexto da presente invenção este termo refere-se a uma proteína produzida de forma recombinante em qualquer células hospedeira, e.g. uma célula hospedeira eucariótica ou procariótica, de preferência uma célula hospedeira procariótica, e.g. *Escherichia* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Helicobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., mais preferencialmente *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella typhimurium* etc., em que o ácido nucleico que codifica para a referida proteína foi introduzido na referida célula hospedeira e em que a proteína codificada é N-glicosilada pela OTase de *Campylobacter* spp., de preferência *C. jejuni*, sendo a referida enzima transferase ocorre naturalmente na, ou é introduzida de forma recombinante na referida célula hospedeira.

De acordo com o código de uma letra internacionalmente aceite para aminoácidos, as abreviaturas D, E, N, S e T denotam ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina, serina e treonina, respectivamente. As proteínas de acordo com a invenção diferem das proteínas naturais ou do estado da técnica na medida em que uma ou mais sequências de consenso optimizadas D/E - X - N - Z - S/T é/são introduzidas e N-glicosiladas. Deste modo, as proteínas da presente invenção diferem das proteínas de *C. jejuni* que ocorrem naturalmente que também contêm a sequência de consenso optimizada, mas não comprehendem nenhuma sequência de consenso optimizada adicional (introduzida).

A introdução da sequência de consenso optimizada pode ser conseguida pela adição, eliminação, e/ou substituição de um ou mais aminoácidos. A adição, eliminação e/ou substituição de um ou mais aminoácidos para o fim de introduzir a sequência de consenso optimizada pode ser conseguida por estratégias de síntese química bem conhecidas dos peritos na especialidade, tais como síntese de péptidos química suportada em fase sólida. Alternativamente, e preferido para polipéptidos maiores, as proteínas da presente invenção podem ser preparadas por técnicas recombinantes convencionais.

As proteínas produzidas de acordo com a presente invenção têm a vantagem de poderem ser produzidas com uma eficiência elevada e em qualquer hospedeiro procariótico compreendendo um operão *pgl* funcional, de *Campylobacter spp.*, de preferência *C. jejuni*. OTases alternativas preferidas de *Campylobacter spp.* para a prática dos aspectos e concretizações da presente invenção são *Campylobacter coli* e *Campylobacter lari* (ver Szymanski, CM. e Wren, B. W. (2005). Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens. Nat. Rev. Microbiol. 3: 225-237). O operão *pgl* funcional pode estar presente naturalmente quando o referido hospedeiro procariótico é *Campylobacter spp.*, de preferência *C. jejuni*. No entanto, como demonstrado anteriormente na especialidade e mencionado acima, o operão *pgl* pode ser transferido para células hospedeiras e permanecer funcional no referido novo ambiente celular.

O termo "operão *pgl* funcional de *Campylobacter spp.*, de preferência *C. jejuni*" pretende significar o conjunto de ácidos nucleicos que codificam para a oligossacariltransferase funcional (OTase) de *Campylobacter spp.*, de preferência *C. jejuni*, e uma ou mais glicosiltransferases específicas capazes de montar um oligossacárido num transportador lipídico e em que o referido oligossacárido pode ser transferido do transportador lipídico para a proteína alvo com uma ou mais sequências de aminoácidos optimizadas: D/E - X N - Z - S/T pela OTase. Deve entender-se que o termo "operão *pgl* funcional de *Campylobacter spp.*, de preferência *C. jejuni*" no contexto da presente invenção não se refere necessariamente a um operão como uma unidade transcricional individual. O termo requer meramente a presença dos componentes funcionais para a N-glicosilação da proteína

recombinante numa célula hospedeira. Estes componentes podem ser transcritos como um ou mais ARN separados e podem ser regulados em conjunto, ou separadamente. Por exemplo, o termo também inclui componentes funcionais posicionados no ADN genómico e plasmídico, numa célula hospedeira. Para fins de eficiência, é preferido que todos os componentes do operão *pgl* funcional sejam regulados e expressos em simultâneo.

É importante ter em conta que apenas a oligossacariltransferase (OTase) funcional deverá ser proveniente de *Campylobacter spp.*, de preferência *C. jejuni*, e que uma ou mais glicosiltransferases específicas capazes de montar um oligossacárido num transportador lipídico podem ser provenientes da célula hospedeira, ou ser introduzidas de forma recombinante na referida célula hospedeira, sendo a única limitação funcional que o oligossacárido montado pelas referidas glicosiltransferases possa ser transferido do transportador lipídico para a proteína alvo com uma ou mais sequências de consenso optimizadas, pela OTase. Deste modo, a selecção da célula hospedeira que compreende glicosiltransferases específicas naturalmente e/ou glicosiltransferases específicas incapacitantes naturalmente presentes no referido hospedeiro, bem como a introdução de glicosiltransferases específicas heterólogas irá permitir que os peritos na especialidade variem os N-glicanos ligados ao local de consenso de N-glicosilação optimizado nas proteínas da presente invenção.

Como resultado, a presente invenção proporciona a concepção individual de padrões de N-glicano nas proteínas da presente invenção. As proteínas podem assim ser individualizadas no seu padrão de N-glicano para se ajustarem a necessidades biológicas, farmacêuticas e de purificação.

Numa concretização preferida, as proteínas da presente invenção podem compreender uma, mas também mais do que uma, de preferência pelo menos duas, de preferência pelo menos 3, mais preferencialmente pelo menos 5 das referidas sequências de aminoácido optimizadas N-glicosiladas.

A presença de uma ou mais sequências de aminoácidos optimizadas N-glicosiladas nas proteínas pode ser vantajosa

para aumentar a sua antigenicidade, aumentar a sua estabilidade, afectar a sua actividade biológica, prolongar a sua semi-vida biológica e/ou simplificar a sua purificação.

A sequência de consenso optimizada pode incluir qualquer aminoácido, excepto prolina, nas posições X e Z. O termo "quaisquer aminoácidos" pretende incluir aminoácidos naturais comuns e raros, bem como derivados de aminoácidos sintéticos e análogos que irão ainda permitir que a sequência de consenso optimizada seja N-glicosilada pela OTase. Os aminoácidos comuns e raros que ocorrem naturalmente são preferidos para X e Z. X e Z podem ser o mesmo ou diferentes.

Deve notar-se que X e Z podem diferir para cada sequência de consenso optimizada numa proteína de acordo com a presente invenção.

O N-glicano ligado à sequência de consenso optimizada será determinado pelas glicosiltransferases específicas e sua interacção quando se está a montar o oligossacárido num transportador lipídico, para transferência pela OTase. Os peritos na especialidade podem conceber o N-glicano variando o(s) tipo(s) e quantidade de glicosiltransferases específicas presentes na célula hospedeira desejada.

Os N-glicanos são aqui definidos como mono-, oligo- ou polissacáridos de composições variáveis que estão ligados a um azoto de  $\epsilon$ -amida de um resíduo de asparagina numa proteína, por ligação N-glicosídica. De preferência, os N-glicanos transferidos pela OTase são montados numa âncora lipídica de pirofosfato de undecaprenol que está presente na membrana citoplasmática de bactérias Gram-negativas ou positivas. Estão envolvidos na síntese do抗原 O, polissacárido O e peptidoglicano (Bugg, T. D., and 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).

Numa concretização preferida, a proteína recombinante da presente invenção comprehende um ou mais N-glicanos seleccionados do grupo de N-glicanos de *Campylobacter* spp., de

preferência *C. jejuni*, os N-glicanos derivados de oligo- e polissacáridos transferidos para o antígenio O que forma o polissacárido O em bactérias Gram-negativas ou polissacáridos capsulares de bactérias Gram-positivas, de preferência: *P. aeruginosa* O9, O11; *E. coli* O7, O9, O16, O157 e *Shigella dysenteriae* O1 e suas variantes manipuladas obtidas inserindo ou eliminando glicosiltransferases e epimerases que afectam a estrutura do polissacárido.

Noutra concretização preferida a proteína recombinante da presente invenção compreende dois ou mais N-glicanos diferentes.

Por exemplo, diferentes N-glicanos da mesma proteína podem ser preparados controlando a altura de expressão de glicosiltransferases específicas, utilizando promotores precoces ou tardios, ou introduzindo factores para iniciar, silenciar, potenciar e/ou reduzir a actividade do promotor de glicosiltransferases específicas, individuais. Promotores adequados e factores que controlam a sua actividade estão disponíveis para os peritos na especialidade rotineiramente e não serão discutidos em mais detalhe.

Não há limitação quanto à origem da proteína recombinante da invenção. De preferência, a referida proteína deriva de proteínas de mamífero, bactérias, vírus, fungos ou plantas. Mais preferencialmente, a proteína é derivada de mamífero, muito preferencialmente proteínas humanas. Para preparar proteínas recombinantes antigénicas de acordo com a invenção, de preferência para utilização como componentes activos em vacinas, é preferido que a proteína recombinante seja derivada de uma proteína bacteriana, viral ou fúngica.

Noutra concretização preferida, as proteínas recombinantes são umas em que ou a proteína e/ou o N-glicano(s) é terapeuticamente e/ou profilacticamente activo. A introdução de pelo menos uma sequência de consenso optimizada e N-glicosilada pode modificar ou mesmo introduzir actividade terapêutica e/ou profiláctica numa proteína. Numa concretização mais preferida, é a proteína e/ou o N-glicano que é imunogenicamente activo. Neste caso, a N-glicosilação introduzida pode ter um efeito modificador na actividade

biológica das proteínas e/ou introduzir novos locais antigénicos e/ou pode mascarar a proteína para evadir passos de degradação e/ou aumentar a semi-vida.

As proteínas recombinantes podem ser dirigidas eficientemente para a membrana exterior e/ou superfície de células hospedeiras, de preferência bactérias, mais preferencialmente bactérias Gram-negativas. Para auxiliar a apresentação na superfície e/ou localização na membrana externa é preferido que a proteína recombinante da invenção compreenda ainda pelo menos uma sequência polipeptídica capaz de direccionar a referida proteína recombinante para a membrana externa e/ou superfície celular de uma bactéria, de preferência uma bactéria Gram-negativa.

Numa concretização preferida, a proteína recombinante da invenção é uma em que a referida sequência polipeptídica direccionadora é seleccionada do grupo constituído por péptidos de sinal do tipo II (Paetzel, M., Karla, A., Strynadka, N.C., and Dalbey, R. E. 2002. Signal peptidases. Chem Rev 102: 4549-4580.) ou proteínas da membrana externa (revisto em Wemerus, H., e Stahl, S. 2004. Biotechnological applications for surface-engineered bacteria. Biotechnol Appl Biochem 40: 209-228.[mk2]), de preferência seleccionados do grupo constituído pela proteína de comprimento total, ou os péptidos de sinal de OmpH1 de *C. jejuni*, JIpA de *C. jejuni*, proteínas de membrana exterior de *E. coli*, de preferência OmpS, OmpC, OmpA, OprF, PhoE, LamB, Lpp'OmpA (uma proteína de fusão para tecnologia de apresentação na superfície, ver Francisco, JA1 Earhart, C. F., e 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.), e a proteína lnp de *Pseudomonas aeruginosa*.

Noutro aspecto, a presente invenção proporciona um método para preparar uma bactéria Gram-negativa recombinante com:

- i) um genótipo que comprehende sequências de nucleótidos que codificam para
  - a) pelo menos uma glicosiltransferase específica, natural ou recombinante para montagem de um oligossacárido num transportador lipídico,

- b) pelo menos uma oligossacariltransferase (OTase) natural ou recombinante de *Campylobacter* spp., de preferência *C. jejuni*,
- c) pelo menos uma proteína alvo recombinante compreendendo uma ou mais das seguintes sequências de consenso de aminoácidos optimizadas, N-glicosiladas:

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

em que X e Z podem ser qualquer aminoácido natural excepto Pro, e

- ii) um fenótipo compreendendo a proteína alvo N-glicosilada recombinante, produzida, que está localizada na e/ou sobre a membrana externa da bactéria Gram-negativa;

em que o referido método compreende os passos de:

- A) proporcionar ácidos nucleicos que codificam para pelo menos uma proteína alvo recombinante,
- B) inserir ácidos nucleicos que codificam para uma ou mais das seguintes sequências de consenso de aminoácidos optimizadas, N-glicosiladas:

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

em que X e Z podem ser qualquer aminoácido natural, excepto Pro, nos referidos ácidos nucleicos de A),

- C) proporcionar uma bactéria Gram-negativa,
- D) introduzir na referida bactéria pelo menos uma sequência de nucleótidos que codifica para
  - a) pelo menos uma glicosiltransferase específica recombinante para montagem de um oligossacárido num transportador lipídico, e/ou
  - b) pelo menos uma oligossacariltransferase (OTase) recombinante de *Campylobacter* spp., e
  - c) pelo menos uma proteína alvo recombinante codificada pelos ácidos nucleicos resultantes do passo B) e
- E) cultivar a referida bactéria até pelo menos uma proteína N-glicosilada codificada pela sequência de nucleótidos do passo D) estar localizada na e/ou sobre a membrana externa da bactéria Gram-negativa.

Ainda noutro aspecto, a presente invenção proporciona um organismo procariótico no qual se introduz informação genética compreendendo ácidos nucleicos que codificam para:

- a) glicosiltransferases de um tipo que monta oligossacáridos num transportador lipídico;
- b) pelo menos uma proteína alvo recombinante derivada de uma proteína subjacente por inserção recombinante de pelo menos uma sequência de consenso D-X-N-Z-S/T, em que X e Z podem ser qualquer aminoácido excepto Pro, na proteína subjacente; e
- c) uma oligossacariltransferase de *Campylobacter* spp.;

em que a referida oligossacariltransferase liga o referido oligossacárido à referida sequência de consenso das referidas uma ou mais proteínas alvo recombinantes.

Uma vez que as proteínas preferidas podem ter uma actividade terapêutica ou profiláctica por elas próprias e/ou devido aos locais de N-glicosilação introduzidos, podem ser utilizadas para a preparação de um medicamento. O tipo de proteína para a prática da invenção não é limitativo e, portanto, as proteínas da invenção, tais como EPO, IFN-alfa, TNFalfa, IgG, IgM, IgA, interleucinas, citoquinas, proteínas virais e bacterianas para vacinação, como proteínas de *C. jejuni* tais como HisJ (Cj0734c), AcrA (Cj0367c), OmpH1 (Cj0982c), toxina de difteria (CRM 197), toxina de cólera, exoproteína de *P. aeruginosa*, para referir apenas algumas e tendo nelas introduzida a sequência de consenso N-glicosilada optimizada, são úteis para preparar um medicamento (Wyszynska, A., Raczkó, A., Lis, M., e Jagusztyń-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).

Adicionalmente, os ácidos nucleicos e/ou vectores aqui descritos também são úteis para a preparação de um medicamento, de preferência para utilização em terapia génica.

Além disso, uma célula hospedeira de acordo com a invenção, de preferência uma que tem um fenótipo que comprehende uma proteína recombinante N-glicosilada da invenção que está localizada na e/ou sobre a membrana externa de uma bactéria, de preferência uma bactéria Gram-negativa, mais preferencialmente uma das bactérias Gram-negativas acima enumeradas, é particularmente útil para a preparação de um medicamento.

Mais preferencialmente, uma proteína como aqui descrito é utilizada para a preparação de um medicamento para a vacinação terapêutica e/ou profiláctica de um indivíduo necessitado.

As células hospedeiras aqui descritas que apresentam as referidas proteínas recombinantes N-glicosiladas são particularmente úteis para preparar vacinas, pois as proteínas N-glicosiladas apresentadas estão presentes em abundância na superfície de células hospedeiras e bem acessíveis a células imunitárias, em particular os seus N-glicanos hidrófilos e porque as células hospedeiras têm o efeito adicional de um adjuvante, que, se vivas, podem ainda replicar-se numa medida e amplificar os seus efeitos de vacinação.

De preferência, a célula hospedeira para a prática dos aspectos médicos da presente invenção é uma célula hospedeira atenuada ou morta.

Outra vantagem da utilização das células hospedeiras da invenção para a preparação de medicamentos, de preferência vacinas, é que estas induzem anticorpos IgA devido ao componente celular.

De preferência, as referidas células hospedeiras são utilizadas de acordo com a invenção para induzir anticorpos IgA num animal, de preferência um mamífero, roedor, ovino, equino, canino, bovino ou humano. É preferido que o referido indivíduo necessitado de vacinação seja uma ave, mamífero ou peixe, de preferência um mamífero, mais preferencialmente um mamífero seleccionado do grupo constituído por gado, ovelhas, equinos, cães, gatos e humanos, muito preferencialmente humanos. Os galináceos também são preferidos.

As proteínas produzidas de acordo com a invenção podem ser utilizadas numa composição farmacêutica que compreende pelo menos uma proteína, pelo menos um ácido nucleico, pelo menos um vector e/ou pelo menos uma célula hospedeira de acordo com a invenção. A preparação de medicamentos que compreendem proteínas ou células hospedeiras, de preferência células hospedeiras atenuadas ou mortas e a preparação de medicamentos que compreendem ácidos nucleicos e/ou vectores para terapia génica, são bem conhecidos na especialidade. O esquema de preparação para a composição farmacêutica final e o modo e detalhes para a sua administração dependerão da proteína, da célula hospedeira, do ácido nucleico e/ou do vector utilizado.

Numa concretização preferida, a composição farmacêutica compreende um excipiente, diluente e/ou adjuvante farmaceuticamente aceitável.

Uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos um dos seguintes (i) uma proteína recombinante, uma célula hospedeira, um ácido nucleico e/ou um vector recombinante sendo/ codificando/expressando uma proteína recombinante de acordo com a presente invenção e (ii) um excipiente, diluente e/ou adjuvante farmaceuticamente aceitável pode ser útil.

Excipientes, diluentes e/ou adjuvantes adequados são bem conhecidos na especialidade. Um excipiente ou diluente pode ser um material sólido, semi-sólido ou líquido que pode servir como veículo ou meio para o ingrediente activo. Um perito na especialidade no campo da preparação de composições pode seleccionar facilmente a forma e modo de administração adequados, dependendo das características particulares do produto seleccionado, da doença ou condição a ser tratada, da fase da doença ou condição, e outras circunstâncias relevantes (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co. (1990)). A proporção e natureza do diluente ou excipiente farmaceuticamente aceitável são determinadas pela solubilidade e propriedades químicas do composto farmaceuticamente activo seleccionado, da via de administração seleccionada, e da prática farmacêutica convencional. A preparação farmacêutica pode ser adaptada para utilização oral, parentérica ou tópica e pode ser administrada ao paciente na forma de comprimidos,

cápsulas, supositórios, solução, suspensões ou semelhantes. Os compostos farmaceuticamente activos da presente invenção, apesar de eles próprios serem eficazes, podem ser formulados e administrados na forma dos seus sais farmaceuticamente aceitáveis, tais como sais de adição de ácido, ou sais de adição de base, para fins de estabilidade, conveniência de cristalização, maior solubilidade e semelhantes.

Para a prática dos métodos preferidos acima, o organismo procariótico recombinante ou a célula hospedeira é de preferência seleccionado do grupo de bactérias constituído por *Escherichia spp.*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Helicobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.*, de preferência *Escherichia coli*, de preferência *E. coli* estirpes Top10, W3110, CLM24, BL21, SCM6 e SCM7, e *S. enterica* estirpes SL3261, SL3749 e SL3261ΔWaaL.

Outro método preferido para produzir, isolar e /ou purificar uma proteína recombinante de acordo com a invenção compreende os passos de:

- a) cultivar uma célula hospedeira como aqui descrito
- b) remover a membrana externa da referida bactéria Gram-negativa recombinante e
- c) recuperar a referida proteína recombinante.

Exemplos de métodos para remover a membrana externa de uma célula, de preferência uma célula procariótica, mais preferencialmente uma célula bacteriana Gram-negativa, são métodos de tratamento enzimático adequados, solubilização com detergente por choque osmótico e o método de prensa francesa. Muito preferencialmente, a presente invenção refere-se a um método em que glicosiltransferases específicas recombinantes ou naturais de espécies que não a *Campylobacter spp.*, de preferência *C. jejuni*, são seleccionadas do grupo constituído por glicosiltransferases e epimerases provenientes de bactérias, arqueobactérias e/ou eucariotas que podem ser funcionalmente expressas na referida célula hospedeira.

## **Figuras**

A Figura 1 ilustra a N-glicosilação de proteínas Lip derivadas de construções A a C (ver exemplo 1). *E. coli* Top 10

células que transportam um operão *pgl* funcional de *C. jejuni* (Wacker et al., 2002, supra) e um plasmídeo que codifica para construções A (coluna 2), B (coluna 1), e C (coluna 3) ou um mutante de construção C com a mutação D121A (coluna 4). As proteínas foram expressas e purificadas a partir de extractos periplasmáticos. É apresentada a SDS-PAGE e a coloração com azul brilhante de Coomassie das fracções de proteína purificadas.

A Figura 2 mostra a análise de N-glicosilação das diferentes proteínas que foram analisadas quanto à N-glicosilação específica de sequência pelo operão *pgl* de *C. jejuni* (Wacker et al., 2002, supra) em 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) ou células Top10 (pamel E colunas 1-6) ou 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) (pamel E, colunas 7, 8) expressando as referidas proteínas a partir de um plasmídeo. São apresentados os extractos periplasmáticos separados por SDS-PAGE que foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose e visualizados com anti-soros específicos. Nos painéis A-D, o painel de topo mostra imunotransferências sondadas com anti-soro anti-AcrA (Wacker et al. 2002, supra; Nita-Lazar, M., Wacker, M., Schegg, B., Amber, S., and Aebi, M. (2005)). A sequência de consenso N-X- S/T é necessária mas não suficiente para a glicosilação de proteínas ligada a N, bacteriana. Glycobiology 15, 361-367), enquanto os painéis inferiores mostram imunotransferências sondadas com anti-soro R12 (Wacker et al., 2002, supra). + e - indicam a presença do operão *pgl* funcional ou mutante, nas células. O painel A contém amostras de AcrA do tipo selvagem, solúvel, com a sequência de sinal pelB e a marca hexa-his (colunas 1, 2), AcrA- N273Q (coluna 3, 4), e AcrA-D121A (coluna 5). Painel B: AcrA (colunas 1, 2), AcrA-T145D (coluna 3), AcrA-N123Q-N273Q-T145D (colunas 4, 5). Painel C: AcrA-F115D-T145D (colunas 1, 2), AcrA-N123Q-N273Q-N272D (colunas 3, 4). Painel D: AcrA-N273Q (colunas 1, 2), AcrA-N273Q-F122P (colunas 3, 4). Painel E: CtxB (colunas 1,

2), CtxB-W88D (colunas 3, 4), CtxB- Q56/DSNIT (colunas 5, 6), e CtxB-W88D- Q56/DSNIT.

A Figura 3 mostra a manipulação de múltiplos locais de glicosilação em OmpH1. A estirpe ΔwaaL SCM6 foi co-transformada com o plasmídeo pACYC<sub>pgl</sub> (que codifica para todo o locus *pgl*) e plasmídeos que expressam OmpH1 do tipo selvagem (coluna 1), OmpH1<sup>N139S</sup>-myc (coluna 2), OmpH1<sup>KGN->NIT, HFGDD->DSNIT</sup> -myc (coluna 3) OmpH1<sup>RGD->NIT, HFGDD->DSNIT</sup> -myc (coluna 4), OmpH1<sup>KGN->NIT, RGD->NIT</sup> -myc (coluna 5), OmpH1<sup>KGN-NIT, RGD->NIT, HFGDD->DSNIT</sup> -myc (coluna 6) ou OmpH1<sup>RGD->NIT V83T</sup> -myc (coluna 7). As células foram crescidas aerobicamente, induzidas com 0,5% de arabinose durante 3 horas antes de análise. Os lisados de células totais foram precipitados com TCA após igualar a densidade óptica das culturas, como descrito na secção de materiais e métodos. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE a 15% e transferidas para uma membrana de PVDF. *Primeiro painel*, imunotransferência de lisados de células inteiras sondado com anticorpos anti-marca myc. *Painel inferior*, imunotransferência de lisados de células inteiras sondados com anti-soro específico de glicanos. As posições de OmpH1 não glicosilado e glicosilado são indicadas à direita.

Figura 4. microscopia de fluorescência de células que expressam várias variantes de OmpH1. Culturas de *E. coli* estirpes CLM24 ou SCM6 contendo o plasmídeo de expressão para OmpH1 do tipo selvagem e suas variantes foram igualizados a DO<sub>600</sub> de 0.25/ml. As células foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4 e deitaram-se 100 µl de suspensões celulares em lâminas de vidro gelatinizadas e incubou-se à temperatura ambiente (TA) durante 30 min, numa câmara humidificadora. Todos os passos subsequentes na marcação por imunofluorescência de células totais foram feitos à temperatura ambiente, dentro de uma câmara humidificada. As células não ligadas foram removidas e o resto foi fixado com paraformaldeído a 4% contendo PBS, durante 30 min à TA. Com relevância, considera-se que o paraformaldeído não permeabiliza as células, mas mantém a compartimentação por membranas intacta. As células fixadas foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em tampão bloqueador contendo BSA a 5% em PBS. Após o bloqueio, as células foram incubadas com IgG de ratinho monoclonal anti-myc

(1:50, Calbiochem) e/ou anti-soro anti-glicano (1:4000) durante 1 h em 100 µl de PBS contendo BSA a 5%. As células foram lavadas três vezes com 100 µl de PBS durante 5 min cada e incubadas com anticorpo anti-coelho secundário, conjugado com FITC (1 :250, Jackson Immunoresearch Laboratories) e/ou anticorpo anti-ratinho conjugado com Cy3 (1 :250, Jackson Immunoresearch Laboratories) durante 1 h, em 100 µl de PBS contendo BSA a 5%. Quando necessário, adicionou-se 4, 6-diamino-2-fenilindole (DAPI) (Sigma) (0,5 µg/ml) na altura da incubação do anticorpo secundário para corar o ADN bacteriano. O anticorpo secundário foi lavado das células PBS e montaram-se lamelas sobre as lâminas utilizando meio de montagem vectashield (Vector Laboratories) e selou-se com verniz de unhas. A microscopia de fluorescência foi realizada num microscópio Axioplan2 (Carl Zeiss). As imagens foram combinadas utilizando Adobe Photoshop, versão CS2. As células SCM6 que expressam OmpH1 (paineis A), OmpH1<sup>N139S</sup> (paineis B), OmpH1<sup>C20S</sup> (paineis C), OmpH1<sup>KGN->NIT, HFGDD->DSNIT</sup> (paineis D), OmpH1<sup>RGD->NIT, HFGDD->DSNIT</sup> (paineis E), OmpH1<sup>KGN->NIT, RGD->NIT</sup> (paineis F), OmpH1<sup>V83T, KGN->NIT</sup> (paineis G), e OmpH1<sup>KGN->NIT, RGD->NIT, HFGDD->DSNIT</sup> (paineis H). A primeira coluna é uma junção das figuras nas colunas 2, 3, e 4 representadas em tons de cinzento num fundo preto. Coluna: fluorescência azul em tons de cinzento da coloração DAPI, coluna 3: fluorescência verde de fluorescência específica de glicano, coluna 4: fluorescência vermelha de coloração anti-myc.

Os exemplos seguintes servem para ilustrar melhor a presente invenção e não pretendem limitar o seu âmbito em nenhum modo.

### **Exemplos**

#### **Seleção de AcrA como proteína modelo para optimizar a N-glicosilação**

Para optimizar os requisitos da proteína aceitadora para a N-glicosilação, fizeram-se estudos detalhados sobre a glicoproteína AcrA de *C. jejuni* (Cj0367c). A AcrA é uma lipoproteína periplasmática de 350 resíduos de aminoácidos. Verificou-se que a secreção para o periplasma, mas não a ancoragem nos lípidos, é um pré-requisito para a glicosilação

(Nita-Lazar et al., 2005, *supra*). O sinal para exportar pode ser, ou a sequência de sinal de AcrA nativa, ou o sinal de PeIB heterólogo, quando expresso em *E. coli*. Das cinco sequências de glicosilação ligada a N, potenciais (N1 17, N123, N147, N273, N274) utilizam-se as mesmas duas em *C. jejuni* e *E. coli* (N123 e N273 (Nita-Lazar et al., 2005, *supra*)). A AcrA foi escolhida como modelo pois é a única N-glicoproteína periplasmática de *C. jejuni* para a qual está disponível informação estrutural detalhada. Recentemente, foi publicada a estrutura de cristal de um homólogo de AcrA, a proteína MexA da bactéria 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 70f1 9994-9999). Ambas as proteínas são membros das designadas proteínas de bomba de efluxo periplasmática (PEP, (Johnson, J. M. e 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)). A molécula alongada contém três subdomínios num arranjo linear: uma hélice- $\alpha$ , anti-paralela, super-enrolada que é mantida junta na base por um domínio lipoílo, que é seguido por um domínio cilindro- $\beta$  de seis cadeias. Os 23-28 resíduos no terminal N e os 95-101 resíduos no terminal C não estão estruturados nos cristais. As sequências de proteína MexA e AcrA são 29,3% idênticas e 50 % semelhantes. Deste modo, as duas proteínas provavelmente exibem um enrolamento global semelhante.

Exemplo 1 Elucidação da sequência peptídica primária que desencadeia a glicosilação

É conhecido que os domínios lipoílo semelhantes a MexA de *P. aeruginosa* e também em AcrA de *C. jejuni* formam uma proteína compacta que pode ser expressa individualmente em *E. coli* (revisto por Berg, A., e de Kok, A. (1997). 2-Oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes. The central role of the lipoyl domain. Biol. Chem. 378, 617-634). Para verificar qual a sequência de péptido aceitador era necessária para a N-glicosilação pela maquinaria *pgl* em *E. coli*, tomou-se o domínio lipoílo de AcrA. Este foi utilizado como estrutura molecular para transportar péptidos de diferentes comprimentos para o periplasma e apresentá-los à maquinaria de *pgl* *in vivo*.

Deste modo, construiu-se um plasmídeo que codifica para o domínio lipoílo (Lip) e fundiu-se N-terminalmente com a sequência de sinal de OmpA (Choi, J. H., e Lee, S. Y. (2004). Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 64, 625-635) e C-terminalmente com uma marca de hexa-his. A clonagem foi realizada para colocar a expressão de genes sob o controlo do promotor de arabinose. Para as fronteiras do domínio Lip escolheram-se posições de aminoácido que surgiam nas mesmas posições que as fronteiras do domínio da parte do domínio lipoílo em MexA. Para testar péptidos diferentes quanto à sua capacidade para aceitar um N-glicanos, inseriram-se porções da sequência entre as duas partes do tipo cabeça de martelo do domínio Lip. As porções consistiam de sequências que compreendem o local de N-glicosilação N 123 de *C. jejuni* AcrA. As sequências de leitura aberta resultantes consistiam das sequências que codificam para a sequência de sinal OmpA, a parte do tipo cabeça de martelo N-terminal de AcrA (D60-D95, a numeração dos aminoácidos refere-se à numeração da sequência do polipéptido AcrA maduro), as diferentes porções que contêm o local de glicosilação N 123 nativo de AcrA (ver a seguir), a parte do tipo cabeça de martelo C-terminal de AcrA-Lip (L167-D210) e a marca his C-terminal.

A construção dos plasmídeos foi conseguida por técnicas de biologia molecular convencionais. Três porções contendo o local de glicosilação N123 nativo de AcrA de diferentes comprimentos foram introduzidas entre as duas metades de Lip, resultando em três diferentes ORF: A construção A contém A118-S130 resultando numa sequência de proteína de:

**MKKTAIAIAVALAGFATVAQADVI**IKPQVSGVIVNKLFKAGDKVKKGQTLFIIEQDQASKDF  
**NRS**KALFSQLDHTEIKAPFDGTIGDALVNIGDYVSASTTELVRVTNLNPIYADGSHHHHHH  
 (sequência 1).

A construção B contém F122-E138 resultando numa sequência de proteína de:

**MKKTAIAIAVALAGFATVAQADVI**IKPQVSGVIVNKLFKAGDKVKKGQTLFIIEQDQFNRSK  
 ALFSQSAISQKELDHTEIKAPFDGTIGDALVNIGDYVSASTTELVRVTNLNPIYADGSHHHH  
 HH (sequência 2).

A construção C contém D121-A127 resultando numa sequência de proteína de:

MKKTAIAIAVALAGFATVAQADVIIKPVSGVIVNKLFKAGDKVKKGQTLFIIEQDQ**DFNRS**  
KALDHTEIKAPFDGTIGDALVNIGDYVASTTELVRVTNLNPIYADGSHHHHHH  
(sequência 3).

As porções da sequência sublinhadas indicam o péptido de sinal OmpA, os resíduos sublinhados uma vez foram introduzidos por razões de clonagem, ou para tornar a proteína resistente à degradação. Negrito: local de glicosilação correspondente a N 123 de AcrA. Itálico: marca hexa-his. Os genes correspondentes foram expressos sob o controlo do promotor de arabinose no esqueleto do plasmídeo pEC415 (Schulz, H., Hennecke, H., e Thony-Meyer, L. (1998). Prototype of a heme chaperone essential for cytochrome c maturation. *Science* 281, 1197-1200).

Para verificar qual das três porções desencadeia a glicosilação das proteínas Lip, fizeram-se experiências sobre a expressão de proteínas. *E. coli* células Top10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) que transportam pACYC<sub>pgl</sub> ou pACYC<sub>pglmut</sub> (Wacker et al., 2002, supra) e um plasmídeo que codifica para as construções A, B ou C foram crescidos em meio LB contendo ampicilina e cloranfenicol, até uma DO de 0,5 a 37°C. Para indução, adicionou-se 1/1000 volume de solução de arabinose a 20% (p/v) e as células foram crescidas por mais 2 horas. As células foram em seguida recolhidas por centrifugação e ressuspensas em Tris/HCl 20 mM, pH 8,5, sacarose a 20% (p/v), EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, e lisozima 1 g/l (p/v) e incubadas a 4°C, durante 1 hora. Os extractos periplasmáticos foram obtidos após sedimentação dos esferoblastos e diluídos a 1/9 de volume (v/v) de 10x tampão A (NaCl 3 M, Tris/HCl 0,5 M, pH 8,0 e imidazolo 0,1 M) e adicionou-se MgSO<sub>4</sub> a 2,5 mM. A purificação por afinidade de Ni foi realizada em colunas de Ni-Sepharose de 1 ml da Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia) em tampão A. As proteínas foram eluídas em tampão A contendo imidazole 0,25 M.

A Figura 1 mostra um gel de SDS-PAGE corado com azul brilhante de Coomassie das fracções de eluição de pico dos extractos periplasmáticos purificados com Ni. A análise de expressão mostrou que a construção B produziu uma única

espécie proteica proeminente (Figura 1, coluna 1). As construções A e C originam ambas, além da proteína proeminente, uma segunda banda de proteína com mobilidade electroforética mais lenta (Figura 1, colunas 2 e 3). O facto de a espécie proteica mais pesada ser de facto glicosilada foi provado por MALDI-TOF/TOF (não apresentado). O único aminoácido que não está na construção B, mas está presente na A e C era o D121, o resíduo de aspartato 2 posições N-terminalmente do N123 glicosilado N123. Isto demonstra que o D121 desempenha um papel importante para a glicosilação pela OTase. Para verificar que o D121 é essencial para a glicosilação ele foi mutado para alanina na construção C. a análise de expressão resultou em apenas uma banda de proteína (Figura 1, coluna 4), mostrando assim que o D121 é importante para a glicosilação. Além disso, o facto de uma proteína de apresentação de péptido artificial poder ser glicosilada mostra que um péptido curto do tipo D/E-X-N-Y-S/T contém toda a informação para que a N-glicosilação transportada por *C. jejuni* ocorra.

Exemplo 2 Verificação do exemplo 1; AcrA-D121A não é glicosilado em N123

Para confirmar as constatações da abordagem de apresentação do péptido, inseriu-se uma mutação de aspartato para alanina na posição 121 (D121A, i.e. 2 resíduos antes do N123 glicosilado) na versão solúvel de comprimento total da proteína AcrA e testou-se se o local N123 poderia ainda ser glicosilado em *E. coli*. De modo a testar isso, o AcrA-D121A foi expresso e o seu estado de glicosilação foi analisado. Para a análise utilizou-se um AcrA manipulado. Este diferia do gene de *C. jejuni* original na medida em que contém a sequência de sinal de PeIB (Choi e Lee, 2004, *supra*) para secreção no periplasma e uma marca hexa-his C-terminal para purificação. Verificou-se que esta variante de AcrA é segregada, o péptido de sinal clivado e glicosilado como a proteína nativa, ancorada nos lípidos (Nita-Lazar et al., 2005, *supra*). A seguir apresenta-se a sequência de proteína da proteína AcrA solúvel:

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAMHMSKEEAPKIQMPPQPVTTMSAKSEDPLSFTYPAKLVS  
DYDVIIKPQVSGVIVNKLFKAGDKVKKGQTLFIIEQDKFKASVDSAYGQALMAKATFENASK

**DFNRS**KALFSKSAISQKEYDSSLATFNNSKASLASARAQLANARIDL  
DHEIKAPFDGTIGD  
ALVNIGDYVSASTTELVRVTNLNPIYADFFISD  
TDKLNIVRNTQSGKWDLDSIHANLN  
LNGE  
TVQGKLYFIDSVIDANS  
GTVKAKAVF**DNNNS**TLLPGAFATITSEGFIQKNGFKVPQIGVKQD  
QNDVYVLLVKNGKVEKSSVHISYQNNEYAIIDKGLQNGDKIILDNFKKIQVGSEVKEIGAQL  
EHHHHHH (sequência 4)

Os resíduos sublinhados são o péptido de sinal PeIB, em itálico, a marca hexa-his, e a negrito os dois locais de glicosilação naturais em N123 e N273. Construiu-se um plasmídeo que contém a ORF para a proteína acima no plasmídeo pEC415 (Schulz et al., 1998), para produzir pAcrAper.

O ensaio para testar o estado de glicosilação de AcrA e seus mutantes (ver a seguir) era como se segue: a expressão de AcrA foi induzida com arabinose a 0,02% em células de *E. coli* CLM24 com crescimento exponencial (Feldman et al., 2005, *supra*) contendo o operão *pgl* transportado pelo plasmídeo na sua forma activa ou inactiva (pACYCpg/ ou pACYCpg/mut, ver (Wacker et al., 2002, *supra*)) e um plasmídeo que codifica para AcrA (pAcrAper). Após quatro horas de indução, os extractos periplasmáticos foram preparados como descrito acima e analisados por SDS-PAGE, electrotransferência e imunodetectação, quer com anti-soro anti-AcrA, quer com anti-soro R12. Este último é específico para proteínas contendo N-glicano de *C. jejuni* (Wacker et al., 2002, *supra*).

As duas primeiras colunas da Figura 2A mostram AcrA na ausência e presença de um operão *pgl* funcional. Apenas uma banda surge na ausência, mas três na presença do operão *pgl* funcional (Figura 2A, painel superior). Estes correspondem a AcrA não glicosilada (coluna 1) e AcrA não-, mono- e diglicosilada (coluna 2). O facto de as duas proteínas mais pesadas na coluna 2 serem glicosiladas foi confirmado por transferência Western de R12 (coluna 2, painel inferior). Quando o mutante AcrA-N273Q foi expresso do mesmo modo, apenas o AcrA monoglicosilado foi detectado na presença do operão *pgl* de glicosilação, funcional (coluna 3). O AcrA não glicosilado foi detectado na ausência do locus de *pgl* funcional (coluna 4). A análise do AcrA-D121A mutante produziu apenas duas bandas, uma delas glicosilada (coluna 5) como observado com AcrA-N273Q na coluna 3. Isto significa que o D121 é essencial para uma glicosilação eficiente na posição 123-125.

Exemplo 3 Introdução de locais de glicosilação artificiais em AcrA

Para testar se a introdução de um resíduo de aspartato poderia produzir um local de glicosilação, produziram-se mutantes de AcrA em que o resíduo na posição -2 dos locais de glicosilação não utilizados nas posições N117 e N147 de AcrA solúvel foram trocados por aspartato (F115D, T145D). Em seguida testou-se se os locais de glicosilação modificados poderiam ser glicosilados pelo mesmo ensaio, como descrito no exemplo 2. Ambas as mutações foram individualmente inseridas, quer na sequência do tipo selvagem da versão solúvel de AcrA, quer no mutante duplo em que ambos os locais de glicosilação utilizados foram eliminados (N123Q e N273Q). Prepararam-se extractos de periplasma de culturas induzidas durante 4 horas, separaram-se por SDS-PAGE e analisaram-se por transferência Western (Figura 2B). Como controlos, as amostras de AcrA do tipo selvagem glicosiladas e não glicosiladas foram corridas no mesmo gel (colunas 1 e 2). A mutação T145D afectou a posição -2 da sequência de glicosilação não utilizada nativamente, N147-S149. Por expressão de AcrA-T145D, a transferência Western com anti-soro anti-AcrA resultou em quatro bandas, sendo a maior a que tem mobilidade electroforética mais lenta do que a proteína duplamente glicosilada na coluna 2 (coluna 3 na figura 2B). A transferência de R12 confirmou que a quarta banda era uma AcrA triplamente glicosilada. Apesar da intensidade baixa em direcção a anti-AcrA a banda mais pesada originou o sinal mais forte com o anti-soro R12 específico para a glicosilação. Quando o mesmo mutante AcrA-T145D foi expresso na ausência da sequência de N-glicosilação nativa (AcrA-N123Q-N273Q-T145D), apenas se detectou a AcrA monoglicosilada na presença de um operão *pgl* funcional (Figura 2B, coluna 4), que não estava presente na ausência de um operão *pgl* funcional (coluna 5). Isto demonstra que a banda mais pesada na coluna 4 estava glicosilada. Deste modo, por simples introdução da mutação T145D produziu-se um local de glicosilação optimizado (DFNNS).

Para confirmar também que é possível introduzir um local de glicosilação inserindo um resíduo de aspartato na posição -2, os locais não utilizados nativamente, N117-S119 e

N274-T276, foram trocados para optimizar a N-glicosilação. Para este fim, produziram-se mais mutantes (Figura 2C). A expressão de AcrA-F115D-T145D no sistema acima descrito resultou na detecção de cinco espécies de proteína com o anti-soro anti-AcrA (coluna 2). Isto é indicativo de que ocorrem quatro glicosilações na mesma molécula AcrA. Quando a detecção foi realizada com o anti-soro R12 específico de N-glicano de *C. jejuni*, detectou-se uma escada de cinco bandas. A banda ténue mais inferior é AcrA não glicosilada porque também está presente na ausência de glicosilação (coluna 1), a mais acima resulta num sinal forte provavelmente devido aos cinco determinantes antigénicos num AcrA glicosilado quatro vezes. Desta forma, os dois locais introduzidos (em N117 e N147) e os dois locais nativamente utilizados (N123 e N273) são utilizados e glicosilados pela maquinaria de *pgl*. A expressão de AcrA-N123Q- N273Q-N272D com e sem o operão *pgl* demonstrou que um terceiro local de glicosilação introduzido artificialmente, N274 (DNNST), também era reconhecido pelo operão *pgl* (Figura 2C, colunas 3 e 4).

As experiências acima confirmam que o local de N-glicosilação bacteriano reconhecido pela OTase de *C. jejuni* consiste parcialmente do mesmo consenso que o eucariótico (N - X - S/T, com X≠P) mas, além disso, um aspartato na posição -2 é necessário para aumentar a eficiência. Adicionalmente, elas demonstram que é possível glicosilar uma proteína num local desejado, introduzindo de forma recombinante uma sequência de consenso optimizada.

Exemplo 4 Verificação da posição -1 na sequência de N-glicosilação optimizada

Fez-se outra experiência para testar se a posição -1 no local de glicosilação bacteriano exibe as mesmas restrições que a posição +1 nos eucariotas (Imperiale, B., e 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., and Dwek, R. A. (1997). Glycosylation: heterogeneity and the 3D structure of proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 32, 1-100). Pensa-se que um resíduo de prolina em +1 restringe o péptido de um modo tal que a

glicosilação é inibida. Para testar se um efeito semelhante também podia ser observado na posição -1, introduziu-se um resíduo de prolina na posição do primeiro local nativamente utilizado numa mutação pontual que tinha o segundo local nativo removido (AcrA- N273Q-F122P). A expressão de controlo de AcrA-N273Q mostrou uma proteína monoglicosilada na presença de um operão *pgl* funcional (Figura 2D, coluna 1 e 2). No entanto, a AcrA-N273Q-F122P não era glicosilada (Figura 2D, colunas 3 e 4). Isto indica que a prolina inibiu a N-glicosilação bacteriana quando esta constitui o resíduo entre a asparagina e o resíduo carregado negativamente da posição -2.

Os alinhamentos de sequência de todos os locais conhecidos por serem glicosilados pela maquinaria de *pgl* de *C. jejuni* indicam que todos compreendem um D ou E na posição -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). Deste modo, foi estabelecido que a sequência de consenso de glicosilação para bactérias pode ser optimizada por um aminoácido carregado negativamente na posição -2, resultando em D/E - X - N - Z - S/T, em que X & Z ≠ P.

#### Exemplo 5 N-glicosilação de uma proteína não de *C. jejuni*

Para demonstrar que o requisito de sequência primária (sequência de consenso optimizada) é suficiente para a N-glicosilação em bactérias, testou-se se uma proteína não de *C. jejuni* poderia ser glicosilada aplicando a estratégia acima. Utilizou-se a subunidade de toxina B de cólera (CtxB) como alvo da glicosilação. O gene correspondente foi amplificado a partir de *Vibrio cholerae* de um modo tal que continha a sequência codificante da sequência de sinal de OmpA no terminal N e uma marca hexa-his no terminal-C, exactamente o mesmo que as construções A a C no exemplo 1. O ADN resultante foi clonado para substituir a construção A nos plasmídeos utilizados no exemplo 1. Uma mutação pontual de W88 para D ou uma inserção de D após W88 originou um local de glicosilação optimizado (DNNKT). As proteínas CtxB do tipo selvagem e W88D que contêm a sequência de sinal e a marca his

foram expressas em *E. coli* Top 10 e outros tipos de células, na presença e ausência do locus *pgl* de *C. jejuni* funcional. Quando os extractos periplasmáticos de células Top10 foram analisados por SDS-PAGE, electrotransferência e imunotransferência consecutiva com um anti-soro CtxB, apenas o CtxB W88D produziu uma banda mais elevada e, portanto, glicosilada no fundo do locus *pgl* (Figura 2E, comparar as colunas 3 e 4). Também se inseriu uma sequência de consenso (DSNIT) substituindo G54 ou Q56 de CtxB (a última é designada por CtxB-Q56/DSNIT), i.e. numa das laçadas que foi referido que contribui para a actividade de ligação do gangliósido GM1 a CtxB. As colunas 5 e 6 da Figura 2E demonstram que a proteína manipulada (exemplificada pela construção que contém a sequência de péptido DSNIT em vez de Q56 expressa em células Top10) produziu uma banda de menor mobilidade e portanto glicosilada, em células competentes para a glicosilação, mas não em células deficientes para a glicosilação, quando analisada do mesmo modo que descrito acima. Também se demonstrou que a CtxB que contém duas manipulações, i.e. a inserção de D após W88 bem como DSNIT substituindo Q56, era duplamente glicosilada em células SCM7 (Alaimo et al., EMBO Journal 25: 967-976 (2006)) (painei E, colunas 7 e 8). A proteína duplamente glicosilada CtxB apresentada na coluna 7 foi purificada por afinidade-Ni<sup>2+</sup> e analisada por ESI- MS/MS após tripsinação no gel, de acordo com protocolos convencionais. Os glicopéptidos esperados foram detectados, confirmado que a N-glicosilação bacteriana também pode ser dirigida para uma proteína de não *C. jejuni* por mutação ou inserção da sequência de consenso optimizada de acordo com a invenção, para N-glicosilação bacteriana (não apresentado). Exemplos de outras estirpes de *E. coli* para a prática da presente invenção são W3110, CLM24, BL21 (Stratagene, La Jolla, CA, EUA), SCM6 e SCM7.

A sequência de aminoácido da proteína CtxB utilizada aqui é indicada a seguir (sequência de sinal de OmpA recombinante sublinhada, marca hexa-his em itálico, W88 a negrito):

MKKTAIAIAVALAGFATVAQATPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIFSYTESLAGKREMAIIT  
FKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTLRIAYLTEAKVEKLCV**W**NNKTPHAIAAISMAN  
GSHHHHHH (sequência 5)

Exemplo 6 Introdução de locais de N-glicosilação artificiais na proteína de membrana externa de *C. jejuni*, OmpH1A

A aplicação potencial da N-glicosilação em bactérias é a apresentação do glicano na superfície de uma célula hospedeira bacteriana de modo a ligar o fenótipo ao genótipo, seleccionando desse modo mutações genéticas específicas. Para demonstrar que os N-glicanos podem ser apresentados em proteínas de membrana externa, a proteína OmpH1 foi manipulada de um modo que continha múltiplos locais de consenso optimizados de acordo com a invenção. Os locais foram manipulados em regiões de laçada da proteína, tal como deduzido a partir da estrutura de cristal conhecida (Muller, A., Thomas, G.H., Horler, R., Brannigan, J.A., Blagova, E., Levdikov, V.M., Fogg, M.J., Wilson, K.S., e 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). Experiências anteriores mostraram que as melhores sequências de glicosilação eram produzidas pelas mutações V83T, K59N-G60I- N61T, R190N-G191 I-D192T e H263D-F264S-G265N- D266I-D267T. Para apresentação na superfície, era desejado avaliar diferentes combinações desses locais introduzidos, de modo a estabelecer a amostra mais específica de N-glicano. As combinações foram produzidas numa OmpH1 do tipo selvagem que codifica para a construção de plasmídeo e testadas de um modo semelhante ao descrito para AcrA. A Figura 3 mostra a análise de várias variantes de OmpH1 que incluem múltiplas sequências de glicosilação além da sequência de tipo selvagem existente. Produziram-se variantes de OmpH1 com três (coluna 3, 4, 5 e 7) e quatro sequências de glicosilação (coluna 6). Também se incluíram na experiência uma OmpH1 do tipo selvagem com apenas uma sequência de glicosilação e um mutante que não possui a asparagina crítica para a glicosilação. Todas as variantes testadas aqui não só demonstraram um nível elevado de eficiência de glicosilação, mas também que cada sequência de glicosilação era utilizada. Os resultados foram confirmados com imuno-soro específico de N-glicano de *Campylobacter* (Figura 3 painel inferior).

A seguir apresenta-se a sequência de proteína da proteína OmpH1 de *Campylobacter jejuni* (estirpe 81-176) com uma marca myc ligada, em itálico:

MKKILLSVLTTFVAVVLAACGGNSDSKTLNSLDKIKQNGWRIGVFGDKPPFGYVDEKG  
NNQGYDIALAKRIAKELFGDENKVQFVLEAANRVEFLKSNKVDIILANFTQTPERAEQVDF  
CLPYMKVALGVAVPK**DSNIT**SVEDLKDKTLLNKTTADAYFTQDYPNIKTLKYDQNTETFA  
ALMDKRGDALSHDNTLLFAWVKDHPDFKMGKIELGNKDVIAPAVKKGDDELKEFIDNLIIKL  
GQEQQFFHKAYDETLKAHFGDDVKADDWIEGGKILEQKLISEEDL (sequência 6)

O local de glicosilação nativo na proteína está a negrito, a sequência de sinal está sublinhada.

Exemplo 7: Apresentação na superfície de N-glicanos de *C. jejuni* em OmpH1 na membrana externa de células *E. coli*

De modo a responder à questão de múltiplas variantes de OmpH1 glicosiladas poderem ser apresentadas na superfície de células bacterianas, utilizou-se imunofluorescência em células CLM24 ou SCM6 bacterianas (que é SCM7  $\Delta$ waal) que expressam várias variantes de OmpH1. Incluiu-se na experiência uma OmpH1 do tipo selvagem e um mutante que não possui a asparagina crítica para glicosilação. Adicionalmente, construiu-se um mutante C20S de modo a reter a proteína no periplasma, servindo assim como um controlo na experiência. A imunocoloração foi realizada nas células tratadas com paraformaldeído. O paraformaldeído fixa as células sem destruir a estrutura celular ou compartimentação. Os imuno-soros específicos de c-Myc e N-glicano em combinação com anticorpos secundários correspondentes conjugados com FITC e Cy3 foram utilizados para detectar a proteína (fluorescência vermelha) e N-glicano (verde) na superfície celular bacteriana, respectivamente. Adicionalmente, utilizou-se 4,6-diamino-2-fenilindolo (DAPI, azul) para corar o ADN bacteriano, para diferenciar de forma inequívoca entre células bacterianas e restos celulares. Quando as células que expressam OmpH1 do tipo selvagem foram coradas, a imunofluorescência específica para a proteína bem como o N-glicano foram detectados (Figura 4 A). Quando um mutante que não possui a asparagina crítica N139S foi corado com ambos, imuno-soro específico anti-Myc e N-glicano, apenas se obteve a proteína, mas não sinais específicos de glicano (painele 4B),

indicando especificidade do soro imune específico de N-glicano. Quando a proteína foi retida no periplasma, como no mutante C20S, não foi detectada imunofluorescência vermelha, específica da proteína, indicando que os anticorpos não eram capazes de se difundir na célula e eram suficientemente competentes para detectar qualquer fenómeno de superfície (painel 4 C). Em seguida, as células que expressam várias variantes de OmpH1 diferentes na glicosilação foram coradas: OmpH1 <sup>KGN->NIT, HFGDD->DSNIT</sup> (painel 4D), OmpH1 <sup>RGD->NIT, HFGDD->DSNIT</sup> (painel 4E), OmpH1 <sup>KGN->NIT, RGD->NIT</sup> (painel 4F), OmpH1<sup>V83T, KGN->NIT</sup> (painel 4G) e OmpH1 <sup>KGN->NIT, RGD->NIT, HFGDD->DSNIT</sup> (painel 4H). Todas as variantes de OmpH1 foram duplamente coradas, indicando a presença de proteína glicosilada na superfície bacteriana. A Figura 4 é representada numa escala de cinzentos, sendo a primeira coluna uma figura conjunta das outras figuras da mesma linha.

Lisboa, 2010-12-28

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir proteínas glicosiladas ligadas a N, compreendendo:

- a) proporcionar ácidos nucleicos que codificam para pelo menos uma proteína alvo recombinante,
- b) inserir ácidos nucleicos que codificam para uma ou mais das seguintes sequências de consenso de aminoácidos optimizadas, N-glicosiladas:

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

em que X e Z podem ser qualquer aminoácido natural, excepto Pro, nos referidos ácidos nucleicos de a),

- c) proporcionar um organismo recombinante, de preferência um organismo procariótico, compreendendo ácidos nucleicos que codificam para
  - (i) um operão *pgl* funcional de *Campylobacter* spp., de preferência *C. jejuni* e
  - (ii) pelo menos uma proteína alvo recombinante codificada pelos ácidos nucleicos resultantes do passo b),
- d) cultivar o organismo recombinante de um modo adequado para a produção e N-glicosilação da(s) proteína(s) alvo.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que os ácidos nucleicos que codificam para pelo menos uma proteína alvo recombinante de acordo com c) (ii) codificam para pelo menos 2 das referidas sequências de consenso de aminoácidos optimizadas, N-glicosiladas.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, em que os ácidos nucleicos que codificam para pelo menos uma proteína alvo recombinante de acordo com c) (ii) codificam para pelo menos 3 das referidas sequências de consenso de aminoácidos optimizadas, N-glicosiladas.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, em que os ácidos nucleicos que codificam para pelo menos uma proteína alvo recombinante de acordo com c) (ii) codificam para pelo menos 5 das referidas sequências de consenso de aminoácidos optimizadas, N-glicosiladas.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que a(s) proteína(s) alvo N-glicosilada(s) produzida(s) compreende(m) um ou mais N-glicanos seleccionados do grupo de N-glicanos de *Campylobacter* spp, os N-glicanos derivados de oligo- e polissacáridos transferidos para o antigénio O, formando polissacárido O em bactérias Gram-negativas, ou polissacáridos capsulares de bactérias Gram-positivas.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, em que a bactéria Gram-negativa é *P. aeruginosa*; *E.coli* 07, 09, 016, 0157 ou *Shigella dysenteriae* 01.

7. Método de acordo com a reivindicação 5 ou a reivindicação 6, em que a *Campylobacter* spp. é *C. jejuni*.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que a(s) proteína(s) alvo N-glicosilada(s) produzida(s) compreende(m) dois ou mais N-glicanos diferentes.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que a(s) proteína(s) alvo N-glicosilada(s) produzida(s) é(são) derivada(s) de proteínas de mamífero, bactérias, vírus, fungos ou plantas.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que os ácidos nucleicos que codificam para pelo menos uma proteína alvo recombinante de acordo com c) (ii) da reivindicação 1 codificam também para pelo menos uma sequência polipeptídica capaz de direccionar a referida proteína recombinante para a membrana externa de uma bactéria Gram-negativa.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, em que a sequência polipeptídica direccionadora codificada é seleccionada do grupo constituído por péptidos de sinal do tipo II, ou proteínas de membrana externa.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, em que o péptido de sinal de tipo II ou proteína de membrana externa é seleccionado do grupo constituído pela proteína de comprimento total, ou os péptidos de sinal de OmpH1 de *C. jejuni*, JIpA de

*C. jejuni*, proteínas de membrana externa de *E. coli*, OmpA e a proteína lnp de *Pseudomonas aeruginosa*.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, em que a proteína de membrana externa de *E. coli* é seleccionada de OmpS, OmpC, OmpA, OprF, PhoE, LamB e Lpp.

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, em que o organismo recombinante é seleccionado do grupo de bactérias constituído por *Escherichia* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Helicobacter* spp., *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp.

15. Método de acordo com a reivindicação 14, em que o organismo recombinante é *Escherichia coli*.

16. Método de acordo com a reivindicação 15, em que o organismo recombinante é seleccionado de entre *E. coli* estirpes Top10, W3110, CLM24, BL21, SCM26 e SCM7.

17. Método de acordo com a reivindicação 14, em que o organismo recombinante é seleccionado de entre *S. enterica* estirpes SL3261, SL3749 e SL3261 $\Delta$ waaL.

18. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, em que o referido organismo recombinante é uma bactéria Gram-negativa recombinante com:

- i) um genótipo que compreende sequências de nucleótidos que codificam para
  - a) pelo menos uma glicosiltransferase específica, natural ou recombinante, para montagem de um oligossacárido num transportador lipídico,
  - b) pelo menos uma oligosacariltransferase (OTase) natural ou recombinante de *Campylobacter* spp., de preferência *C. jejuni*,
  - c) pelo menos uma proteína recombinante resultante do passo b) da reivindicação 1,
- ii) um fenótipo compreendendo a proteína N-glicosilada recombinante produzida, que está localizada na, e/ou sobre a, membrana externa da bactéria Gram-negativa.

19. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, em que o operão *pgl* funcional de *Campylobacter* spp., de preferência *C. jejuni*, compreende ácidos nucleicos que codificam para

- i) Otase recombinante de *Campylobacter* spp., e
- ii) glicosiltransferases específicas, recombinantes e/ou naturais, de *Campylobacter* spp. e/ou
- iii) glicosiltransferases específicas, recombinantes e/ou naturais, de espécies que não *Campylobacter* spp., para montagem de um oligossacárido num transportador lipídico a ser transferido para a proteína alvo pela Otase.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, em que a Otase recombinante e as glicosiltransferases específicas, recombinantes e/ou naturais, são de *C. jejuni*.

21. Método para preparar uma bactéria Gram-negativa recombinante tendo:

- i) um genótipo que compreende sequências de nucleótido que codificam para
  - a) pelo menos uma glicosiltransferase específica, natural ou recombinante, para montagem de um oligossacárido num transportador lipídico,
  - b) pelo menos uma oligossacariltransferase (OTase), natural ou recombinante, de *Campylobacter* spp., de preferência *C. jejuni*,
  - c) pelo menos uma proteína alvo recombinante compreendendo uma ou mais das seguintes sequências de consenso de aminoácidos optimizadas, N-glicosiladas:

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

em que X e Z podem ser qualquer aminoácido natural excepto Pro, e

- ii) um fenótipo compreendendo a proteína alvo N-glicosilada recombinante produzida, que está localizada na, e/ou sobre a, membrana externa da bactéria Gram-negativa;

em que o referido método compreende os passos de:

- A) proporcionar ácidos nucleicos que codificam para pelo menos uma proteína alvo recombinante,

- B) inserir ácidos nucleicos que codificam para uma ou mais das seguintes sequências de consenso de aminoácidos optimizadas, N-glicosiladas:

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

em que X e Z podem ser qualquer aminoácido natural, excepto Pro, nos referidos ácidos nucleicos de A),

- C) proporcionar uma bactéria Gram-negativa,
- D) introduzir na referida bactéria pelo menos uma sequência de nucleótidos que codifica para
- a) pelo menos uma glicosiltransferase específica recombinante, para montagem de um oligossacárido num transportador lipídico, e/ou
  - b) pelo menos uma oligossacariltransferase (OTase) recombinante de *Campylobacter* spp., e
  - c) pelo menos uma proteína alvo recombinante codificada pelos ácidos nucleicos resultantes do passo B) e
- E) cultivar a referida bactéria até pelo menos uma proteína N-glicosilada recombinante codificada pela sequência de nucleótidos do passo D) estar localizada na, e/ou sobre a, membrana externa da bactéria Gram-negativa.

22. Método de acordo com a reivindicação 21, em que pelo menos uma oligossacariltransferase (Otase) natural ou recombinante no passo i) b) e a pelo menos uma oligossacariltransferase (OTase) recombinante no passo D) b) é de *C. jejuni*.

23. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 22, em que a bactéria Gram-negativa recombinante é seleccionada do grupo constituído por *Escherichia* spp., *Campylobacter* spp., *Shigella* spp., *Helicobacter* spp., *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp.

24. Método de acordo com a reivindicação 23, em que o organismo Gram-negativo recombinante é *Escherichia coli*.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, em que o organismo Gram-negativo recombinante é seleccionado de entre *E. coli* estirpes Top10, W3110, CLM24, BL21, SCM26 e SCM7.

26. Método de acordo com a reivindicação 23, em que o organismo Gram-negativo recombinante é seleccionado de entre *S. enterica* estirpes SL3261, SL3749 e SL3261ΔwaaL.

27. Organismo procariótico no qual se introduz informação genética compreendendo ácidos nucleicos que codificam para:

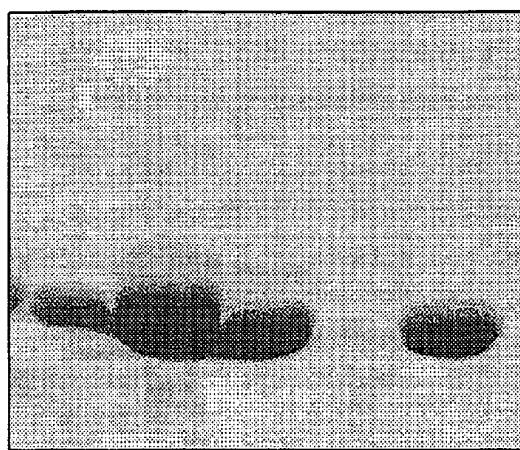
- a) glicosiltransferases de um tipo que monta um oligossacárido num transportador lipídico;
- b) pelo menos uma proteína alvo recombinante derivada de uma proteína subjacente por inserção recombinante de pelo menos uma sequência de consenso D-X-N-Z-S/T, em que X e Z podem ser qualquer aminoácido excepto Pro, na proteína subjacente; e
- c) uma oligossacariltransferase de *Campylobacter* spp.; em que a referida oligossacariltransferase liga o referido oligossacárido à referida sequência de consenso das referidas uma ou mais proteínas alvo recombinantes.

28. Organismo procariótico de acordo com a reivindicação 27, em que a *Campylobacter* spp. é *C. jejuni*.

Lisboa, 2010-12-28

**Fig. 1**

1      2      3      4



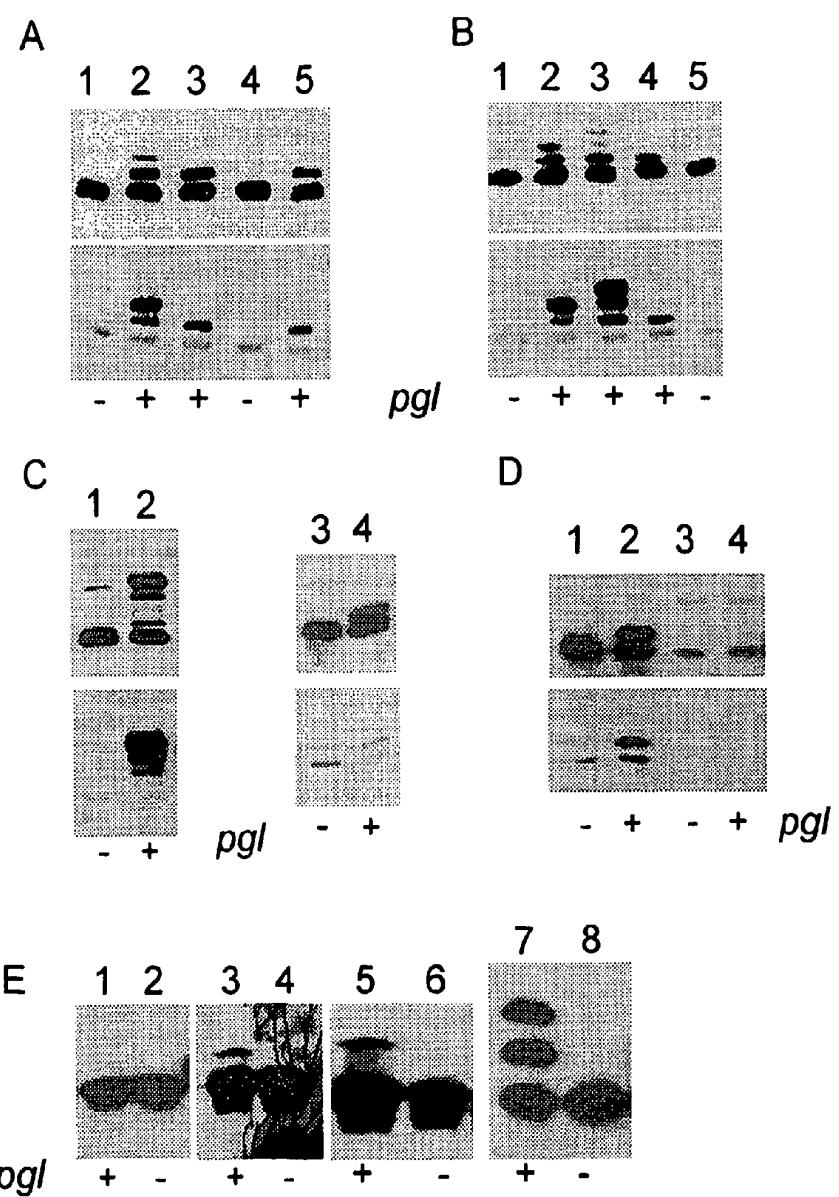
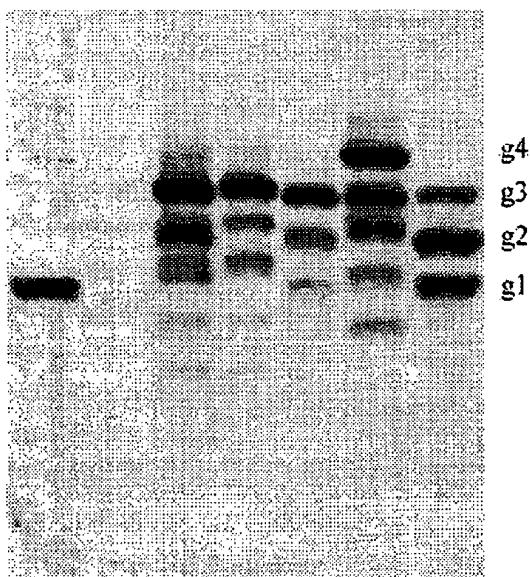
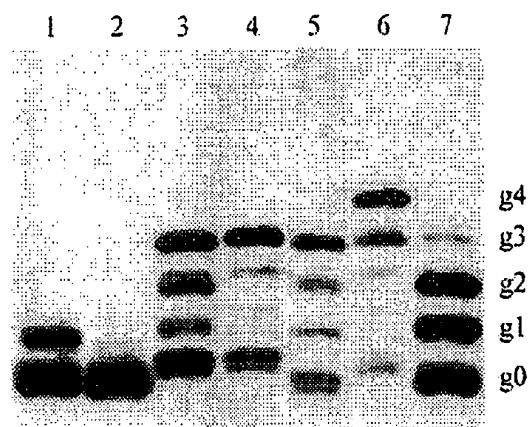
**Fig. 2**

Fig 3



**Fig. 4**