

NUEVO POLISACÁRIDO Y USOS DEL MISMO

CAMPO DE LA INVENCION

Descritas en la presente están las estructuras del antígeno O25B de *E. coli*, así como también usos de O25B, métodos de elaboración de O25B, y bioconjugados que comprenden O25B. Los solicitantes han identificado el grupo de genes de *E. coli* responsables de la producción de O25B y han caracterizado completamente la estructura del antígeno O25B. Por consiguiente, proporcionados en la presente está ácidos nucleicos capaces de producir O25B en las células hospederas. También proporcionadas en la presente están células hospederas, por ejemplo, células hospederas recombinantemente diseñadas por ingeniería genética, que comprenden ácidos nucleicos capaces de producción de O25B. Tales células hospederas pueden ser usadas para generar bioconjugados que comprenden O25B ligadas a una proteína portadora, la cual puede ser usada en, por ejemplo, la formulación de terapéuticos (por ejemplo, vacunas). El antígeno O25B descrito en la presente también es útil en la generación de anticuerpos, los cuales pueden ser usados, por ejemplo, en métodos terapéuticos tales como inmunización pasiva de sujetos. Proporcionadas en la presente, además, están composiciones que comprenden O25B, solo o en combinación con otros antígenos de *E. coli* (por ejemplo, O1, O2, y O6 y subserotipos de los mismos), para uso en métodos terapéuticos, por ejemplo, vacunación de hospederos contra la infección con *E. coli* (por ejemplo, *E. coli* patogénico extra-intestinal, tal como uropatogénico).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El *E. coli* patogénico extra-intestinal (ExPEC, por sus siglas en inglés) causa una amplia variedad de infecciones que son responsables de la morbilidad, mortalidad, y costos significantes anualmente. Las infecciones del tracto urinario están entre las condiciones más frecuentes causadas por ExPEC en seres humanos. Sin embargo, condiciones que amenazan la vida, tales como meningitis y sepsis, también son causadas por ExPEC.

La resistencia bacteriana a antibióticos es un problema mayor en la lucha contra la infección bacteriana, y cepas de *E. coli* resistentes a fármacos múltiples (MDR, por sus siglas en inglés), están llegando a ser más y más prevalentes. Schito et al, 2009, Int. J. Antimicrob. Agents 34(5):407-413; y Pitout et al, 2012, Expert Rev. Anti. Infect. Ther. 10(10): 1165-1176. De este modo, el desarrollo de vacunas eficientes contra ExPEC es necesario.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un aspecto, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica que comprende ácidos nucleicos que codifican enzimas (por ejemplo, glicosiltransferasas) capaces de producir el nuevo polisacárido descrito en la presente, O25B de *E. coli*. También se proporcionan en la presente células hospederas que comprenden ácidos nucleicos que codifican enzimas (por ejemplo, glicosiltransferasas) capaces de producir otros antígenos de *E. coli*, por ejemplo, O25A, O1, O2 y O6, y subserotipos de los mismos. Las células hospederas proporcionadas en la presente pueden expresar naturalmente ácidos nucleicos específicos para la producción de un antígeno O de interés, o las células hospederas pueden ser elaboradas para expresar tales ácidos nucleicos, es decir, en ciertas modalidades tales ácidos nucleicos son heterólogos a las células hospederas. En ciertas modalidades, las células hospederas proporcionadas en la presente comprenden ácidos nucleicos que codifican enzimas adicionales activas en la N-glicosilación de proteínas, por ejemplo, la célula hospedera proporcionada en la presente puede comprender adicionalmente un ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa o ácidos nucleicos que codifican otras glicosiltransferasas. En ciertas modalidades, las células hospederas proporcionadas en la presente comprenden un ácido nucleico que codifica una proteína portadora, por ejemplo, una proteína a la cual oligosacáridos y/o polisacáridos pueden estar unidos para formar un bioconjugado. En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*. Véase Sección 5.3.

En una modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica que comprende un grupo de genes *rfb* de *E. coli* (upec138) (SEQ ID NO:12), o un grupo de genes que es aproximadamente o al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a un grupo de genes *rfb* de *E. coli* (upec138) (SEQ ID NO:12). En una modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En una modalidad específica, la

célula hospedera es *E. coli*.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica que comprende un grupo de genes *rfb* de *E. coli* (upec163), o un grupo de genes que es aproximadamente o al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a un grupo de genes *rfb* de *E. coli* (upec163). En una modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica que comprende un grupo de genes *rfb* de *E. coli* (upec177), o un grupo de genes que es aproximadamente o al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a un grupo de genes *rfb* de *E. coli* (upec177). En una modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica recombinantemente por ingeniería genética para comprender (por ejemplo, por introducción de uno o más vectores/plásmidos en la célula hospedera) uno, dos, tres, cuatro, o más de los siguientes genes (o un ácido nucleico que es aproximadamente o al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a uno de los siguientes genes): *rmlB* (SEQ ID NO:1), *rmlD* (SEQ ID NO:2), *rmlA* (SEQ ID NO:3), *rmlC* (SEQ ID NO:4), *wzx* (SEQ ID NO:5), *wekA* (SEQ ID NO:6), *wekB* (SEQ ID NO:7), *wzy* (SEQ

ID NO:8), *wbbJ* (SEQ ID NO:9), *wbbK* (SEQ ID NO:10), y/o *wbbL* (SEQ ID NO:11). En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa (por ejemplo, una oligosacariltransferasa heteróloga). En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica recombinantemente por ingeniería genética para comprender (por ejemplo, por introducción de uno o más vectores/plásmidos en la célula hospedera) uno, dos, tres, cuatro, o más de los siguientes (i) dTDP-Glucosa 4,6-deshidratasa; (ii) dTDP-6-Desoxi-D-glucosa 3,5-epimerasa; (iii) Glucosa-1-fosfato timidililtransferasa; (iv) dTDP-4-deshidroramnosa 3,5-epimerasa; (v) antígeno O de flipasa; (vi) dTDP-Rha:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP α -1,3-ramnosiltransferasa; (vii) UDP-Glc:Rha-GlcNAc-UPP α -1,3- glucosiltransferasa; (viii) antígeno O de polimerasa; (ix) O-acetil transferasa; (x) UDP-Glc:Rha-GlcNAc-UPP α -1,3- glucosiltransferasa; y/o (xi) dTDP-Rha:GlcNAc-UPP α -1,3-ramnosiltransferasa. En una modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa (por ejemplo, una oligosacariltransferasa heteróloga). En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

En ciertas modalidades, las células hospederas procarióticas proporcionadas en la presente comprenden una supresión o inactivación funcional de uno o más genes. Véase Sección 5.3.1. En una modalidad específica, uno o más grupo de gen *waaL*, gen *gtrA*, gen *gtrB*, gen *gtrS*, o gen *rfb* (o un gen o genes

en el grupo *rfb*) es suprimido o funcionalmente inactivado a partir del genoma de una célula hospedera procariótica proporcionada en la presente.

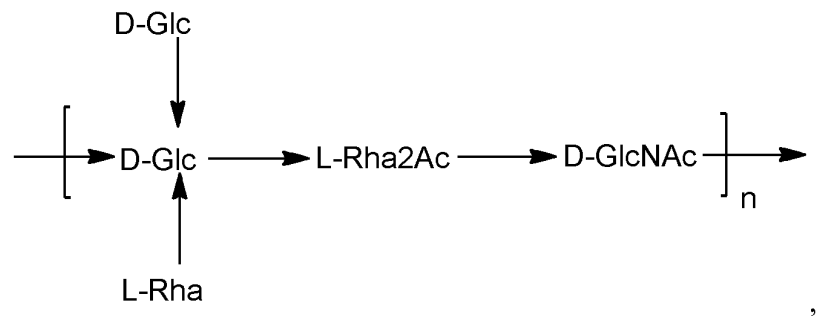
Las proteínas portadoras expresadas por las células hospederas procarióticas proporcionadas en la presente pueden ser seleccionadas a partir de cualquiera de las proteínas portadoras conocidas por aquellos de habilidad en la técnica, por ejemplo, Exotoxina A destoxificada de *P. aeruginosa* (EPA; véase, por ejemplo, Ihssen, *et al.*, (2010) Microbial cell factories 9, 61), CRM 197, proteína de unión a maltosa (MBP), Difteria toxoide, Tétanos toxoide, hemolisina A destoxificada de *S. aureus*, factor de aglutinación A, factor de aglutinación B, FimH de *E. coli*, FimHC de *E. coli*, enterotoxina lábil al calor de *E. coli*, variantes destoxificadas de enterotoxina lábil al calor de *E. coli*, subunidad B de toxina del cólera (CTB), toxina del cólera, variantes destoxificadas de toxina del cólera, proteína Sat de *E. coli*, el dominio pasajero de la proteína Sat de *E. coli*, Neumolisina de *Streptococcus pneumoniae* y variantes destoxificadas de los mismos, AcrA de *C. jejuni*, y glicoproteínas naturales de *C. jejuni*. En una modalidad específica, la proteína portadora expresada por una célula hospedera procariótica proporcionada en la presente es exotoxina de *Pseudomonas* destoxificada (EPA). En ciertas modalidades, la proteína portadora de una célula hospedera proporcionada en la presente comprende una secuencia señal para tratar la proteína portadora en el espacio periplásmico de la célula hospedera. En una modalidad específica, la secuencia señal es de DsbA de *E. coli*, porina A de membrana externa de *E. coli* (OmpA), proteína de unión a maltosa de *E. coli* (MalE), pectato liasa de *Erwinia carotovora* (PelB), FlgI, Nika, o endoxilanasas de *Bacillus sp.* (XynA), enterotoxina de *E. coli* lábil al calor LTIIb, endoxilanasas de *Bacillus* XynA, o flagelina de *E. coli* (FlgI). En ciertas modalidades, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína portadora expresada por las células hospederas proporcionadas en la presente ha sido diseñada por ingeniería (por ejemplo, mediante técnicas recombinantes) para codificar una o más de la secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); y/o la secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En ciertas modalidades, las proteínas portadoras expresadas por las células hospederas proporcionadas en la presente comprenden dos, tres, cuatro, cinco o más de tales secuencias consenso. Véase Sección 5.3.2.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un método para producir una proteína portadora N-glicosilada (también referida en la presente

como un bioconjugado) que comprende una proteína portadora (por ejemplo, EPA) N-ligada a un antígeno O de *E. coli* (por ejemplo, O25B de *E. coli*), tal método comprende cultivar una célula hospedera descrita en la presente bajo condiciones adecuadas para la producción de proteínas, y purificar la proteína portadora N-glicosilada. Los métodos para producir proteínas usando células hospederas, por ejemplo, *E. coli*, y aislar proteínas producidas por células hospederas, son bien conocidos en la técnica. Véase Sección 5.3.

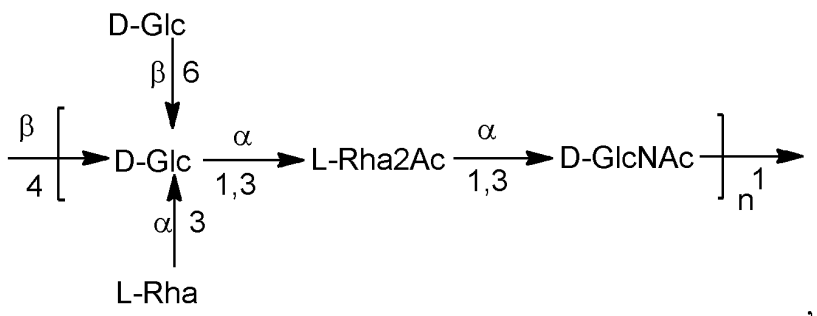
En otro aspecto, proporcionados en la presente están bioconjugados producidos por las células hospederas proporcionadas en la presente. En una modalidad específica, se proporciona en la presente un bioconjugado que comprende una proteína portadora (por ejemplo, EPA) N-ligado a O25B de *E. coli*. Véase Sección 5.4.

En una modalidad específica, se proporciona en la presente un bioconjugado que comprende una proteína portadora (por ejemplo, EPA) ligada a un compuesto de Fórmula O25B, presentada abajo:



en donde n es un entero entre 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 10 a 30, 15 a 30, 20 a 30, 25 a 30, 5 a 25, 10 a 25, 15 a 25, 20 a 25, 10 a 20, o 15 a 20. En una modalidad específica, la proteína portadora está N-ligada al antígeno O de la Fórmula O25B.

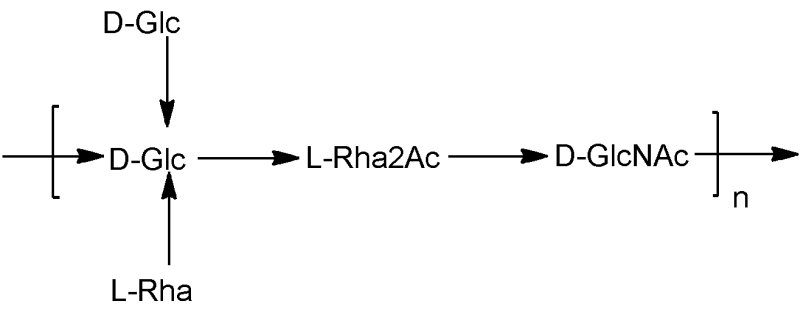
En otra modalidad específica, se proporciona en la presente un bioconjugado que comprende una proteína portadora (por ejemplo, EPA) ligada a un compuesto de Fórmula O25B', presentada abajo:



en donde n es un entero entre 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 10 a 30, 15 a 30, 20 a 30, 25 a 30, 5 a 25, 10 a 25, 15 a 25, 20 a 25, 10 a 20, o 15 a 20. En una modalidad específica, la proteína portadora está N-ligada al antígeno O de la Fórmula O25B'.

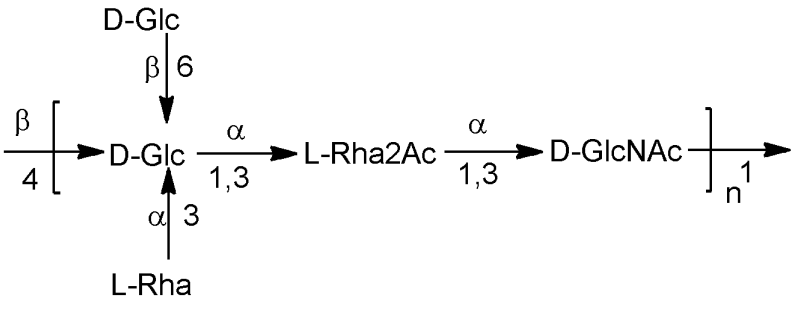
En otro aspecto, se proporciona en la presente un antígeno O aislado a partir de una cepa de *E. coli* ExPEC, en donde tal cepa produce O25B. En otra modalidad específica, se proporciona en la presente un antígeno O aislado a partir de la cepa de *E. coli* upec138. En una modalidad específica, se proporciona en la presente un antígeno O aislado a partir de la cepa de *E. coli* upec163. En otra modalidad específica, se proporciona en la presente un antígeno O aislado a partir de la cepa de *E. coli* upec177. Véase Sección 5.2.

En otro aspecto, se proporciona en la presente una población de macromoléculas aisladas de la Fórmula O25B, presentada abajo:



en donde n es un entero entre 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 10 a 30, 15 a 30, 20 a 30, 25 a 30, 5 a 25, 10 a 25, 15 a 25, 20 a 25, 10 a 20, o 15 a 20. En una modalidad específica, n de al menos 80% de las macromoléculas en la población es entre 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 10 a 30, 15 a 30, 20 a 30, 25 a 30, 5 a 25, 10 a 25, 15 a 25, 20 a 25, 10 a 20, o 15 a 20.

En otro aspecto, se proporciona en la presente una población de macromoléculas aisladas de la Fórmula O25B', presentada abajo:



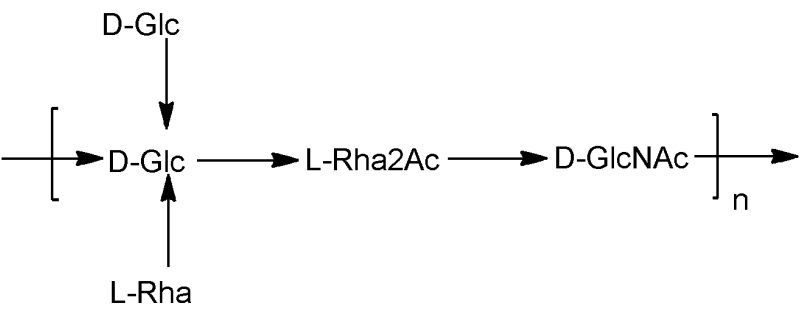
en donde n es un entero entre 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 10 a 30, 15 a 30, 20 a 30, 25 a 30, 5 a 25, 10 a 25, 15 a 25, 20 a 25, 10 a 20, o 15 a 20.

20. En una modalidad específica, n de al menos 80% de las macromoléculas en la población es entre 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 10 a 30, 15 a 30, 20 a 30, 25 a 30, 5 a 25, 10 a 25, 15 a 25, 20 a 25, 10 a 20, o 15 a 20.

En otro aspecto, proporcionados en la presente están métodos para generar anticuerpos anti-O25B usando O25B y/o un bioconjugado que comprende O25B. Además, proporcionados en la presente están anticuerpos producidos de conformidad con tales métodos. Véase Sección 5.5.

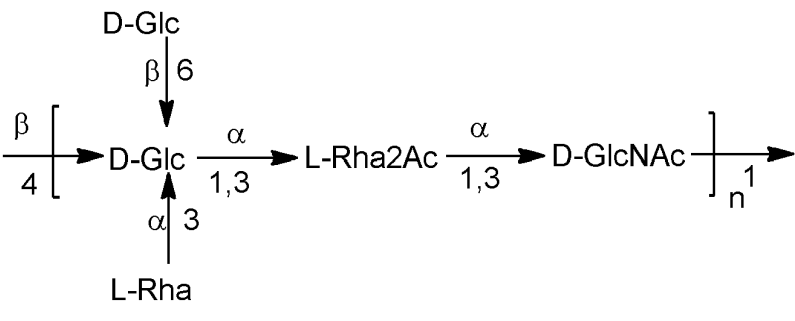
En otro aspecto, proporcionadas en la presente están composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, que comprenden los bioconjugados proporcionados en la presente y/o las macromoléculas (o poblaciones de los mismos) proporcionadas en la presente. Véase Sección 5.6.

En una modalidad específica, se proporciona en la presente una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende una macromolécula que comprende una estructura de Fórmula O25B:



en donde n es un entero entre 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 10 a 30, 15 a 30, 20 a 30, 25 a 30, 5 a 25, 10 a 25, 15 a 25, 20 a 25, 10 a 20, o 15 a 20.

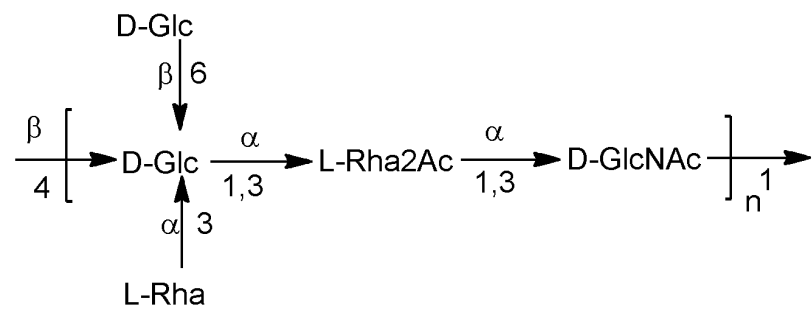
En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende una macromolécula que comprende una estructura de Fórmula O25B':



en donde n es un entero entre 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 10 a 30, 15 a 30, 20 a 30, 25 a 30, 5 a 25, 10 a 25, 15 a 25, 20 a 25, 10 a 20, o 15 a 20.

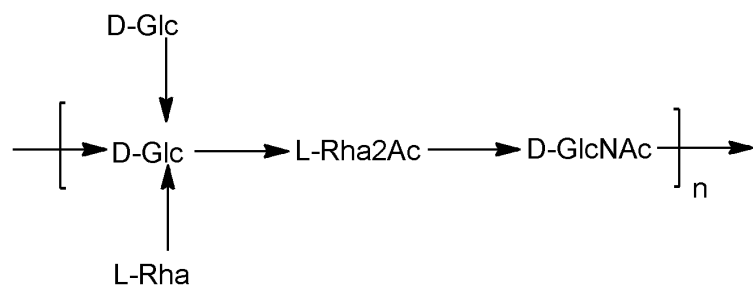
20.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende un bioconjugado descrito en la presente, en donde tal bioconjugado comprende una proteína portadora (por ejemplo, EPA) ligada a un compuesto de Fórmula O25B, presentada abajo:



en donde n es un entero entre 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 10 a 30, 15 a 30, 20 a 30, 25 a 30, 5 a 25, 10 a 25, 15 a 25, 20 a 25, 10 a 20, o 15 a 20. En una modalidad específica, la proteína portadora está N-ligada al antígeno O de la Fórmula O25B'.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende un bioconjugado descrito en la presente, en donde tal bioconjugado comprende una proteína portadora (por ejemplo, EPA) ligada a un compuesto de Fórmula O25B', presentada abajo:

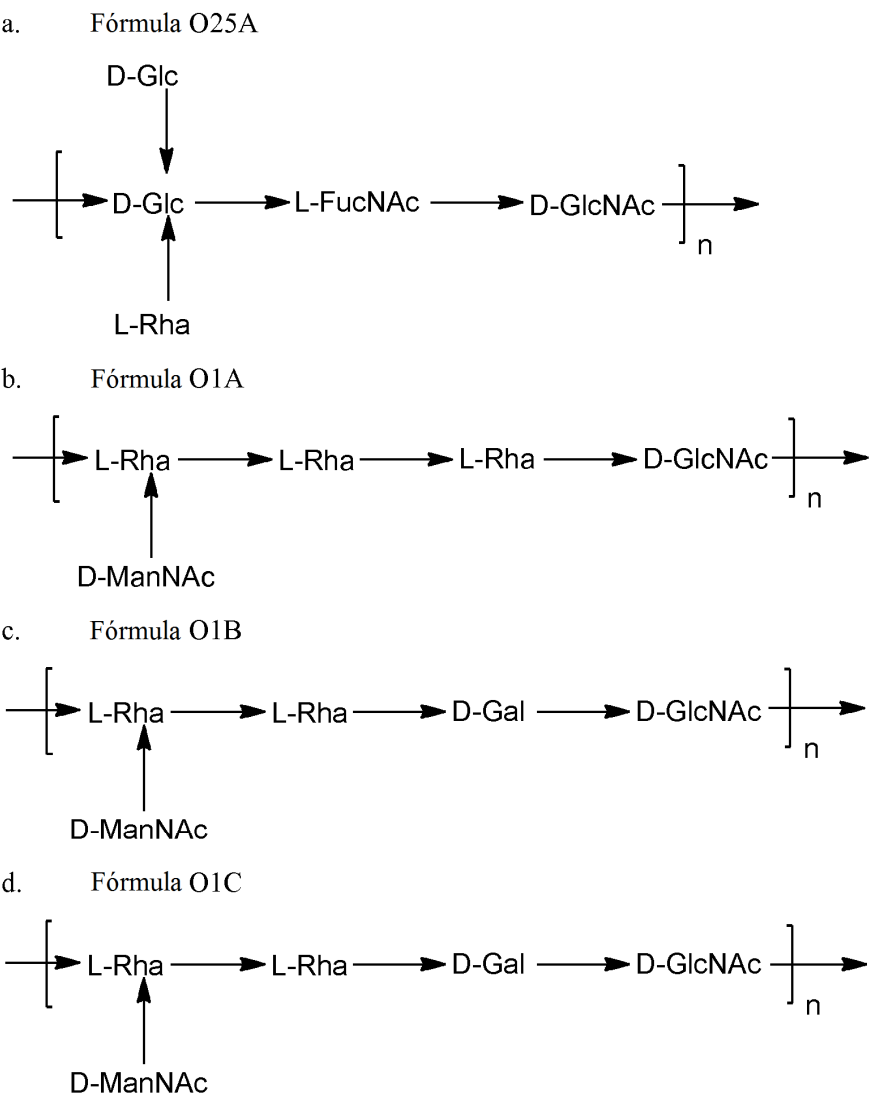


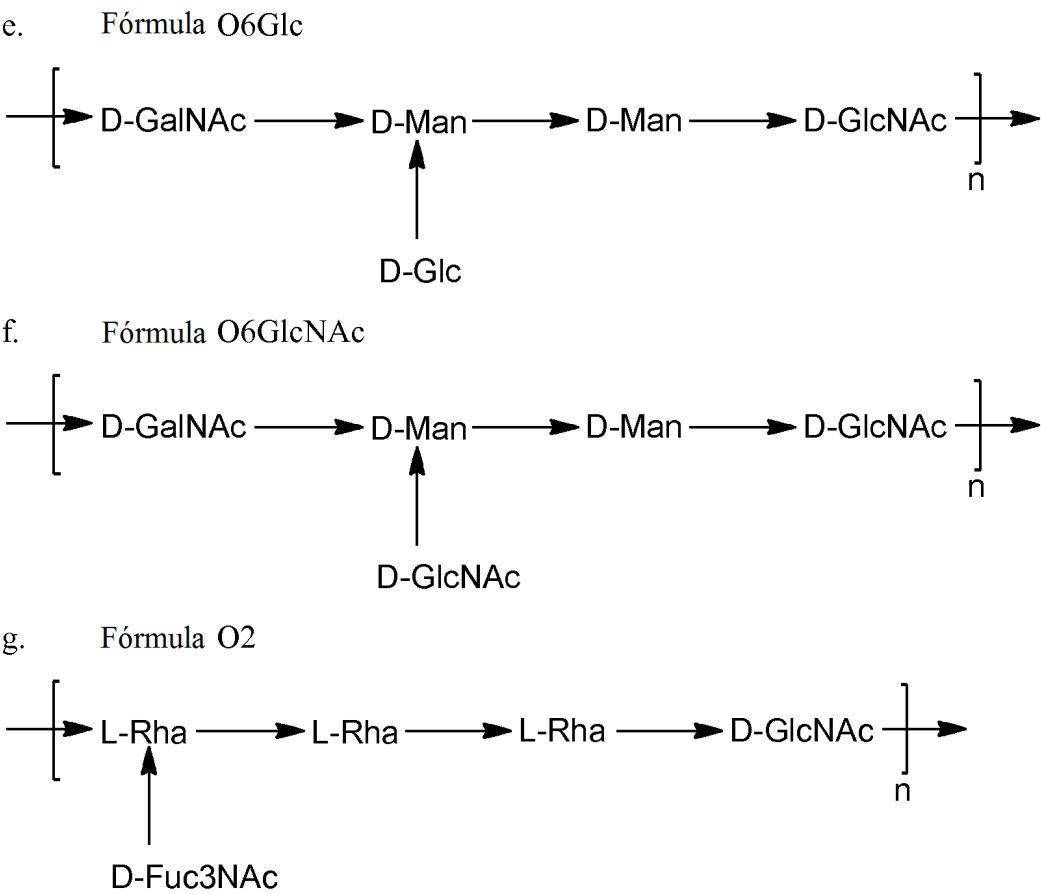
en donde n es un entero entre 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 10 a 30, 15 a 30, 20 a 30, 25 a 30, 5 a 25, 10 a 25, 15 a 25, 20 a 25, 10 a 20, o 15 a 20. En una modalidad específica, la proteína portadora está N-ligada al antígeno O de la Fórmula O25B'.

En ciertas modalidades, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente comprenden uno o más antígenos O de *E. coli* adicionales, en donde tales antígenos no son O25B (por ejemplo, la fórmula O25B

o la fórmula O25B'), por ejemplo, antígenos O de *E. coli* (por ejemplo, ExPEC) distintos de aquellos de un O25B de serotipo de *E. coli*, y/o uno o más bioconjugados que comprenden una proteína portadora ligada a un antígeno O de *E. coli*, en donde tal antígeno no es O25B (por ejemplo, la fórmula O25B o la fórmula O25B'). Tales composiciones pueden comprender una o más macromoléculas adicionales que comprenden un antígeno O de ExPEC y/o uno o más bioconjugados adicionales, por ejemplo, una macromolécula de O1A, O2, y/o O6 y/o un bioconjugado O1A, O2, y/o O6.

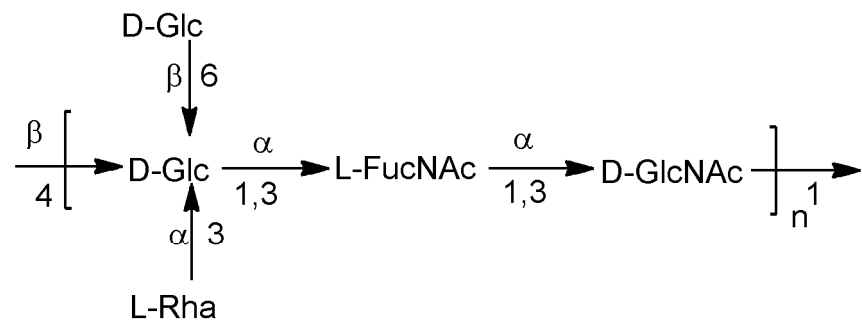
En una modalidad específica, se proporciona en la presente una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende una o más macromoléculas adicionales que comprenden un antígeno O de ExPEC y/o uno o más bioconjugados adicionales, además de una macromolécula de O25B (por ejemplo, una macromolécula que comprende la fórmula O25B o la fórmula O25B') y/o un bioconjugado de O25B (por ejemplo, un bioconjugado que comprende una proteína portadora ligada a la fórmula O25B o la fórmula O25B'), en donde tales macromoléculas adicionales comprenden una estructura seleccionada a partir del grupo que consiste de:



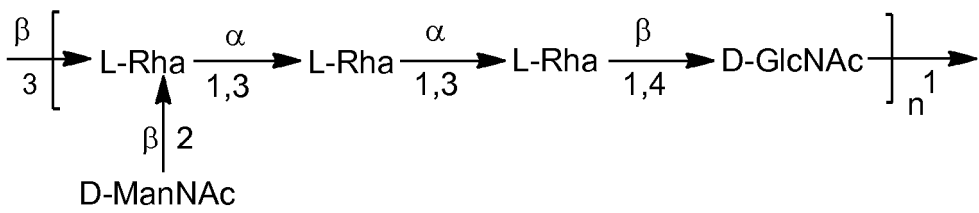


En una modalidad específica, se proporciona en la presente una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o siete macromoléculas o bioconjugados que comprenden tales macromoléculas, además de una macromolécula de O25B (por ejemplo, una macromolécula que comprende la fórmula O25B o la fórmula O25B') y/o un bioconjugado de O25B (por ejemplo, un bioconjugado que comprende una proteína portadora ligada a la fórmula O25B o la fórmula O25B'), en donde tales macromoléculas adicionales comprenden una estructura seleccionada a partir del grupo que consiste de:

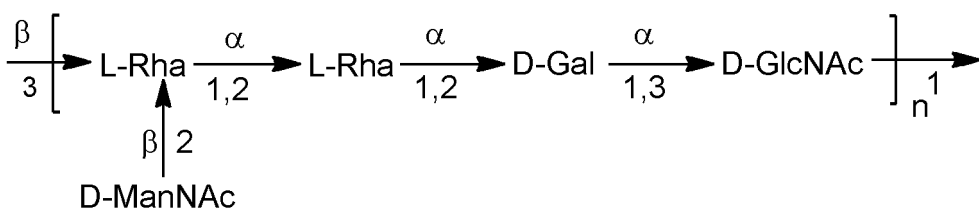
a. Fórmula O25A'



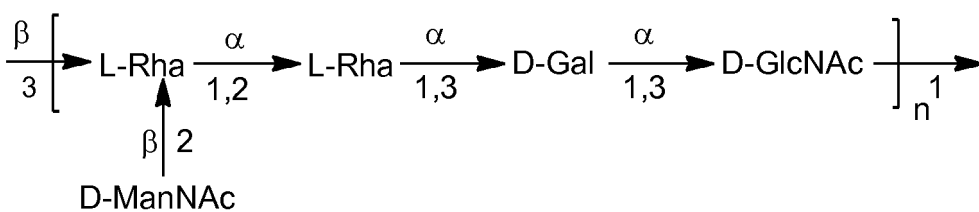
b. Fórmula O1A'



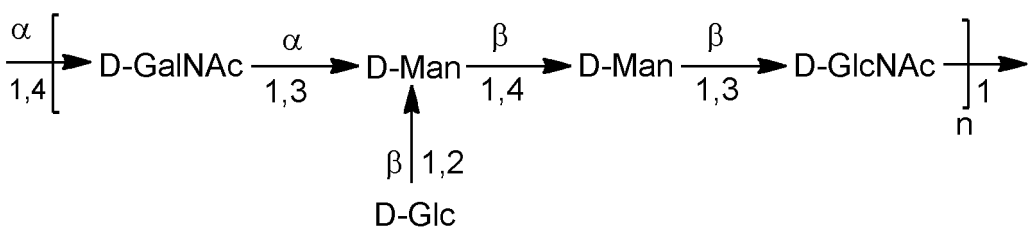
c. Fórmula O1B'



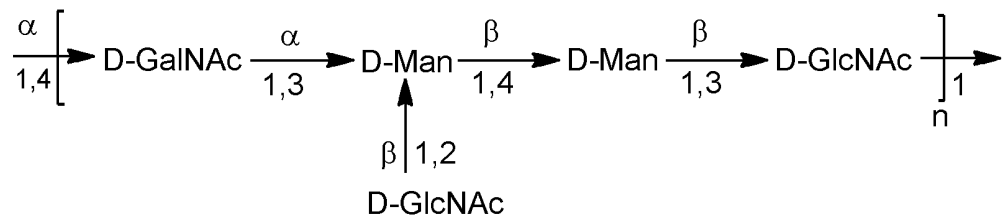
d. Fórmula O1C'



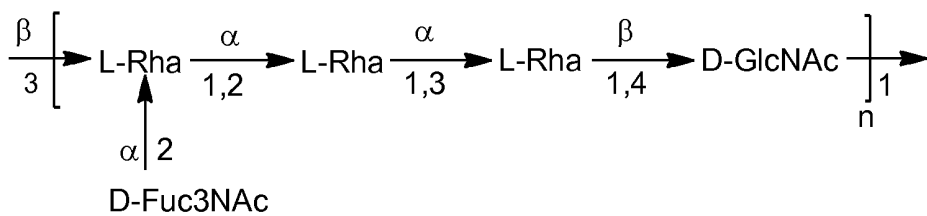
e. Fórmula O6Glc'



f. Fórmula O6GlcNAc'



g. Fórmula O2'



En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende (i) una macromolécula de O25 (por ejemplo, O25A u O25B), o un bioconjugado que comprende O25 (por ejemplo, O25A u O25B) y (ii) una macromolécula de O1 o un bioconjugado que comprende O1. En una modalidad específica, tal macromolécula de O25 es una macromolécula de O25B. En otra modalidad específica, tal macromolécula de O1 es O1A. En otra modalidad específica, tal macromolécula de O1 es O1B. En otra modalidad específica, tal macromolécula de O1 es O1C.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende (i) una macromolécula de O25 (por ejemplo, O25A u O25B), o un bioconjugado que comprende O25 (por ejemplo, O25A u O25B) y (ii) una macromolécula de O2 o un bioconjugado que comprende O2. En una modalidad específica, tal macromolécula de O25 es una macromolécula de O25B.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende (i) una macromolécula de O25 (por ejemplo, O25A u O25B), o un bioconjugado que comprende O25 (por ejemplo, O25A u O25B) y (ii) una macromolécula de O6 (por ejemplo, una macromolécula de O6 que comprende un monosacárido Glc de ramificación (O6Glc) o un monosacárido GlcNAc de ramificación (O6GlcNAc)) o un bioconjugado que comprende O6. En una modalidad específica, tal macromolécula de O25 es una macromolécula de O25B. En otra modalidad específica, tal macromolécula de O6 es una macromolécula de O6 que comprende

un monosacárido Glc de ramificación (O6Glc).

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende al menos dos de los siguientes: (i) una macromolécula de O25 (por ejemplo, O25A u O25B) o un bioconjugado que comprende O25 (por ejemplo, O25A u O25B); (ii) una macromolécula de O1 o un bioconjugado que comprende O1; (iii) un O2 o un bioconjugado que comprende O2; y/o (iv) una macromolécula de O6 (por ejemplo, una macromolécula de O6 que comprende un monosacárido Glc de ramificación o un monosacárido GlcNAc de ramificación) o un bioconjugado que comprende O6. En una modalidad específica, tal macromolécula de O25 es una macromolécula de O25B. En otra modalidad específica, tal macromolécula de O1 es O1A. En otra modalidad específica, tal macromolécula de O1 es O1B. En otra modalidad específica, tal macromolécula de O1 es O1C. En otra modalidad específica, tal macromolécula de O6 es una macromolécula de O6 que comprende un monosacárido Glc de ramificación (también referida en la presente como O6Glc).

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende una macromolécula de O25B, una macromolécula de O1, una macromolécula de O2, y una macromolécula de O6 que comprende un monosacárido Glc de ramificación. En ciertas modalidades, tales macromoléculas están conjugadas a proteínas portadoras.

En otro aspecto, proporcionados en la presente están métodos para prevenir la infección de un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, por ExPEC, que comprenden administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente efectiva de una composición (por ejemplo, una composición inmunogénica) descrita en la presente. Véase Sección 5.7.

En otro aspecto, proporcionados en la presente están métodos para tratar la infección de un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, en donde el sujeto está infectado con ExPEC, que comprenden administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente efectiva de una composición (por ejemplo, una composición inmunogénica) descrita en la presente. Véase Sección 5.7.

En otro aspecto, proporcionados en la presente están métodos para inducir una respuesta inmune contra ExPEC en un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, que comprenden administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente efectiva de una composición (por ejemplo, una composición inmunogénica) descrita en la presente. Véase Sección 5.7.

En otro aspecto, proporcionados en la presente están métodos para

inducir la producción de anticuerpos opsonofagocíticos contra ExPEC en un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, que comprenden administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente efectiva de una composición (por ejemplo, una composición inmunogénica) descrita en la presente. Véase Sección 5.7.

Términos y Abreviaturas:

OPS: polisacárido O; el antígeno O de bacterias Gram-negativas. OPS también se refiere en la presente como antígeno O.

Grupo *rfb*: un grupo de genes (por ejemplo, un grupo de genes de *E. coli*) que codifican la maquinaria enzimática capaz de la síntesis de la estructura del esqueleto del antígeno O. El término grupo *rfb* puede aplicar a cualquier grupo biosintético del antígeno O, que incluye aquellos de bacterias que no pertenecen al género *Escherichia*.

waaL: el gen ligasa del antígeno O que codifica una enzima unida a la membrana con un sitio activo localizado en el periplasma. La enzima codificada transfiere el antígeno O unido a undecaprenilfosfato (UPP) al núcleo lípido A, formando el lipopolisacárido.

wecA: el primer gen codificado en el grupo *wec*. La proteína codificada cataliza la transferencia de un GlcNAc-fosfato de UDP-GlcNAc a UPP para formar GlcNAc unido a UPP.

ECA: antígeno común enterobacteriano.

RU: unidad de repetición. Como se usa en la presente, la RU es establecida igual a la unidad de repetición Biológica, BRU. La BRU describe la RU de un antígeno O como es sintetizado *in vivo*.

UPP: undecaprenilpirofosfato.

LLO: oligosacárido ligado al lípido

2AB: 2 amino benzamida.

MS: espectroscopia de masas.

O25B: el término O25B se refiere al antígeno O25B de *E. coli* identificado en la presente (un subserotipo del serotipo O25 de *E. coli*). La referencia a O25B en la presente abarca la fórmula O25B y la fórmula O25B', ambas identificadas anteriormente.

O25A: el término O25A se refiere al antígeno O25A de *E. coli* (un subserotipo del serotipo O25 de *E. coli*). la referencia a O25A en la presente abarca la fórmula O25A y la fórmula O25A', ambas identificadas anteriormente.

O1A: el término O1A se refiere al antígeno O1A de *E. coli* (un subserotipo del serotipo O1 de *E. coli*). La referencia a O1A en la presente abarca la fórmula O1A y la fórmula O1A', ambas identificadas anteriormente.

O1B: el término O1B se refiere al antígeno O1B de *E. coli* (un subserotipo del serotipo O1 de *E. coli*). La referencia a O1B en la presente abarca la fórmula O1B y la fórmula O1B', ambas identificadas anteriormente.

O1C: el término O1C se refiere al O1C antígeno de *E. coli* (un subserotipo del serotipo O1 de *E. coli*). La referencia a O1C en la presente abarca la fórmula O1C y la fórmula O1C, ambas identificadas anteriormente.

O2: el término O2 se refiere al antígeno O2 de *E. coli* (Serotipo O2 de *E. coli*). La referencia a O2 en la presente abarca la fórmula O2 y la fórmula O2', ambas identificadas anteriormente.

O6: el término O6 se refiere al antígeno O6 de *E. coli* (serotipo O6 de *E. coli*). La referencia a O6 en la presente abarca la fórmula O6 y la fórmula O6', ambas identificadas anteriormente.

Bioconjugado: el término bioconjugado se refiere un conjugado entre una proteína (por ejemplo, una proteína portadora) y un antígeno, por ejemplo, un antígeno O (por ejemplo, O25B) preparado en un antecedente de célula hospedera, en donde la maquinaria de la célula hospedera une el antígeno a la proteína (por ejemplo, N-enlaces). Los glicoconjugados incluyen bioconjugados, así como también conjugados de proteína al antígeno de azúcar (por ejemplo, oligo- y polisacáridos), preparados por otros medios, por ejemplo, por enlace químico de la proteína y el antígeno de azúcar.

El término “aproximadamente”, cuando se usa en conjunto con un número, se refiere a cualquier número entre ± 1 , ± 5 o $\pm 10\%$ del número de referencia.

Como se usa en la presente, el término “cantidad efectiva”, en el contexto de administrar una terapia (por ejemplo, una composición descrita en la presente) a un sujeto se refiere a la cantidad de una terapia la cual tiene un efecto(s) profiláctico y/o terapéutico(s). En ciertas modalidades, una “cantidad efectiva” se refiere a la cantidad de una terapia la cual es suficiente para lograr uno, dos, tres, cuatro, o más de los siguientes efectos: (i) reducir o aliviar la severidad de una infección de ExPEC o síntoma asociado con esta; (ii) reducir la duración de una infección de ExPEC o síntoma asociado con esta; (iii) prevenir el progreso de una infección de ExPEC o síntoma asociado con esta; (iv) causar la regresión de una infección de ExPEC o síntoma asociado con esta; (v) prevenir el desarrollo o comienzo de una infección de ExPEC, o síntoma asociado con esta; (vi) prevenir la recurrencia de una infección de ExPEC o síntoma asociado con esta; (vii) reducir la falla de órgano asociada con una infección de ExPEC; (viii) reducir la hospitalización de un sujeto que tiene una infección de ExPEC; (ix)

reducir la duración de hospitalización de un sujeto que tiene una infección de ExPEC; (x) incrementar la supervivencia de un sujeto con una infección de ExPEC; (xi) eliminar una infección de ExPEC en un sujeto; (xii) inhibir o reducir la replicación de ExPEC en un sujeto; y/o (xiii) potenciar o mejorar el(los) efecto(s) profiláctico o terapéutico de otra terapia.

Como se usa en la presente, el término “en combinación”, en el contexto de la administración de dos o más terapias a un sujeto, se refiere al uso de más de una terapia. El uso del término “en combinación” no restringe el orden en el cual las terapias son administradas a un sujeto. Por ejemplo, una primera terapia (por ejemplo, una composición descrita en la presente) puede ser administrada previo a (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas antes), concomitantemente con, o subsecuente a (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas después) de la administración de una segunda terapia a un sujeto.

Como se usa en la presente, el término “sujeto” se refiere a un animal (por ejemplo, aves, reptiles, y mamíferos). En otra modalidad, un sujeto es un mamífero que incluye un no primate (por ejemplo, un camello, burro, cebra, vaca, cerdo, caballo, cabra, oveja, gato, perro, rata y ratón), y un primate (Por ejemplo, un mono, chimpancé, y un humano). En ciertas modalidades, un sujeto es un animal no humano. En algunas modalidades, un sujeto es un animal de granja o mascota (por ejemplo, un perro, gato, caballo, cabra, oveja, cerdo, burro o pollo). En otra modalidad, un sujeto es un humano. En otra modalidad, un sujeto es un infante humano. En otra modalidad, un sujeto es un niño humano. En otra modalidad, un sujeto es un adulto humano. En otra modalidad, un sujeto es un humano anciano. En otra modalidad, un sujeto es un infante humano prematuro. Los términos “sujeto” y “paciente” pueden ser usados en la presente de manera intercambiable.

Como se usa en la presente, el término “infante humano prematuro” se refiere a un infante humano nacido a menos de 37 semanas de edad gestacional.

Como se usa en la presente, el término “infante humano” se refiere a un humano de recién nacido a 1 año de edad.

Como se usa en la presente, el término “niñito humano” se refiere a un humano que es de 1 año hasta 3 años de edad.

Como se usa en la presente, el término “niño humano” se refiere a un humano que es de 1 año hasta 18 años de edad.

Como se usa en la presente, el término “adulto humano” se refiere a un humano que es de 18 años o más grande.

Como se usa en la presente, el término “adulto anciano” se refiere a un humano de 65 años o más.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Trayectoria para la biosíntesis de O25A. Las flechas indican conversiones enzimáticas individuales, los nombres de la enzima están indicados. Los azúcares activados con nucleótidos son preparados en el citoplasma ya sea por enzimas proporcionadas en el grupo de antígeno O u por enzimas constitutivas de la célula hospedera Gram-negativa. Una glicosilfosfato transferasa (WecA) agrega fosfato de D-GlcNAc a undecaprenil fosfato (UP), formando GlcNAc-UPP. Las glicosiltransferasas específicas entonces alargan la molécula de UPP-GlcNAc además agregando monosacáridos formando el oligosacárido de unidad de repetición biológica (BRU) (WekABC WbuB). El orden indicado de enzimas no se refiere a la secuencia de eventos durante la síntesis de BRU (indicado por < >). El BRU es entonces volteado en el espacio periplásmico por Wzx. El Wzy polimeriza linealmente el BRU periplásmico para formar el polisacárido del antígeno O. La longitud del polímero es controlada por Wzz. Muchos oligo y polisacáridos bacterianos son ensamblados con UPP y después transferidos a otras moléculas, es decir, el UPP es una plataforma de construcción general para oligo- y polisacárido en la bacteria. En *E. coli*, y la mayoría de otras bacterias gram negativas, el antígeno O es transferido de UPP al núcleo lípido A por la enzima de *E. coli* WaaL para formar lipopolisacárido (LPS).

Figura 2: grupo *rfb*, estructura, y trayectoria para la síntesis del antígeno-O dependiente wzx/wzy, ejemplificado por el antígeno O y el grupo *rfb* de O25A de *E. coli*. Figura 2A muestra la estructura del grupo *rfb* de la cepa E47a de *E. coli*, localizada entre los genes *galF* y *gnd*. Los genes se mostraron como filas y el llenado está indicado de conformidad con la función de los productos del gen: el negro son genes para la biosíntesis de monosacárido activado por nucleótido los cuales no son parte del repertorio constitutivo de *E. coli* (estos son codificados de otro modo en el genoma), las rayas diagonales negras/blancas son

glicosiltransferasas responsables de agregar unidades de monosacárido únicas al BRUs, *wzx* de flipasa y *wzy* de polimerasa. Figura 2B Estructura química del BRU del antígeno O de O25A ya presentada (véase Fundin et al., 2003, Magnetic Resonance in Chemistry 41, 4).

Figura 3. Figura 3A. Estructuras BRU O25A, O25B, y O16. Figura 3B Comparación del grupo de biosíntesis de antígeno O (grupo *rfb*) entre O25A, O25B, y O16. Los genes rellenos de negro son genes involucrados en la biosíntesis de monosacárido activados por nucleótidos, las rayas diagonales son genes de glicosiltransferasa predichos, rellenos de gris indican procesamiento de BRU o genes de transportación, y las rayas verticales muestran homologías de O-acetiltransferasa. Los cuadros grises indican registros de homología arriba del 25% entre los genes; los valores detallados están indicados. Las flechas negras y grises delgadas muestran ubicaciones de templado de tipado de pligonucleótidos por PCR para *wzy* (específicos de O25A y O25B) y la región O25B3' (específica de O25B).

Figura 4. Distribución de serotipo del estudio de epidemiología. Serotipos de antígeno O de *E. coli* identificados en muestras de especímenes UTI adquiridos en la comunidad se agruparon de conformidad con la incidencia.

Figura 5. Análisis de teñido Western y Plata de LPS de aislados clínicos con un fenotipo de aglutinación positivo O25. Los números de cepa están indicados arriba de los carriles de gel. Los clones individuales se hicieron crecer y la biomasa normalizada OD se recolectó por centrifugación. Las pelotillas se disolvieron en amortiguador Lammlí de SDS PAGE y se trataron con proteinasa K para hidrolizar todas las proteínas en la muestra. El teñido de plata estándar se aplicó al gel PAGE mostrado en A, y sondas de membranas de nitrocelulosa que contienen material electrotransferido a partir de geles idénticamente de corrida con anticuerpo de aglutinación O25 comercial se muestra en B.

Figura 6. Se prepararon trazas de HPLC de 2AB de muestras de O25A y O25B. Muestras de LLO etiquetadas con 2AB a partir de cepas upec138 (líneas punteadas) y upec436 (líneas sólidas). Se recolectaron picos y estructuras BRU correspondientes deducidas del patrón de fragmentación de MS/MS detallado en la Figura 7, están indicadas por las flechas.

Figura 7. Series iónicas de fragmentación MS/MS obtenidas de picos indicadas en la Figura 6 a tiempos de elución de 50' y 62' de iones madre $m/z=1022$ (A; de la cepa upec138) o $m/z=1021$ (B; de upec436). Las series iónicas son mostradas con relación al dibujo del BRU putativo.

Figura 8. Desacetilación de muestra de LLO etiquetada con 2AB

derivada de un aislado clínico positivo O25B. El pico específico de O25B al tiempo de elución 50' obtenido de LLOs etiquetado con 2AB de un aislado clínico con el genotipo O25B se recolectó, y analizó por HPLC de fase normal después del tratamiento con (línea sólida) o sin (línea punteada) NaOH para hidrólisis de grupos O-acetilo del Programa de Patente Especial de Cal ND.

Figura 9. Análisis de composición de monosacárido de bioconjugados O25A y O25B. Se produjeron bioconjugados de O25, purificaron, y se procesaron para análisis de composición de monosacáridos. Se muestran rastros de HPLC C18. Muestras derivadas de O25A (sólida) y O25B (punteada) son comparadas con una mezcla de monosacáridos de fuentes comerciales (Glc, GlcNAc, Rha, FucNAc). Los tiempos de elución de los monosacáridos están indicados por flechas.

Figura 10. Caracterización de bioconjugados de O25A. El Volumen final purificado de bioconjugados de 4S-EPA-O25A se analizó por SDS PAGE y se visualizó para teñido Coomassie directo (C) y manchado Western usando ya sea antisuero anti-EPA o antisuero anti-O25.

Figura 11. Caracterización de bioconjugados de O25B. El volumen final purificado de bioconjugados de 4S-EPA-O25B se analizó por SDS PAGE y visualizó por teñido Coomassie directo (C) y manchado Western usando ya sea antisuero anti-EPA o antisuero anti-O25.

Figura 12. Biosíntesis genética del antígeno O O1 y estructura química. Figura 12A Se muestra el grupo *rfb* y genes de flanqueo de la cepa O1A de *E. coli* G1632 (ACCESO NO. GU299791). Los códigos de color de negro, gris y rayado son los mismos como aquellos para la figura 2, descrita anteriormente. Figura 12B Se muestran las estructuras BRU químicas de subserotipos O1.

Figura 13. Análisis de LPS de aislados clínicos con un fenotipo de aglutinación positivo O1. Figura 13A Teñido de plata y Figura 13B Teñido Western usando antisuero anti-O1.

Figura 14. Identificación de O1A en aislados clínicos de O1. Muestras de LLO etiquetadas con 2AB de aislados clínicos de O1 se analizaron por la huella de LLO. Figura 14A Se muestran trazas de HPLC de fase normal de 60' en adelante. El valor de referencia para cada muestra fue cambiado para visualizar los picos co-migrantes. El número upec indica la cepa clínica. Figura 14B Series iónicas de fragmentación de MS/MS de $m/z=1849.6$ (aducto Na^+). El dibujo asigna el patrón iónico de fragmentación y probables roturas de enlaces glicosídicos en un oligosacárido de 2 BRU de O1A.

Figura 15. Bioconjugados de O1. Prueba de expresión de escala

pequeña de glicoproteína EPA-O1 por células de *E. coli* (W3110 $\Delta rfbO16::rfbO1 \Delta waaL$) transformadas con un plásmido de expresión EPA (pGVXN659) y cinco diferentes plásmidos de expresión pglB: A, p114: expresión de codón no optimizado, etiqueta HA que contiene pglB; B, p939: codón optimizado, etiqueta HA que contiene pglB; C, p970: codón optimizado, etiqueta HA removida de pglB; D, codón optimizado, etiqueta HA que contiene, sitio de glicosilación natural N534Q removido de pglB; y E, codón optimizado, etiqueta HA removida de, sitio de glicosilación natural N534Q removido de pglB. Las células se hicieron crecer e indujeron con arabinosa e IPTG, después de la incubación durante la noche a 37°C, las células se recolectaron y se prepararon extractos de proteína periplásmica. Los extractos entonces se separaron por SDS PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa por electromanchado, e inmunodetectaron usando un suero anti-EPA.

Figura 16. Los bioconjugados descritos en la Figura 15, detectados con suero anti-O1.

Figura 17. Estructuras químicas y genéticas O6. Figura 17A Grupo de biosíntesis de antígeno O (grupo *rfb*) y genes de flaqueo de CFT073 de *E. coli* (Genbank AE014075.1). Las funciones del gen putativo de conformidad con BLAST están indicadas y los genes específicos para la biosíntesis del antígeno O O6 están indicados. Figura 17B Estructuras químicas de estructuras BRU de O6 reportadas (Jann et al, Carbohydr. Res. 263 (1994) 217-225).

Figura 18. Identificación de O6 con ramificación de Glc. Se analizaron muestras de LLO etiquetadas con 2AB de aislados clínicos de O6 por huella de LLO. Figura 18A Se muestran rastros de HPLC de fase normal de 60' adelantados. Se prepararon extractos a partir de cepas de referencia CCUG11309 (línea sólida delgada) y 11311 (punteada) que contiene ramificaciones Glc y GlcNAC. La superposición muestra diferencias claras en tiempos de elución de los BRUs indicados. Figura 18B Extractos de aislados clínicos como se indica por el número upec son comparados con las cepas de referencia de la Figura 18A.

Figura 19. Biosíntesis genética del antígeno O O2 y estructuras químicas. Figura 19A grupos de biosíntesis de antígeno O (grupo *rfb*) y genes de flaqueo de la cepa de *E. coli* G1674 (acceso No. GU299792). Los códigos de color negro, gris y rayado, son como se describen en las figuras previas (por ejemplo, Fig. 2). Figura 19B. Estructura BRU química del antígeno O2.

Figura 20. Análisis de LPS de aislados clínicos con un fenotipo de aglutinación positivo de O2. Figura 20A Teñido de plata. Figura 20B Manchado Western usando antisuero anti-O2.

Figura 21. Análisis OPS de la cepa W3110 Δ waaL Δ rfbW3110::rfbO2 Δ wekS. Se muestra un cromatograma de análisis de LLO etiquetado con 2AB por HPLC de fase normal.

Figura 22. Reconocimiento de LPS O25A y O25B por antisuero MBP anti-O25A y anti-O25B en un análisis de manchado Western. Dos membranas de nitrocelulosa las cuales se obtuvieron después de la electrotransferencia de muestras de LPS se prepararon de upec436 (O25A) y upec138 (O25B) y se separaron por un SDS-PAGE. El patrón de carga fue idéntico para ambas membranas, carril izquierdo: LPS O25A de upec438, carril de en medio: LPS O25B de upec 138. Se usaron microconjugados de MBP para inmunización de conejos. Panel izquierdo: antisuero anti O25B-MBP; panel derecho: antisuero anti O25A-MBP.

Figura 23. Espectro de MS/MS de BRU OPS de O2. El espectro de MS/MS de aducto Na⁺ con m/z=989.4 del pico de elución a 43.5 min de extractos LLO etiquetados con 2AB a partir de la cepa CCUG25. La figura BRU de O2 y las series iónicas Y asociadas están indicadas confirmando la secuencia de monosacárido esperada.

Figura 24. Bioconjugados de EPA que contienen los antígenos O1A, O2, y O6 usados en el estudio preclínico. Se produjeron glicanos de OPS y se purificaron, y analizaron por SDS PAGE y visualizaron por teñido Coomassie.

Figura 25. Muestra los tituladores de ELISA obtenidos con suero de ratas inmunizadas con O1A-EPA (G1), proteína portadora sola (G10), TBS (G11), o una composición tetravalente compuesta de EPA-O1A, O2, O6Glc, y O25B (G12), probada contra una placa de ELISA recubierta en O1A-LPS purificada de la cepa upec032.

Figura 26. Muestra los tituladores de ELISA obtenidos con suero de ratas inmunizadas con O2-EPA (G4), proteína portadora sola (G10), TBS (G11), o una composición tetravalente compuesta de EPA-O1A, O2, O6Glc, y O25B (G12), probada contra una placa de ELISA recubierta en O2 LPS purificada de las cepas CCUG25.

Figura 27. Muestra los tituladores de ELISA obtenidos con suero de ratas inmunizadas con O6Glc-EPA (G7), proteína portadora sola (G10), TBS (G11), o una composición tetravalente compuesta de EPA-O1A, O2, O6Glc, y O25B (G12), probada contra una placa de ELISA recubierta en O6Glc-LPS purificada de la cepa CCUG11309.

Figura 28. Muestra los tituladores de ELISA obtenidos con suero de ratas inmunizadas con O25B-EPA (G9), proteína portadora sola (G10), TBS (G11),

o una composición tetravalente compuesta de O1A, O2, O6Glc, y O25B (G12), probada contra una placa de ELISA recubierta en O25B-LPS purificada de la cepa upec177.

Figura 29: Índice de opsonización de suero derivado de pre-inmunización de ratas (círculos vacíos) comparado con 42 días post-inmunización (cuadrados rellenos) con una dosis de cebación y dos dosis de refuerzo de las dosis indicadas de vacuna monovalente. (A) inmunización de O2-EPA; (B) inmunización de O6-EPA; (C) inmunización de O25B-EPA.

Figura 30: Tituladores de ELISA obtenidos con suero de sujetos humanos vacunados con una vacuna tetravalente que comprende antígenos de *E. coli* O1A, O2, O6Glc, y O25B. Un incremento significativo en los tituladores de ELISA entre post- (30 días después de la inyección) y pre-inyección (día 1), se observó solamente en los grupos vacunados (*, representa significancia estadística).

Figura 31: Índice opsónico (OI) obtenido con suero a partir de sujetos humanos vacunados con una vacuna tetravalente que comprende antígenos de *E. coli* O1A, O2, O6Glc, y O25B. Se representan respuestas inmunes como se indica por O1 contra placebo y componentes de la vacuna tetravalente (O1A-EPA (31A), O2-EPA (31B), O6Glc-EPA (31C), y O25B-EPA (31D)) antes y después de la inyección. La pre-inyección, definida como día 1, es representada por V2 (visita 2), y post-inyección, definida como día 30, es representada por V4 (visita 4). Un incremento significativo en el O1 entre la post- y pre-inyección (indicado por *, donde múltiples * representan grado de significancia incrementado) se observó solamente en los grupos vacunados. NS, diferencia no significativa.

Figura 32: Tituladores de ELISA (expresados como valores EC50) de suero a partir de sujetos vacunados hacia LPS de O25A (barras negras) y LPS de O25B (barras grises), al día 1 (pre-vacunación) y después de 30 días (post-vacunación). Un incremento estadísticamente significativo en los tituladores de ELISA entre la post-inyección (30 días después de la inyección) y pre-inyección (día 1) se observó para ambos serotipos. LPS de O25A (barras negras) y LPS de O25B (barras grises).

Figura 33: Reactividad de suero a partir de sujetos vacunados hacia O25A (líneas negras) y O25B (líneas grises) que expresan cepas de *E. coli*. Línea gris punteada: cepa serotipo O75, un control negativo. La Figura 33 demuestra que los anticuerpos de IgG de suero inducidos con vacunas de sujetos vacunados responden fuertemente a las cepas O25A y O25B.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Descritas en la presente están las estructuras del antígeno O25B de *E. coli*, así como también usos de O25B, métodos de elaboración de O25B, y bioconjugados que comprenden O25B. Los solicitantes han identificado el grupo de gen de *E. coli* responsable de la producción de O25B y han caracterizado completamente la estructura del antígeno O25B. Por consiguiente, proporcionados en la presente están ácidos nucleicos capaces de producir O25B en células hospederas. También se proporcionan en la presente células hospederas, por ejemplo, células hospederas recombinantemente diseñadas por ingeniería, que comprenden ácidos nucleicos capaces de la producción de O25B. Tales células hospederas pueden ser usadas para generar bioconjugados que comprenden O25B ligado a una proteína portadora, el cual puede ser usado en, por ejemplo, la formulación de terapéuticos (por ejemplo, vacunas). El antígeno O25B descrito en la presente también es útil en la generación de anticuerpos, el cual puede ser usado, por ejemplo, en métodos terapéuticos tales como inmunización pasiva de sujetos. Además, proporcionadas en la presente están composiciones que comprenden O25B, solas o en combinación con otros antígenos de *E. coli* (por ejemplo, O1, O2 y O6 y subserotipos de los mismos), para uso en los métodos terapéuticos, por ejemplo, vacunación de hospederos contra la infección con *E. coli* (por ejemplo, *E. coli* uropatogénico).

5.1 Ácidos Nucleicos y Proteínas

En un aspecto, proporcionados en la presente están ácidos nucleicos aislados relacionados a la producción de O25B, por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican una o más proteínas de un O25B del grupo *rfb* de *E. coli*. Aquellos expertos en la técnica apreciarán que, debido a la degeneración del código genético, una proteína que tiene una secuencia de aminoácido específica puede ser codificada por ácidos nucleicos diferentes múltiples. De este modo, aquellos expertos en la técnica entenderán que un ácido nucleico proporcionado en la presente puede ser alterado en tal forma que su secuencia difiere de una secuencia proporcionada en la presente, sin afectar la secuencia de aminoácido de la proteína codificada por el ácido nucleico.

En una modalidad específica, se proporciona en la presente un ácido nucleico que codifica un O25B del grupo *rfb* de *E. coli*. En una modalidad específica, se proporciona en la presente un ácido nucleico que codifica un grupo de genes *rfb* de *E. coli* (upec138) (SEQ ID NO:12). En otra modalidad específica, se proporciona en la presente un ácido nucleico que codifica un grupo de genes

que es aproximadamente 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:12. El upec138 es un ejemplo de una cepa de *E. coli* del serotipo O25B. La persona experta en la técnica estará de acuerdo que otras cepas de este serotipo pueden ahora ser fácilmente obtenidas a partir de aislados clínicos de conformidad con los métodos descritos en la presente, y ejemplos de tales otras cepas son upec177 y upec163. Por lo tanto, donde quiera que un grupo de gen *rfb* o genes individuales de tal grupo de tales cepas de O25B se mencionen en la presente, significa incluir los grupos de gen correspondientes o genes de otras cepas de O25B. También, las secuencias proporcionadas se pueden encontrar secuenciando el grupo de genes *rfb*s o si se desea, de genes individuales de tales otros aislados, y proporcionará secuencias homólogas que codifican proteínas homólogas como el grupo de genes o gen. En algunas modalidades donde un grupo de genes homólogos o gen se menciona con referencia a un grupo de genes o gen con un cierto porcentaje, tal secuencia homóloga preferiblemente codifica la(s) proteína(s) con la misma función como las de la cepa o secuencia de referencia.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente un ácido nucleico que codifica un O25B del grupo *rfb* de *E. coli*. En una modalidad específica, se proporciona en la presente un ácido nucleico que codifica un grupo de genes *rfb* de *E. coli* (upec163). En otra modalidad específica, se proporciona en la presente un ácido nucleico que codifica un grupo de genes que es aproximadamente 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%) idéntico a, u homólogo a un grupo de genes *rfb* de *E. coli* (upec163).

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente un ácido nucleico que codifica un O25B del grupo *rfb* de *E. coli*. En una modalidad específica, se proporciona en la presente un ácido nucleico que codifica un grupo de genes *rfb* de *E. coli* (upec177). En otra modalidad específica, se proporciona en la presente un ácido nucleico que codifica un grupo de genes que es aproximadamente 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%) idéntico a, u homólogo a un grupo de genes *rfb* de *E. coli* (upec177).

En otra modalidad, proporcionadas en la presente están proteínas que codifican ácido nucleico de un O25B del grupo *rfb* de *E. coli*.

En una modalidad específica, un ácido nucleico que codifica una proteína de un O25B del grupo *rfb* de *E. coli* proporcionada en la presente comprende o consiste de la SEQ ID NO:1, el gen *rmIB* del O25B del grupo *rfb* de *E. coli*. En otra modalidad específica, un ácido nucleico que codifica una proteína de un O25B del grupo *rfb* de *E. coli* se proporciona en la presente 75%, 80%, 85%,

90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:1.

En una modalidad específica, un ácido nucleico que codifica una proteína de un O25B del grupo *rfb* de *E. coli* proporcionada en la presente comprende o consiste de la SEQ ID NO:2, el gen *rmlD* del O25B del grupo *rfb* de *E. coli*. En otra modalidad específica, un ácido nucleico que codifica una proteína de un O25B del grupo *rfb* de *E. coli* se proporciona en la presente 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:2.

En una modalidad específica, un ácido nucleico que codifica una proteína de un O25B del grupo *rfb* de *E. coli* proporcionada en la presente comprende o consiste de la SEQ ID NO:3, el gen *rmlA* del O25B del grupo *rfb* de *E. coli*. En otra modalidad específica, un ácido nucleico que codifica una proteína de un O25B del grupo *rfb* de *E. coli* se proporciona en la presente 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:3.

En una modalidad específica, un ácido nucleico que codifica una proteína de un O25B del grupo *rfb* de *E. coli* proporcionada en la presente comprende o consiste de la SEQ ID NO:4, el gen *rmlC* del O25B del grupo *rfb* de *E. coli*. En otra modalidad específica, un ácido nucleico que codifica una proteína de un O25B del grupo *rfb* de *E. coli* se proporciona en la presente 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:4.

En una modalidad específica, un ácido nucleico que codifica una proteína de un O25B del grupo *rfb* de *E. coli* proporcionada en la presente comprende o consiste de la SEQ ID NO:5, el gen *wzx* del O25B del grupo *rfb* de *E. coli*. En otra modalidad específica, un ácido nucleico que codifica una proteína de un O25B del grupo *rfb* de *E. coli* se proporciona en la presente 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:5.

En una modalidad específica, un ácido nucleico que codifica una proteína de un O25B del grupo *rfb* de *E. coli* proporcionada en la presente comprende o consiste de la SEQ ID NO:6, el gen *wekA* del O25B del grupo *rfb* de *E. coli*. En otra modalidad específica, un ácido nucleico que codifica una proteína de un O25B del grupo *rfb* de *E. coli* se proporciona en la presente 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:6.

En una modalidad específica, un ácido nucleico que codifica una proteína de un O25B del grupo *rfb* de *E. coli* proporcionada en la presente comprende o consiste de la SEQ ID NO:7, el gen *wekB* del O25B del grupo *rfb* de *E. coli*. En otra modalidad específica, un ácido nucleico que codifica una proteína de un O25B del grupo *rfb* de *E. coli* se proporciona en la presente 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:7.

En una modalidad específica, un ácido nucleico que codifica una proteína de un O25B del grupo *rfb* de *E. coli* proporcionada en la presente comprende o consiste de la SEQ ID NO:8, el gen *wzy* del O25B del grupo *rfb* de *E. coli*. En otra modalidad específica, un ácido nucleico que codifica una proteína de un O25B del grupo *rfb* de *E. coli* se proporciona en la presente 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:8.

En una modalidad específica, un ácido nucleico que codifica una proteína de un O25B del grupo *rfb* de *E. coli* proporcionada en la presente comprende o consiste de la SEQ ID NO:9, el gen *wbbJ* del O25B del grupo *rfb* de *E. coli*. En otra modalidad específica, un ácido nucleico que codifica una proteína de un O25B del grupo *rfb* de *E. coli* se proporciona en la presente 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:9.

En una modalidad específica, un ácido nucleico que codifica una proteína de un O25B del grupo *rfb* de *E. coli* proporcionada en la presente comprende o consiste de la SEQ ID NO:10, el gen *wbbK* del O25B del grupo *rfb* de *E. coli*. En otra modalidad específica, un ácido nucleico que codifica una proteína de un O25B del grupo *rfb* de *E. coli* se proporciona en la presente 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:10.

En una modalidad específica, un ácido nucleico que codifica una proteína de un O25B del grupo *rfb* de *E. coli* proporcionada en la presente comprende o consiste de la SEQ ID NO:11, el gen *wbbL* del O25B del grupo *rfb* de *E. coli*. En otra modalidad específica, un ácido nucleico que codifica una proteína de un O25B del grupo *rfb* de *E. coli* se proporciona en la presente 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:11.

En otro aspecto, proporcionadas en la presente están proteínas codificadas por los ácidos nucleicos proporcionados en la presente. En una modalidad específica, se proporciona en la presente dTDP-Glucosa 4,6-deshidratasa, codificada por la SEQ ID NO:1. En otra modalidad específica, se proporciona en la presente dTDP-6-Desoxi-D-glucosa 3,5-epimerasa, codificada por la SEQ ID NO:2. En otra modalidad específica, se proporciona en la presente Glucosa-1-fosfato timidililtransferasa, codificada por la SEQ ID NO:3. En otra modalidad específica, se proporciona en la presente dTDP-4-deshidroramnosa 3,5-epimerasa, codificada por la SEQ ID NO:4. En otra modalidad específica, se proporciona en la presente flipasa del antígeno O, codificada por la SEQ ID NO:5. En otra modalidad específica, se proporciona en la presente dTDP-Rha:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP α -1,3-ramnosiltransferasa, codificada por la SEQ ID NO:6.

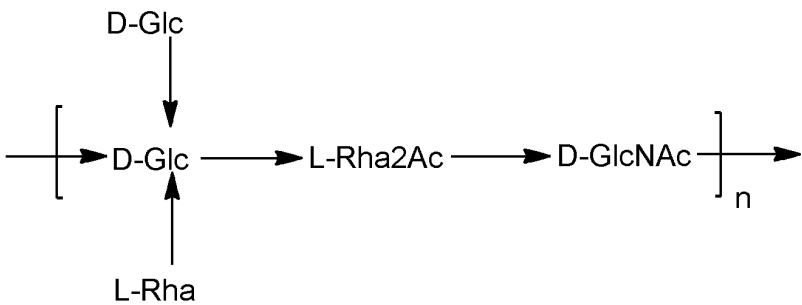
En otra modalidad específica, se proporciona en la presente UDP-Glc:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP β -1,6-glucosiltransferasa, codificada por la SEQ ID NO:7. En otra modalidad específica, se proporciona en la presente O antígeno polimerasa, codificada por la SEQ ID NO:8. En otra modalidad específica, se proporciona en la presente O-acetil transferasa, codificada por la SEQ ID NO:9. En otra modalidad específica, se proporciona en la presente UDP-Glc:Rha-GlcNAc-UPP α -1,3-glucosiltransferasa, codificada por la SEQ ID NO:10. En otra modalidad específica, se proporciona en la presente dTDP-Rha:GlcNAc-UPP α -1,3-ramnosiltransferasa, codificada por la SEQ ID NO:11.

5.2 Antígenos O de *E. coli*

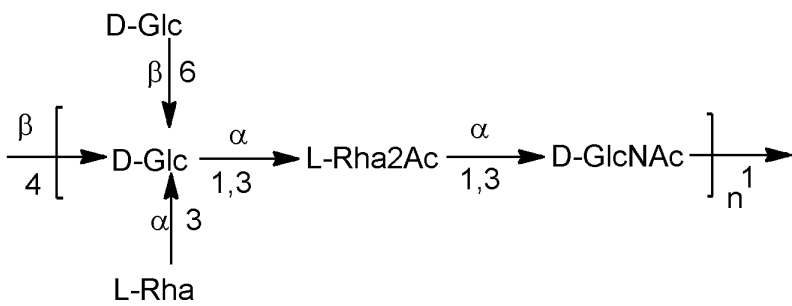
En un aspecto, proporcionados en la presente están antígenos de *E. coli* aislados de los serotipos O25, O1, O2 y O6.

En una modalidad específica, se proporciona en la presente un antígeno O aislado a partir de la cepa de *E. coli* upec138. En otra modalidad específica, se proporciona en la presente un antígeno O aislado a partir de la cepa de *E. coli* upec163. En otra modalidad específica, se proporciona en la presente un antígeno O aislado a partir de la cepa de *E. coli* upec177.

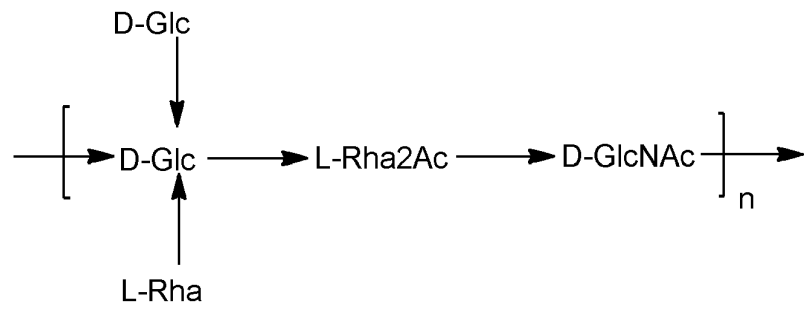
En otra modalidad específica, se proporciona en la presente un O25B aislado del antígeno de *E. coli* de Fórmula O25B:



En otra modalidad específica, se proporciona en la presente un O25B aislado del antígeno de *E. coli* de Fórmula O25B':

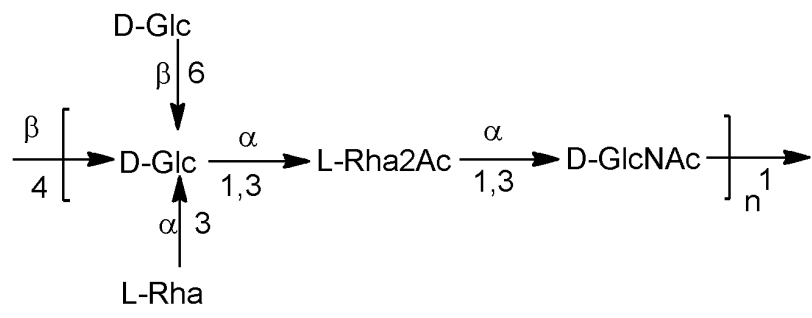


En otro aspecto, se proporciona en la presente una población de macromoléculas aisladas de la Fórmula O25B, presentada abajo:



en donde n es un entero entre 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 10 a 30, 15 a 30, 20 a 30, 25 a 30, 5 a 25, 10 a 25, 15 a 25, 20 a 25, 10 a 20, o 15 a 20. En una modalidad específica, n de al menos 80% de las macromoléculas en la población es entre 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 10 a 30, 15 a 30, 20 a 30, 25 a 30, 5 a 25, 10 a 25, 15 a 25, 20 a 25, 10 a 20, o 15 a 20.

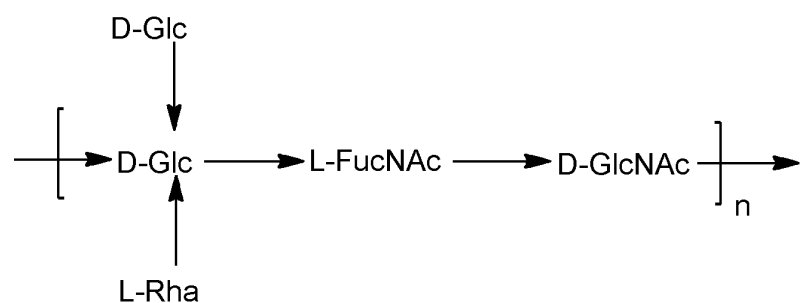
En otro aspecto, proporcionada en la presente una población de macromoléculas aisladas de la Fórmula O25B', presentada abajo:



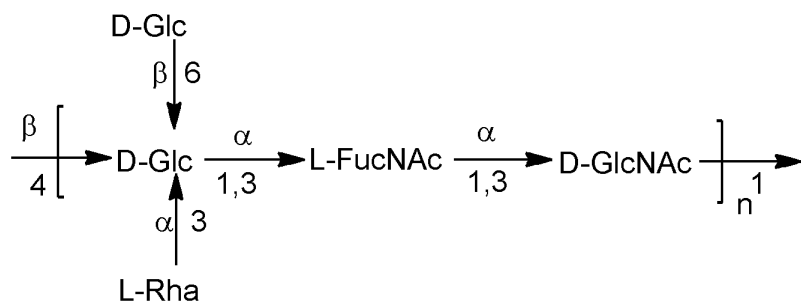
en donde n es un entero entre 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 10 a 30, 15 a 30, 20 a 30, 25 a 30, 5 a 25, 10 a 25, 15 a 25, 20 a 25, 10 a 20, o 15 a 20. En una modalidad específica, n de al menos 80% de las macromoléculas en la población es entre 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 10 a 30, 15 a 30, 20 a 30, 25 a 30, 5 a 25, 10 a 25, 15 a 25, 20 a 25, 10 a 20, o 15 a 20.

Otros antígenos de *E. coli* útiles en las composiciones descritas en la presente (por ejemplo, composiciones terapéuticas, por ejemplo, vacunas; véase Sección 5.6) incluyen O25A, así como también Antígenos O1, O2 y O6, y subserotipos de los mismos.

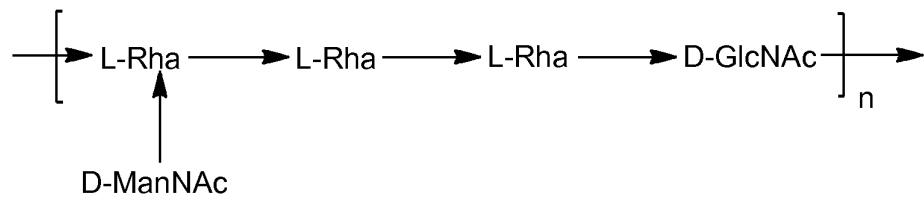
En una modalidad, un antígeno O25A (por ejemplo, en forma aislada o como parte de un bioconjugado) se usa en una composición proporcionada en la presente (por ejemplo, en combinación con un antígeno O25B (o bioconjugado que comprende un antígeno O25B)). En una modalidad específica, el antígeno O25A es de Fórmula O25A:



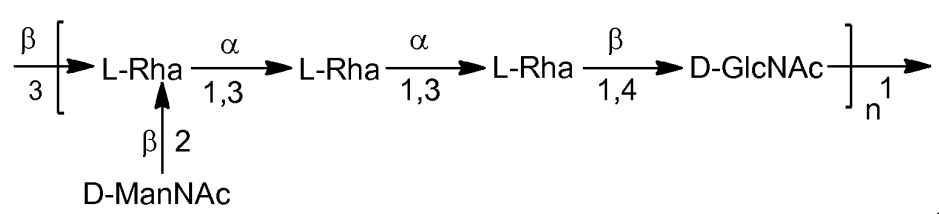
En otra modalidad específica, el antígeno O25A es de Fórmula O25A':



En una modalidad, un antígeno O1A (por ejemplo, en forma aislada o como parte de un bioconjugado) se usa en una composición proporcionada en la presente (por ejemplo, en combinación con un antígeno O25B (o bioconjugado que comprende un antígeno O25B)). En una modalidad específica, el antígeno O1A es de Fórmula O1A:

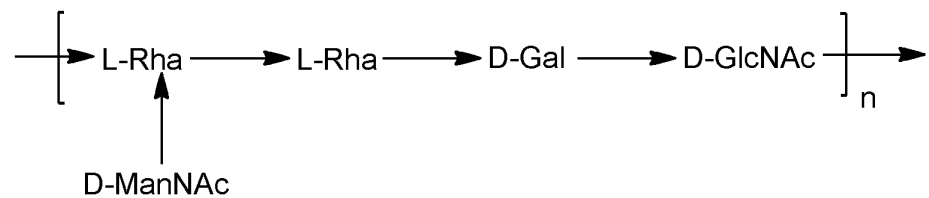


En otra modalidad específica, el antígeno O1A es de Fórmula O1A':

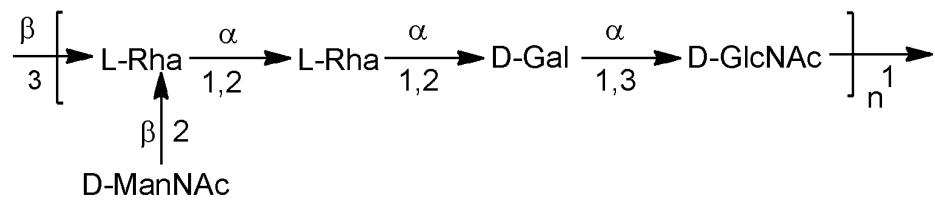


En una modalidad, un antígeno O1B (por ejemplo, en forma aislada o como parte de un bioconjugado) se usa en una composición proporcionada en la presente (por ejemplo, en combinación con un antígeno O25B (o bioconjugado que comprende un antígeno O25B)). En una modalidad específica, el antígeno

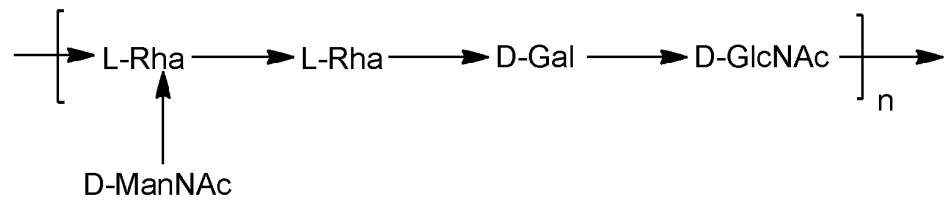
O1B es de Fórmula O1B:



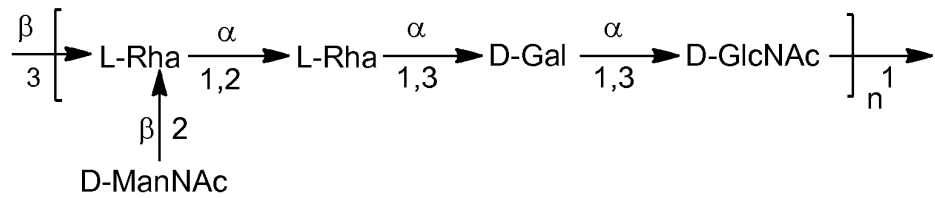
En otra modalidad específica, el antígeno O1B es de Fórmula O1B':



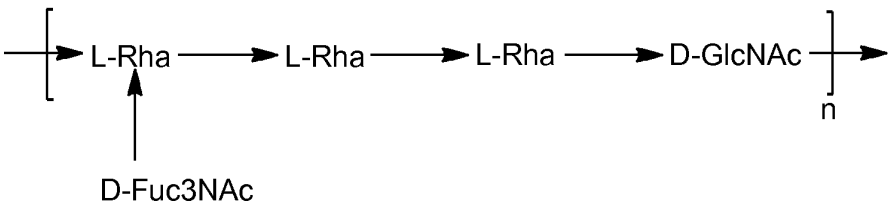
En una modalidad, un antígeno O1C (por ejemplo, en forma aislada o como parte de un bioconjugado) se usa en una composición proporcionada en la presente (por ejemplo, en combinación con un antígeno O25B (o bioconjugado que comprende un antígeno O25B)). En una modalidad específica, el antígeno O1C es de Fórmula O1C:



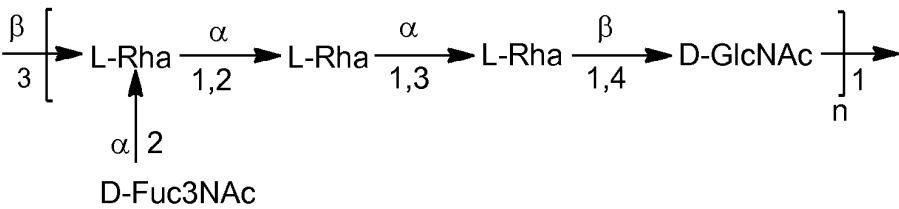
En otra modalidad específica, el antígeno O1C es de Fórmula O1C':



En una modalidad, un antígeno O2 (por ejemplo, en forma aislada o como parte de un bioconjugado) se usa en una composición proporcionada en la presente (por ejemplo, en combinación con un antígeno O25B (o bioconjugado que comprende un antígeno O25B)). En una modalidad específica, el antígeno O2 es de Fórmula O2:

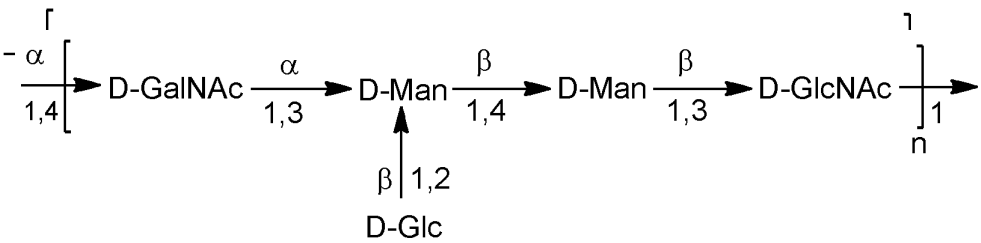


En otra modalidad específica, el antígeno O2 es de Fórmula O2':

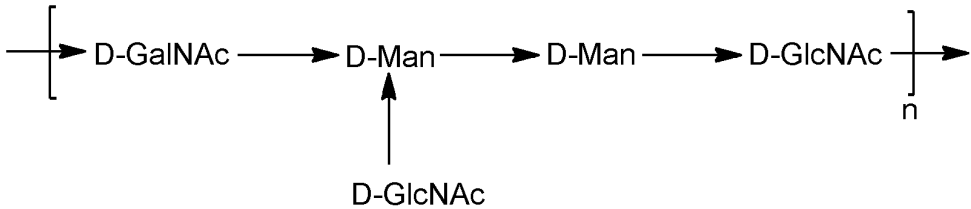


En una modalidad, un antígeno O6 (por ejemplo, en forma aislada o como parte de un bioconjugado) se usa en una composición proporcionada en la presente (por ejemplo, en combinación con un antígeno O25B (o bioconjugado que comprende un antígeno O25B)). En una modalidad específica, el antígeno O6 es de Fórmula O6K2 también referido en la presente como O6Glc):

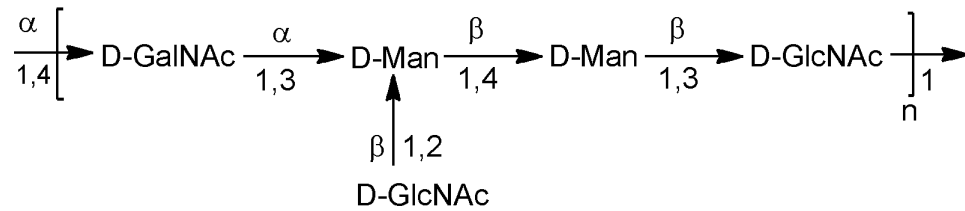
En otra modalidad específica, el antígeno O6 es de Fórmula O6K2' (también referido en la presente como O6Glc'):



En otra modalidad específica, el antígeno O6 es de Fórmula O6K54 (también referido en la presente como O6GlcNA):



En otra modalidad específica, el antígeno O6 es de Fórmula O6K54' (también referido en la presente como O6GlcNAc'):



5.3 Células hospederas

Proporcionadas en la presente están células hospederas, por ejemplo, células hospederas procarióticas, capaces de producir antígenos O de *E. coli* y bioconjugados que comprenden tales antígenos O de *E. coli*. En ciertas modalidades, las células hospederas proporcionadas en la presente comprenden (por ejemplo, naturalmente o a través de ingeniería genética) uno o más de los ácidos nucleicos descritos en la presente. Véase Sección 5.1. En ciertas modalidades, las células hospederas proporcionadas en la presente producen uno o más de los antígenos O de *E. coli* descritos en la presente, y/o producen bioconjugados que comprenden uno o más de los antígenos O de *E. coli* descritos en la presente. Véase Sección 5.2.

En un aspecto, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica que comprende ácidos nucleicos que codifican enzimas (por ejemplo, glicosiltransferasas) capaces de producir el nuevo polisacárido descrito en la presente, O25B de *E. coli*. También se proporcionan en la presente células hospederas que comprende ácidos nucleicos que codifican enzimas (por ejemplo, glicosiltransferasas) capaces de producir otros antígenos de *E. coli*, por ejemplo, O25A, O1, O2 y O6, y subserotipos de los mismos (véase Sección 5.2). Las células hospederas proporcionadas en la presente pueden expresar naturalmente ácidos nucleicos capaces de producir un antígeno O de interés, o las células hospederas pueden ser elaboradas para expresar tales ácidos nucleicos, es decir, en ciertas modalidades tales ácidos nucleicos son heterólogos a las células hospederas e introducido en las células hospederas usando procedimientos genéticos conocidos en la técnica. En ciertas modalidades, las células hospederas proporcionadas en la presente comprenden ácidos nucleicos que codifican enzimas adicionales activas en la N-glicosilación de proteínas, por ejemplo, la célula hospedera proporcionada en la presente puede comprender adicionalmente un ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa o ácidos nucleicos que

codifican otras glicosiltransferasas. Véase, por ejemplo, Sección 5.3.3. En ciertas modalidades, las células hospederas proporcionadas en la presente comprenden un ácido nucleico que codifica una proteína portadora, por ejemplo, una proteína a la cual oligo- y polisacáridos pueden estar unidos para formar un bioconjugado. Véase, por ejemplo, Sección 5.3.2 para una descripción de proteínas portadoras y Sección 5.4 para una descripción de bioconjugados. En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

Upec138 es una cepa de *E. coli* identificada en la presente por pertenecer al serotipo O25B, y el grupo de genes *rfb* de la cepa (y cepas del serotipo O25B en general) ha sido identificado en la presente por primera vez por comprender genes que producen un nuevo polisacárido de *E. coli*, O25B. En una modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica que comprende un grupo de gen *rfb* de *E. coli* (upec138) (SEQ ID NO:12), o un grupo de genes que es aproximadamente o al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:12. En una modalidad específica, el grupo de gen *rfb* de *E. coli* (upec138) (SEQ ID NO:12) es introducido en la célula hospedera por manipulación genética (por ejemplo, el grupo de gen es expresado en el plásmido o plásmidos integrados en el genoma de la célula hospedera (véase, por ejemplo, Solicitud de Patente Internacional No. PCT/EP2013/068737)). En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14) o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso o Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En otra modalidad específica, algunos o todos los genes del grupo *rfb* son heterólogos a la célula hospedera. En otra modalidad específica, tal oligosacaril transferasa es heteróloga a la célula hospedera. En otra modalidad específica, tal proteína portadora es heteróloga a la célula hospedera. En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

Upec163 es una cepa de *E. coli* identificada en la presente por pertenecer al serotipo O25B, y el grupo de genes *rfb* de la cepa (y cepas del serotipo O25B en general) ha sido identificado en la presente por primera vez por comprender genes que producen un nuevo polisacárido de *E. coli*, O25B. En otra

modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica que comprende un grupo de gen *rfb* de *E. coli* (upec163), o un grupo de genes que es aproximadamente o al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a un grupo de gen *rfb* de *E. coli* (upec163). En una modalidad específica, el grupo de gen *rfb* de *E. coli* (upec163) es introducido en la célula hospedera por manipulación genética (por ejemplo, el grupo de gen es expresado en el plásmido o plásmidos integrados en el genoma de la célula hospedera (véase, por ejemplo, Solicitud de Patente Internacional No. PCT/EP2013/068737)). En otra modalidad, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14) o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso o Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En otra modalidad específica, algunos o todos los genes del grupo *rfb* son heterólogos a la célula hospedera. En otra modalidad específica, tal oligosacaril transferasa es heteróloga a la célula hospedera. En otra modalidad específica, tal proteína portadora es heteróloga a la célula hospedera. En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

Upec177 es una cepa de *E. coli* identificada en la presente por pertenecer al serotipo O25B, y el grupo de genes *rfb* de la cepa (y cepas del serotipo O25B en general) ha sido identificado en la presente por primera vez por comprender genes que producen un nuevo polisacárido de *E. coli*, O25B. En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica que comprende un grupo de gen *rfb* de *E. coli* (upec177), o un grupo de genes que es aproximadamente o al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a un grupo de gen *rfb* de *E. coli* (upec177). En una modalidad específica, el grupo de gen *rfb* de *E. coli* (upec177) es introducido en la célula hospedera por manipulación genética (por ejemplo, el grupo de gen es expresado en el plásmido o plásmidos integrados en el genoma de la célula hospedera (véase, por ejemplo, Solicitud de Patente Internacional No. PCT/EP2013/068737)). En otra modalidad, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica

comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14) o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso o Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En otra modalidad específica, algunos o todos los genes del grupo *rfb* son heterólogos a la célula hospedera. En otra modalidad específica, tal oligosacaril transferasa es heteróloga a la célula hospedera. En otra modalidad específica, tal proteína portadora es heteróloga a la célula hospedera. En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica (por ejemplo, una célula hospedera recombinantemente diseñada por ingeniería) que produce O25B, en donde tal célula hospedera comprende *rmlB*, *rmlD*, *rmlA*, *rmlC*, *wzx*, *wekA*, *wekB*, *wzy*, *wbbJ*, *wbbK*, y/o *wbbL*. Tales células hospederas pueden ser diseñadas por ingeniería usando procedimientos recombinantes para comprender uno o más plásmidos que comprenden los genes *rmlB*, *rmlD*, *rmlA*, *rmlC*, *wzx*, *wekA*, *wekB*, *wzy*, *wbbJ*, *wbbK*, y/o *wbbL*. En ciertas modalidades, tales uno o más plásmidos son integrados en el genoma de la célula hospedera. En una modalidad específica, tal *rmlB* comprende o consiste de la SEQ ID NO:1, o es 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:1. En una modalidad específica, tal *rmlD* comprende o consiste de la SEQ ID NO:2, o es 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:2. En una modalidad específica, tal *rmlA* comprende o consiste de la SEQ ID NO:3, o es 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:3. En una modalidad específica, tal *rmlC* comprende o consiste de la SEQ ID NO:4, o es 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:4. En una modalidad específica, tal *wzx* comprende o consiste de la SEQ ID NO:5, o es 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:5. En una modalidad específica, tal *wekA* comprende o consiste de la SEQ ID NO:6, o es 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:6. En una modalidad específica, tal *wekB* comprende o consiste de la SEQ ID NO:7, o es 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:7. En una modalidad específica, tal *wzy* comprende o consiste de la SEQ ID NO:8, o es 75%, 80%, 85%, 90%, 95%,

96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:8. En una modalidad específica, tal *wbbJ* comprende o consiste de la SEQ ID NO:9, o es 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:9. En una modalidad específica, tal *wbbK* comprende o consiste de la SEQ ID NO:10, o es 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:10. En una modalidad específica, tal *wbbL* comprende o consiste de la SEQ ID NO:11, o es 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:11. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14) o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso o Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En otra modalidad específica, algunos o todos los genes, *rmlB*, *rmlD*, *rmlA*, *rmlC*, *wzx*, *wekA*, *wekB*, *wzy*, *wbbJ*, *wbbK*, y *wbbL*, son heterólogos a la célula hospedera. En otra modalidad específica, tal oligosacaril transferasa es heteróloga a la célula hospedera. En otra modalidad específica, tal proteína portadora es heteróloga a la célula hospedera. En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica (por ejemplo, una célula hospedera recombinantemente diseñada por ingeniería) que produce O25B, en donde tal célula hospedera comprende uno, dos, tres, cuatro, o more, por ejemplo, todos, los siguientes genes (o un ácido nucleico que es aproximadamente o al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a uno de los siguientes genes, y preferiblemente que codifica la proteína con la misma función): *rmlB* (SEQ ID NO:1), *rmlD* (SEQ ID NO:2), *rmlA* (SEQ ID NO:3), *rmlC* (SEQ ID NO:4), *wzx* (SEQ ID NO:5), *wekA* (SEQ ID NO:6), *wekB* (SEQ ID NO:7), *wzy* (SEQ ID NO:8), *wbbJ* (SEQ ID NO:9), *wbbK* (SEQ ID NO:10), y/o *wbbL* (SEQ ID NO:11). En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X

puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica (por ejemplo, una célula hospedera recombinantemente diseñada por ingeniería) capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender la secuencia de ácido nucleico de *rmIB* (SEQ ID NO:1). En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender una secuencia nucleica que codifica una dTDP-Glucosa 4,6-deshidratasa, por ejemplo, una dTDP-Glucosa 4,6-deshidratasa codificada por *rmIB*. En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender un ácido nucleico que es aproximadamente o al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntico a la SEQ ID NO:1. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica (por ejemplo, una célula hospedera recombinantemente diseñada por ingeniería) capaz de producir O25B, y/o un

bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender la secuencia de ácido nucleico de *rmID* (SEQ ID NO:2). En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender una secuencia nucleica que codifica una dTDP-6-Desoxi-D-glucosa 3,5-epimerasa, por ejemplo, una dTDP-6-Desoxi-D-glucosa 3,5-epimerasa codificada por *rmID*. En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender un ácido nucleico que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntico a la SEQ ID NO:2. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica (por ejemplo, una célula hospedera recombinantemente diseñada por ingeniería) capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender la secuencia de ácido nucleico de *rmIA* (SEQ ID NO:3). En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender una secuencia nucleica que codifica una Glucosa-1-fosfato

timidililtransferasa, por ejemplo, una Glucosa-1-fosfato timidililtransferasa codificada por *rmIA*. En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender un ácido nucleico que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntico a la SEQ ID NO:3. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica (por ejemplo, una célula hospedera recombinantemente diseñada por ingeniería) capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender la secuencia de ácido nucleico de *rmIC* (SEQ ID NO:4). En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender una secuencia nucleica que codifica una dTDP-4-deshidroramnosa 3,5-epimerasa, por ejemplo, una dTDP-4-deshidroramnosa 3,5-epimerasa codificada por *rmIC*. En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender un ácido nucleico que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntico a la SEQ ID NO:4. En otra modalidad

específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica (por ejemplo, una célula hospedera recombinantemente diseñada por ingeniería) capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender la secuencia de ácido nucleico de *wzx* (SEQ ID NO:5). En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender una secuencia nucleica que codifica una flipasa del antígeno O, por ejemplo, una flipasa del antígeno O codificada por *wzx*. En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender un ácido nucleico que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntico a la SEQ ID NO:5. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En una

modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica (por ejemplo, una célula hospedera recombinantemente diseñada por ingeniería) capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender la secuencia de ácido nucleico de *wekA* (SEQ ID NO: 6). En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender una secuencia nucleica que codifica una ramnosiltransferasa, por ejemplo, una dTDP-Rha:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP α -1,3-ramnosiltransferasa codificada por *wekA*. En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender ácidos nucleicos que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntico a la SEQ ID NO:6. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica (por ejemplo, una célula hospedera recombinantemente diseñada por ingeniería) capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender la secuencia de ácido nucleico de *wekB* (SEQ ID NO: 7). En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una

célula hospedera procariótica capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender una secuencia nucleica que codifica una *wekB* glucosiltransferasa, por ejemplo, una UDP-Glc:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP β -1,6-glucosiltransferasa codificada por *wekB*. En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender ácidos nucleicos que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntico a la SEQ ID NO:7. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica (por ejemplo, una célula hospedera recombinantemente diseñada por ingeniería) capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender la secuencia de ácido nucleico de *wzy* (SEQ ID NO: 8). En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender una secuencia nucleica que codifica un antígeno O polimerasa, por ejemplo, un antígeno O polimerasa codificada por *wzy*. En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende

naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender ácidos nucleicos que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntico a la SEQ ID NO: 8. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica (por ejemplo, una célula hospedera recombinantemente diseñada por ingeniería) capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender la secuencia de ácido nucleico de *wbbJ* (SEQ ID NO: 9). En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender una secuencia nucleica que codifica una O-acetil transferasa, por ejemplo, una O-acetil transferasa codificada por *wbbJ*. En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender ácidos nucleicos que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntico a la SEQ ID NO:9. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o una proteína portadora que

comprende una secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica (por ejemplo, una célula hospedera recombinantemente diseñada por ingeniería) capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender la secuencia de ácido nucleico de *wbbK* (SEQ ID NO:10). En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender una secuencia nucleica que codifica una glucosiltransferasa, por ejemplo, una UDP-Glc:Rha-GlcNAc-UPP α -1,3-glucosiltransferasa codificada por *wbbK*. En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender ácidos nucleicos que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntico a la SEQ ID NO:10. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica (por ejemplo, una célula hospedera recombinantemente diseñada por ingeniería) capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es

diseñada por ingeniería para comprender la secuencia de ácido nucleico de *wbbL* (SEQ ID NO:11). En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender una secuencia nucleica que codifica una ramnosil transferasa, por ejemplo, una dTDP-Rha:GlcNAc-UPP α -1,3-ramnosiltransferasa codificada por *wbbL*. En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender ácidos nucleicos que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntico a la SEQ ID NO:11. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica (por ejemplo, una célula hospedera recombinantemente diseñada por ingeniería) capaz de producir O25B, y/o un bioconjugado de O25B (es decir, una proteína portadora ligada al O25B del antígeno de *E. coli*), en donde tal célula hospedera comprende naturalmente o es diseñada por ingeniería para comprender al menos uno, dos, tres, cuatro o más, por ejemplo, todos los siguientes: (i) una secuencia de ácido nucleico que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a la SEQ ID NO:1; (ii) una secuencia de ácido nucleico que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%), o 100% idéntica a la SEQ ID NO:2; (iii) una secuencia de ácido nucleico que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a la SEQ ID NO:3; (iv)

una secuencia de ácido nucleico que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a la SEQ ID NO:4; (v) una secuencia de ácido nucleico que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a la SEQ ID NO:5; (vi) una secuencia de ácido nucleico que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a la SEQ ID NO:6; (vii) una secuencia de ácido nucleico que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a la SEQ ID NO:7; (viii) una secuencia de ácido nucleico que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a la SEQ ID NO:8; (ix) una secuencia de ácido nucleico que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a la SEQ ID NO:9; (x) una secuencia de ácido nucleico que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%), o 100% idéntica a la SEQ ID NO:10; y/o (xi) una secuencia de ácido nucleico que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a la SEQ ID NO:11. En una modalidad específica, tal célula hospedera ha sido diseñada por ingeniería para comprender cada una de tales secuencias, es decir, tales secuencias son heterólogas a tal célula hospedera. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica (por ejemplo, una célula hospedera recombinantemente diseñada por ingeniería) que produce O25B, en donde tal célula hospedera comprende al menos dos de (i) *wbbJ* (SEQ ID NO: 9) o un ácido

nucleico que es aproximadamente o al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:9; (ii) *wbbK* (SEQ ID NO:10) o un ácido nucleico que es aproximadamente o al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:10; y/o (iii) *wbbL* (SEQ ID NO:11) o un ácido nucleico que es aproximadamente o al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:11. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica (por ejemplo, una célula hospedera recombinantemente diseñada por ingeniería) que produce O25B, en donde tal célula hospedera comprende cada uno de (i) *wbbJ* (SEQ ID NO:9) o un ácido nucleico que es aproximadamente o al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:9; (ii) *wbbK* (SEQ ID NO:10) o un ácido nucleico que es aproximadamente o al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:10; y (iii) *wbbL* (SEQ ID NO:11) o un ácido nucleico que es aproximadamente o al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:11. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una

célula hospedera procariótica (por ejemplo, una célula hospedera recombinantemente diseñada por ingeniería) que produce O25B, en donde tal célula hospedera comprende (i) dTDP-Glucosa 4,6-deshidratasa; (ii) dTDP-6-Desoxi-D-glucosa 3,5-epimerasa; (iii) Glucosa-1-fosfato timidililtransferasa; (iv) dTDP-4-deshidroramnosa 3,5-epimerasa; (v) antígeno O de flipasa; (vi) dTDP-Rha:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP α -1,3-ramnosiltransferasa; (vii) UDP-Glc:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP β -1,6- glucosiltransferasa (viii) antígeno O de polimerasa; (ix) O-acetil transferasa; (x) UDP-Glc:Rha-GlcNAc-UPP α -1,3-glucosiltransferasa y/o (xi) dTDP-Rha: GlcNAc-UPP α -1,3-ramnosiltransferasa. En una modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14) o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso o Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En otra modalidad específica, algunos o todos de (i) dTDP-Glucosa 4,6-deshidratasa; (ii) dTDP-6-Desoxi-D-glucosa 3,5-epimerasa; (iii) Glucosa-1-fosfato timidililtransferasa; (iv) dTDP-4-deshidroramnosa 3,5-epimerasa; (v) antígeno O de flipasa; (vi) dTDP-Rha:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP α -1,3-ramnosiltransferasa; (vii) UDP-Glc:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP β -1,6-glucosiltransferasa (viii) antígeno O de polimerasa; (ix) O-acetil transferasa; (x) UDP-Glc:Rha-GlcNAc-UPP α -1,3-glucosiltransferasa y/o (xi) dTDP-Rha: GlcNAc-UPP α -1,3-ramnosiltransferasa son heterólogos a la célula hospedera. En otra modalidad específica, tal oligosacaril transferasa es heteróloga a la célula hospedera. En otra modalidad específica, tal proteína portadora es heteróloga a la célula hospedera. En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

En otro aspecto, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica (por ejemplo, una célula hospedera recombinantemente diseñada por ingeniería) que produce O24A de *E. coli*, es decir, tal célula hospedera comprende enzimas capaces de sintetizar O24A de *E. coli* (véase, por ejemplo, Figura 3). En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende

una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

En otro aspecto, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica (por ejemplo, una célula hospedera recombinantemente diseñada por ingeniería) que produce O1 de *E. coli*, es decir, tal célula hospedera comprende enzimas capaces de sintetizar O1 de *E. coli* (véase, por ejemplo, Figura 12). En una modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera que produce O1A de *E. coli*. En una modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera que produce O1B de *E. coli*. En una modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera que produce O1C de *E. coli*. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

En otro aspecto, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica (por ejemplo, una célula hospedera recombinantemente diseñada por ingeniería) que produce O2 de *E. coli*, es decir, tal célula hospedera comprende enzimas capaces de sintetizar O2 de *E. coli* (véase, por ejemplo, Figura 19). En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En una

modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

En otro aspecto, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica (por ejemplo, una célula hospedera recombinantemente diseñada por ingeniería) que produce O6 de *E. coli*, es decir, tal célula hospedera comprende enzimas capaces de sintetizar O6 de *E. coli* (véase, por ejemplo, Figura 17). En una modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera que produce O6 de *E. coli* que comprende un monosacárido Glc de ramificación o un antígeno O6 que comprende un monosacárido GlcNAc de ramificación. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

Además, se proporciona en la presente una célula hospedera procariótica (por ejemplo, una célula hospedera recombinantemente diseñada por ingeniería) capaz de producir más de un tipo de antígeno O de *E. coli*. En una modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera capaz de producir al menos dos de los siguientes: O25B, O25A, O1 (por ejemplo, O1A, O1B, O1C), O2, y O6. En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una célula hospedera capaz de producir O25B y uno o más de O25A, O1 (por ejemplo, O1A, O1B, O1C), O2, y O6. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaril transferasa. En otra modalidad específica, la célula hospedera procariótica comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X- Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). En una modalidad específica, la célula hospedera es *E. coli*.

5.3.1 Antecedente Genético

Cualquiera de las células hospederas conocidas por aquellos de habilidad en la técnica pueden ser usadas para producir los antígenos O de *E. coli* descritos en la presente (por ejemplo, O25B) y bioconjugados que comprenden los antígenos O de *E. coli* descritos en la presente (por ejemplo, O25B), que incluyen células hospederas procarióticas, arqueas y células hospederas eucarióticas. Células hospederas procarióticas ejemplares para uso en la producción de los antígenos O de *E. coli* descritos en la presente y bioconjugados que comprenden los antígenos O de *E. coli* descritos en la presente incluyen, sin limitación, especies de *Escherichia*, especies de *Shigella*, especies de *Klebsiella*, especies de *Xhantomonas*, especies de *Salmonella*, especies de *Yersinia*, especies de *Lactococcus*, especies de *Lactobacillus*, especies de *Pseudomonas*, especies de *Corynebacterium*, especies de *Streptomyces*, especies de *Streptococcus*, especies de *Staphylococcus*, especies de *Bacillus*, y especies de *Clostridium*. En una modalidad específica, la célula hospedera usada para producir los antígenos O de *E. coli* descritos en la presente y bioconjugados que comprenden los antígenos O de *E. coli* descritos en la presente es *E. coli*.

En ciertas modalidades, las células hospederas usada para producir los antígenos O de *E. coli* y bioconjugados descrita en la presente son diseñadas por ingeniería para comprender ácidos nucleicos heterólogos, por ejemplo, ácidos nucleicos heterólogos que codifican una o más proteínas portadoras y/o ácidos nucleicos heterólogos que codifican una o más proteínas, por ejemplo, genes que codifican una o más proteínas. En una modalidad específica, los ácidos nucleicos heterólogos que codifican proteínas involucradas en las trayectorias de glicosilación (por ejemplo, trayectorias de glicosilación procarióticas y/o eucarióticas) pueden ser introducidas en las células hospederas descritas en la presente. Tales ácidos nucleicos pueden codificar proteínas que incluyen, sin limitación, oligosacaril transferasas y/o glicosiltransferasas. Los ácidos nucleicos heterólogos (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican proteínas portadoras y/o ácidos nucleicos que codifican otras proteínas, por ejemplo, proteínas involucradas en la glicosilación) pueden ser introducidas en las células hospederas descritas en la presente usando cualquiera de los métodos conocidos por aquellos de habilidad en la técnica, por ejemplo, electroporación, transformación química por choque de calor, transformación natural, transducción del fago, y conjugación. En modalidades específicas, los ácidos nucleicos heterólogos son introducidos en las células hospederas descritas en la presente

usando un plásmido, por ejemplo, los ácidos nucleicos heterólogos son expresados en las células hospederas por un plásmido (por ejemplo, un vector de expresión). En otra modalidad específica, los ácidos nucleicos heterólogos son introducidos en las células hospederas descritas en la presente usando el método de inserción descrito en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/EP2013/068737.

En ciertas modalidades, pueden ser introducidas modificaciones adicionales (por ejemplo, usando técnicas recombinantes) en las células hospederas descritas en la presente. Por ejemplo, ácidos nucleicos de células hospederas (por ejemplo, genes) que codifican proteínas que forman parte de una trayectoria de glicosilación posiblemente de competencia o interferencia (por ejemplo, compiten o interfieren con uno o más genes heterólogos involucrados en la glicosilación que son recombinantemente introducidos en la célula hospedera) pueden ser suprimidos o modificados en el antecedente de la célula hospedera (genoma) en una manera que los hace inactivos/disfuncionales (es decir, los ácidos nucleicos de células hospederas que son suprimidos/modificados no codifican una proteína funcional o no codifican una proteína cualquiera). En ciertas modalidades, cuando los ácidos nucleicos son suprimidos del genoma de las células hospederas proporcionadas en la presente, son reemplazados por una secuencia deseable, por ejemplo, una secuencia que es útil para la producción de glicoproteína.

Genes ejemplares que pueden ser suprimidos en células hospederas (y en algunos casos, reemplazados con otras secuencias de ácido nucleico deseadas) incluyen genes de células hospederas involucrados en la biosíntesis del glicolípido, así como *waaL* (véase, por ejemplo, Feldman *et al.*, 2005, PNAS USA 102:3016-3021), el grupo de biosíntesis del núcleo lípido A (*waa*), grupo de galactosa (*gal*), grupo de arabinosa (*ara*), grupo de ácido colónico (*wc*), grupo de polisacárido capsular, genes de biosíntesis de undecaprenol-p (por ejemplo, *uppS*, *uppP*), genes de reciclaje und-P, enzimas metabólicas involucradas en la biosíntesis de azúcar activada por nucleótido, grupo de antígeno común enterobacteriano, y grupos de modificación de antígeno O profago como el grupo *gtrABS*. En una modalidad específica, las células hospederas descritas en la presente son modificadas de manera que no producen algún antígeno O distinto de un antígeno O deseado a partir de un ExPEC, por ejemplo, O25B. En una modalidad específica, uno o más del gen *waaL*, gen *gtrA*, gen *gtrB*, gen *gtrS*, o el grupo de genes *rfb* es suprimido o funcionalmente inactivado a partir del genoma de una célula hospedera procariótica proporcionada en la presente. En una

modalidad, una célula hospedera usada en la presente es *E. coli* que produce antígeno O25B, en donde el gen *waaL*, gen *gtrA*, gen *gtrB*, y gen *gtrS* son suprimidos o funcionalmente inactivados a partir del genoma de la célula hospedera. En otra modalidad, una célula hospedera usada en la presente es *E. coli* que produce antígeno O25B, en donde el gen *waaL* y gen *gtrS* son suprimidos o funcionalmente inactivados del genoma de la célula hospedera.

En ciertas modalidades, las células hospederas modificadas proporcionadas en la presente pueden ser usadas para glicosilación de la proteína. La glicosilación de la proteína puede ser designada para producir bioconjugados para uso en las formulaciones de vacunas, por ejemplo, vacunas que contienen antígeno(s) de polisacárido de *E. coli*, por ejemplo, O25 (por ejemplo, O25B), O1, O2 y O6.

5.3.2 Proteínas portadoras

Cualquier proteína portadora adecuada para uso en la producción de vacunas conjugadas (por ejemplo, bioconjugados para uso en vacunas) puede ser usada en la presente, por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican la proteína portadora pueden ser introducidos en un hospedero proporcionado en la presente para la producción de un bioconjugado que comprende una proteína portadora ligada a un antígeno de ExPEC (por ejemplo, O25B). Proteínas portadoras ejemplares incluyen, sin limitación, Exotoxina A destoxificada de *P. aeruginosa* (EPA; véase, por ejemplo, Ihssen, *et al.*, (2010) *Microbial cell factories* 9, 61), CRM 197, proteína de unión a maltosa (MBP), Difteria toxoide, Tétanos toxoide, hemolisina A destoxificada de *S. aureus*, factor de aglutinación A, factor de aglutinación B, FimH de *E. coli*, FimHC de *E. coli*, enterotoxina lábil al calor de *E. coli*, variantes destoxificadas de enterotoxina lábil al calor de *E. coli*, subunidad B de toxina del cólera (CTB), toxina del cólera, variantes destoxificadas de toxina del cólera, proteína Sat de *E. coli*, el dominio pasajero de la proteína Sat de *E. coli*, Neumolisina de *Streptococcus pneumoniae* y variantes destoxificadas de los mismos, AcrA de *C. jejuni*, y glicoproteínas naturales de *C. jejuni*. Para EPA, varias variantes de proteína destoxificada han sido descritas en la literatura y podrían ser usadas como proteínas portadoras.

En ciertas modalidades, las proteínas portadoras usadas en la generación de los bioconjugados descritos en la presente son modificadas, por ejemplo, modificadas en tal forma que la proteína es menos tóxica y/o más susceptible a glicosilación. En una modalidad específica, las proteínas portadoras usadas en la generación de los bioconjugados descritos en la presente son modificadas de manera que el número de sitios de glicosilación en las proteínas

portadoras es maximizado en una manera que permite concentraciones inferiores de la proteína ser administradas, por ejemplo, en una composición inmunogénica, en su forma de bioconjugado.

En ciertas modalidades, las proteínas portadoras descrita en la presente son modificadas para incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más sitios de glicosilación que los que podrían ser normalmente asociados con la proteína portadora (por ejemplo, con relación al número de sitios de glicosilación asociados con la proteína portador en su estado nativo/natural, por ejemplo, “tipo silvestre”). En modalidades específicas, la introducción de sitios de glicosilación se realiza por inserción de secuencias consenso de glicosilación (por ejemplo, Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987)) en cualquier sitio en la estructura primaria de la proteína. La introducción de tales sitios de glicosilación puede ser realizada mediante, por ejemplo, agregar nuevos aminoácidos a la estructura primaria de la proteína (es decir, los sitios de glicosilación son agregados, en todo o en parte), o mutando aminoácidos existentes en la proteína con el fin de generar los sitios de glicosilación (es decir, los aminoácidos no son agregados a la proteína, sino los aminoácidos seleccionados de la proteína son mutados para así formar sitios de glicosilación). Aquellos de habilidad en la técnica reconocerán que la secuencia de aminoácido de la proteína puede ser fácilmente modificada usando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, procedimientos recombinantes que incluyen modificación de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína. En modalidades específicas, las secuencias consenso de glicosilación son introducidas en regiones específicas de la proteína portadora, por ejemplo, estructuras de superficie de la proteína, en el término N o C de la proteína, y/o en bucles que son estabilizados por puentes disulfuro en la base de la proteína. En ciertas modalidades, la secuencia consenso de glicosilación de 5 aminoácidos clásicos puede ser extendida por residuos de lisina para glicosilación más eficiente, y de este modo, la secuencia consenso insertada puede codificar 5, 6, o 7 amino ácidos que deben ser insertados o que reemplazan los aminoácidos de la proteína aceptora. En una modalidad particular una proteína portadora es EPA destoxificada que comprende 4 secuencias de glicosilación consenso Asp/Glu-X-Asn-Z-Ser/Thr (SEQ ID NO:15), y tiene una secuencia de aminoácido como se proporciona en la SEQ ID NO:13.

En ciertas modalidades, las proteínas portadoras usadas en la

generación de los bioconjugados descritos en la presente comprenden una “etiqueta”, es decir, una secuencia de aminoácidos que permite el aislamiento y/o identificación de la proteína portadora. Por ejemplo, agregar una etiqueta a una proteína portadora descrita en la presente puede ser útil en la purificación de tal proteína y, por lo tanto, la purificación de vacunas conjugadas que comprenden la proteína portadora etiquetada. Las etiquetas ejemplares que pueden ser usadas en la presente incluyen, sin limitación, etiquetas de histidina (HIS) (por ejemplo, etiquetas de hexa histidina, o Etiqueta-6XHis), ETIQUETA-FLAG, y etiquetas HA. En ciertas modalidades, las etiquetas usadas en la presente son removibles, por ejemplo, remoción por agentes químicos o por medios enzimáticos, una vez que no son más necesarias, por ejemplo, después que la proteína ha sido purificada.

En ciertas modalidades, las proteínas portadoras descrita en la presente comprenden una secuencia señal que dirige la proteína portadora al espacio periplásmico de la célula hospedera que expresa la proteína portadora. En una modalidad específica, la secuencia señal es de DsbA de *E. coli*, porina A de membrana externa de *E. coli* (OmpA), proteína de unión a maltosa de *E. coli* (MalE), pectato liasa de *Erwinia carotovora* (PelB), endoxilanasas de Flgl, NikA, o *Bacillus sp.* (XynA), enterotoxina de *E. coli* lábil al calor LTIIb, *Bacillus endoxilanasas* de XynA, o flagelina de *E. coli* (Flgl).

5.3.3 Maquinaria de Glicosilación

Las células hospederas proporcionadas en la presente comprenden, y/o pueden ser modificadas para comprender, ácidos nucleicos que codifican la maquinaria genética (por ejemplo, glicosiltransferasas) capaces de producir antígenos O de ExPEC, por ejemplo, los antígenos O25 (por ejemplo, O25B), O1, O2, y/o O6. Véase Sección 5.1.

Glicosiltransferasas

Las células hospederas proporcionadas en la presente comprenden ácidos nucleicos que codifican glicosiltransferasas capaces de producir antígenos O de ExPEC, por ejemplo, un antígeno O de *E. coli* del serotipo O25 (por ejemplo, O25A u O25B, véase Figura 3B), O1 (véase Figura 12), O2 (véase Figura 19), y O6 (por ejemplo, un serotipo O6 que produce un antígeno O6 que comprende un monosacárido Glc de ramificación o un antígeno O6 que comprende un monosacárido GlcNAc de ramificación, véase Figura 17). Ácidos nucleicos ejemplares son descritos en la Sección 5.1. En ciertas modalidades, algunos o todos de los ácidos nucleicos que codifican glicosiltransferasas capaces de producir un antígeno O de ExPEC son naturalmente expresados por las células hospederas proporcionadas en la presente (por ejemplo, los ácidos nucleicos

están presentes en el antecedente de “tipo silvestre” de la célula hospedera). En ciertas modalidades, algunos o todos de los ácidos nucleicos que codifican glicosiltransferasas capaces de producir un antígeno O de ExPEC no son naturalmente expresados por las células hospederas proporcionadas en la presente, es decir, algunos o todos de los ácidos nucleicos son heterólogos a la célula hospedera. Las células hospederas pueden ser diseñadas por ingeniería para comprender ácidos nucleicos específicos, por ejemplo, los ácidos nucleicos descrito en la Sección 5.1, usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, los métodos descritos en la Sección 5.3.

En una modalidad específica, las células hospederas proporcionadas en la presente comprenden ácidos nucleicos que codifican glicosiltransferasas capaces de producir un antígeno O de *E. coli* del serotipo O25B, es decir, un antígeno O25B descrito en la presente. En una modalidad específica, tales ácidos nucleicos codifican el grupo *rfb* de upec138 (SEQ ID NO:12), o un grupo de genes que es aproximadamente o al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a, u homólogo a la SEQ ID NO:12.

En otra modalidad específica, tales ácidos nucleicos codifican el grupo *rfb* de upec163, o un grupo de genes que es aproximadamente o al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a, u homólogo al grupo *rfb* de upec163. En otra modalidad específica, tales ácidos nucleicos codifican el grupo *rfb* de upec177, o un grupo de genes que es aproximadamente o al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a, u homólogo al grupo *rfb* de upec177.

En otra modalidad específica, tales ácidos nucleicos que codifican glicosiltransferasas capaces de producir un antígeno O de *E. coli* del serotipo O25B son genes de un serotipo O25B, en donde tales genes son *rmIB* (SEQ ID NO:1), *rmID* (SEQ ID NO:2), *rmIA* (SEQ ID NO:3), *rmIC* (SEQ ID NO:4), *wzx* (SEQ ID NO:5), *wekA* (SEQ ID NO:6), *wekB* (SEQ ID NO:7), *wzy* (SEQ ID NO:8), *wbbJ* (SEQ ID NO:9), *wbbK* (SEQ ID NO:10), y *wbbL* (SEQ ID NO:11). Véase tablas 3 y 9.

En una modalidad específica, las células hospederas proporcionadas en la presente comprenden ácidos nucleicos que codifican proteínas (por ejemplo, glicosiltransferasas) capaces de producir un antígeno O de *E. coli* del serotipo O25A, es decir, un antígeno O25A descrito en la presente. En otra modalidad específica, tales ácidos nucleicos que codifican proteínas (por ejemplo, glicosiltransferasas) capaces de producir un antígeno O de *E. coli* del serotipo O25A son genes de un serotipo O25, en donde tales genes son *rmIB*, *rmID*, *rmIA*,

rmlC, *wzx*, *wekA*, *wekB*, *wekC*, *wzy*, *fliA*, *fliB*, *fliC*, *wbuB*, *ylo wbuC*. Véase Wang, *et al.*, (2010) J Clin Microbiol 48, 2066-2074; GenBank GU014554; y Tabla 2.

En otra modalidad específica, las células hospederas proporcionadas en la presente comprenden ácidos nucleicos que codifican glicosiltransferasas capaces de producir un antígeno O *E. coli* del serotipo O2. En otra modalidad específica, tales ácidos nucleicos que codifican glicosiltransferasas capaces de producir un antígeno O de *E. coli* del serotipo O2 son genes de un serotipo O2, en donde tales genes son *rmlB*, *rmlD*, *rmlA*, *rmlC*, *wzx*, *wekP*, *wekQ*, *wekR*, *wzy*, *fdtA*, *fdtB*, *ylo fdtC*. Véase Li, *et al.*, (2010) J Microbiol Methods 82, 71-77; Fratamico, *et al.*, 2010, Canadian Journal of Microbiology 56, 308-316; y Tabla 5.

En otra modalidad específica, las células hospederas proporcionadas en la presente comprenden ácidos nucleicos que codifican glicosiltransferasas capaces de producir un antígeno O *E. coli* del serotipo O6. Véase Welch *et al.*, 2002, PNAS USA 99(26): 17020-17024; Jann *et al.*, Carbohydr. Res. 263 (1994) 217-225, y Jansson *et al.*, Carbohydr. Res. 131 (1984) 277-283. En una modalidad específica, tal serotipo O6 comprende un monosacárido Glc ramificado.

En otra modalidad específica, las células hospederas proporcionadas en la presente comprenden ácidos nucleicos que codifican glicosiltransferasas capaces de producir un antígeno O *E. coli* del serotipo O1. En una modalidad específica, tal serotipo O1 es O1A. En otra modalidad específica, tales ácidos nucleicos que codifican glicosiltransferasas capaces de producir un antígeno O de *E. coli* del serotipo O1 son genes de un serotipo O1, en donde tales genes son *rmlB*, *rmlD*, *rmlA*, *rmlC*, *wzx*, *mnaA*, *wekM*, *wzy*, *wekN*, *ylo wekO*.

Oligosacaril Transferasas

Las oligosacaril transferasas transfieren oligosacáridos ligados al lípido a residuos de asparagina de cadenas de polipéptidos nacientes que comprenden una porción consenso de N-glicosilación, por ejemplo, Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15) (véase documento WO 2006/119987). Véase, por ejemplo, documentos WO 2003/074687 y WO 2006/119987, las descripciones de los cuales están en la presente incorporados por referencia en su totalidad.

En ciertas modalidades, las células hospederas proporcionadas en la presente comprenden un ácido nucleico que codifican una oligosacaril transferasa. El ácido nucleico que codifican una oligosacaril transferasa puede ser nativo a la

célula hospedera, o puede ser introducido en la célula hospedera usando procedimientos genéticos, como se describe anteriormente. La oligosacaril transferasa puede ser de cualquier fuente conocida en la técnica. En una modalidad específica, la oligosacaril transferasa es una oligosacaril transferasa de *Campylobacter*. En otra modalidad específica, la oligosacaril transferasa es una oligosacaril transferasa de *Campylobacter jejuni* (es decir, pglB; véase, por ejemplo, Wacker *et al.*, 2002, Science 298: 1790-1793; véase también, por ejemplo, NCBI Gene ID: 3231775, UniProt Accession No. 086154). En otra modalidad específica, la oligosacaril transferasa es una oligosacaril transferasa de *Campylobacter lari* (véase, por ejemplo, NCBI Gene ID: 7410986).

5.4 Bioconjugados

En ciertas modalidades, las células hospederas descritas en la presente pueden ser usadas para producir bioconjugados que comprenden un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (por ejemplo, O25B; véase Sección 5.2) ligado a una proteína portadora. Los métodos para producir tales bioconjugados usando células hospederas se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, documentos WO 2003/074687 y WO 2006/119987.

Alternativamente, los glicoconjugados pueden ser preparados por síntesis química, es decir, preparados fuera de las células hospederas (*in vitro*). Por ejemplo, los antígenos O de *E. coli* descritos en la presente, por ejemplo, O25B, pueden ser conjugados a proteínas portadoras usando métodos conocidos por aquellos de habilidad en la técnica, incluyendo por medio de usar grupos reactivos de activación en el polisacárido/oligosacárido, así como también la proteína portadora. Véase, por ejemplo, Pawlowski *et al.*, 2000, Vaccine 18: 1873-1885; y Robbins, *et al.*, 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106:7974-7978), las descripciones de las cuales están en la presente incorporadas por referencia. Tales procedimientos comprenden extracción de polisacáridos/oligosacáridos antigénicos de células hospederas, purificación de polisacáridos/oligosacáridos, activación químicamente de polisacáridos/oligosacáridos, y conjugación de polisacáridos/oligosacáridos a una proteína portadora.

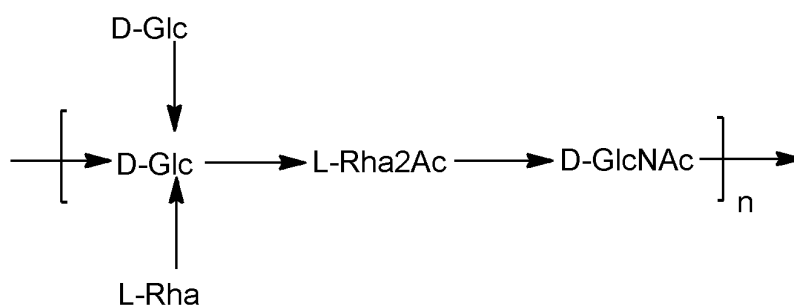
Los bioconjugados, como se describe en la presente, tiene propiedades ventajosas sobre los glicoconjugados, por ejemplo, los bioconjugados requieren medios químicos en la manufactura y son más consistentes en términos del producto final generado. De este modo, los bioconjugados son preferidos sobre los glicoconjugados químicamente producidos.

En una modalidad específica, proporcionados en la presente están bioconjugados que comprenden una proteína portadora ligada a un antígeno O de

ExPEC descrito en la presente. Véase Sección 5.2.

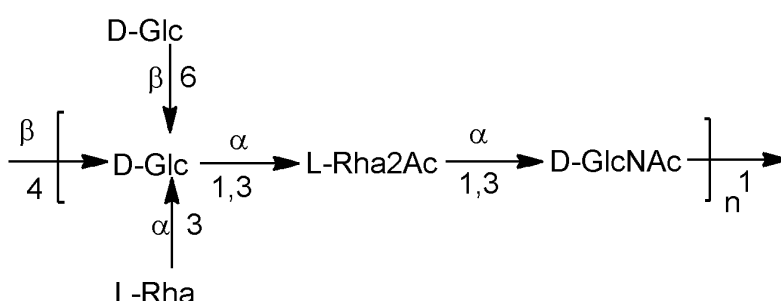
En una modalidad específica, se proporciona en la presente un bioconjugado que comprende una proteína portadora (por ejemplo, EPA) N-ligado a O25B de *E. coli*.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente un bioconjugado que comprende una proteína portadora (por ejemplo, EPA) ligada a un compuesto de Fórmula O25B presentada abajo:



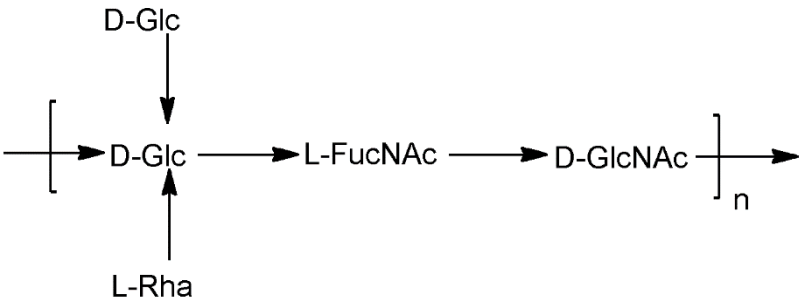
en donde n es un entero entre 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 10 a 30, 15 a 30, 20 a 30, 25 a 30, 5 a 25, 10 a 25, 15 a 25, 20 a 25, 10 a 20, o 15 a 20. En una modalidad específica, la proteína portadora está N-ligada al antígeno O de la Fórmula O25B, es decir, O25B está ligado al residuo Asn de una proteína portadora que comprende la secuencia Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO:14); o una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO:15).

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente un bioconjugado que comprende una proteína portadora (por ejemplo, EPA) ligada a un compuesto de Fórmula O25B', presentada abajo:

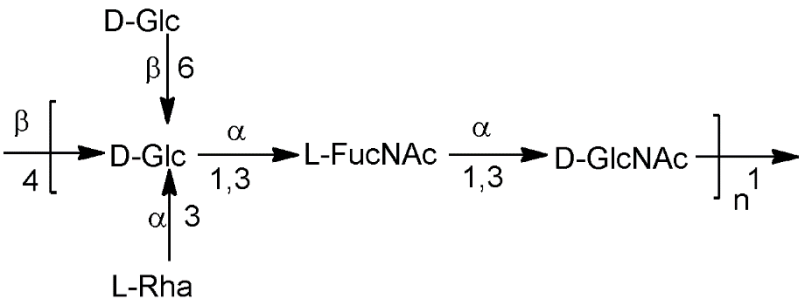


en donde n es un entero entre 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 10 a 30, 15 a 30, 20 a 30, 25 a 30, 5 a 25, 10 a 25, 15 a 25, 20 a 25, 10 a 20, o 15 a 20. En una modalidad específica, la proteína portadora está N-ligada al antígeno O de la Fórmula O25B'.

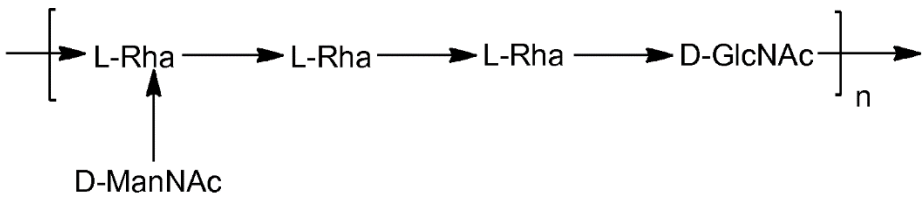
En otra modalidad específica, se proporciona en la presente un bioconjugado que comprende una proteína portadora (por ejemplo, EPA) ligada a un antígeno O25A. En una modalidad específica, tal antígeno O25A comprende la fórmula O25A:



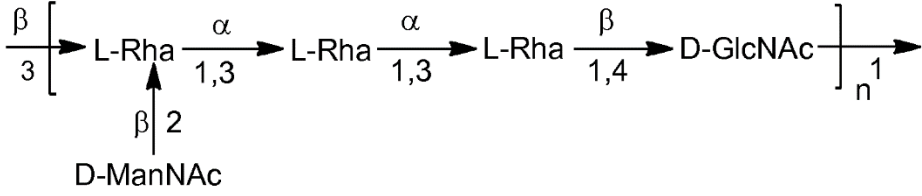
o O25A':



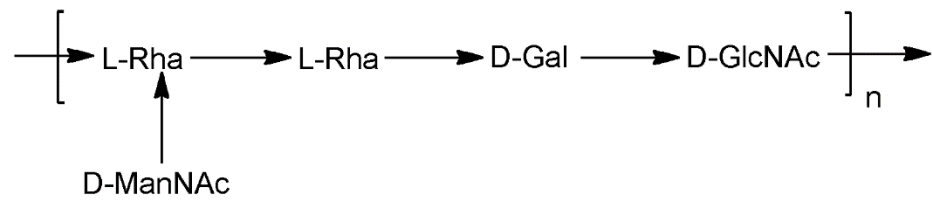
En otra modalidad específica, se proporciona en la presente un bioconjugado que comprende una proteína portadora (por ejemplo, EPA) ligada a un antígeno O1. En una modalidad específica, tal antígeno O1 es O1A, por ejemplo, tal antígeno comprende la fórmula O1A:



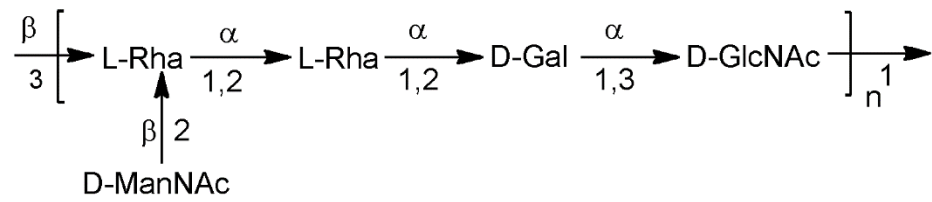
o O1A':



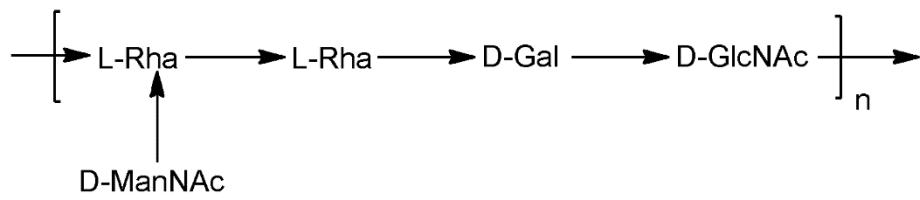
En otra modalidad específica, tal antígeno O1 es O1B, por ejemplo, tal antígeno comprende la fórmula O1B:



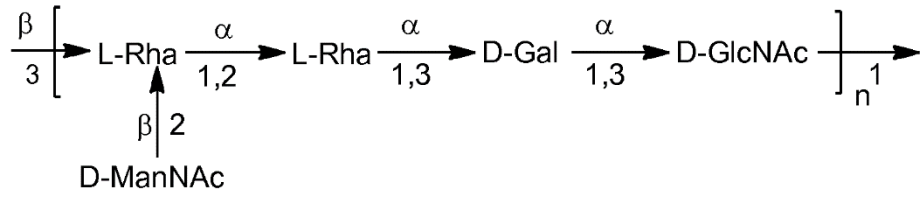
o O1B’:



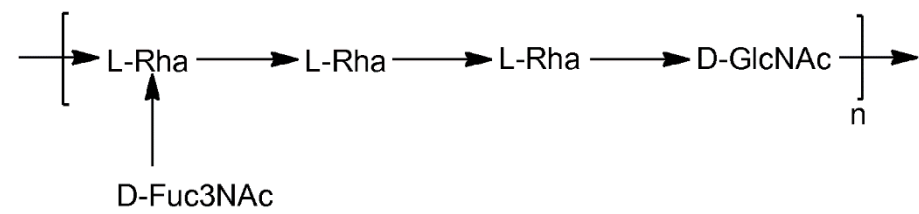
En otra modalidad específica, tal antígeno O1 es O1C, por ejemplo, tal antígeno comprende la fórmula O1C:



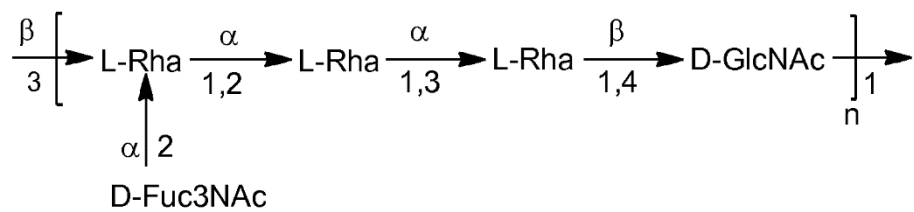
o O1C’:



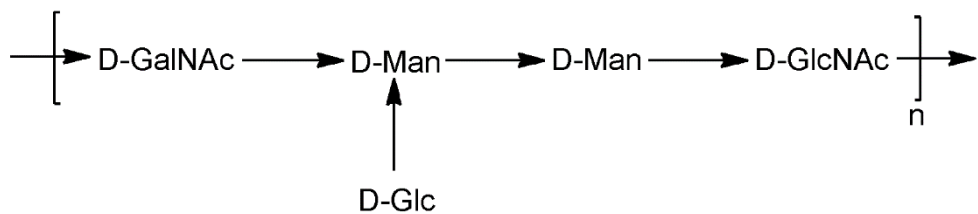
En otra modalidad específica, se proporciona en la presente un bioconjugado que comprende una proteína portadora (por ejemplo, EPA) ligada a un antígeno O2. En una modalidad específica, tal O2 antígeno comprende la fórmula O2:



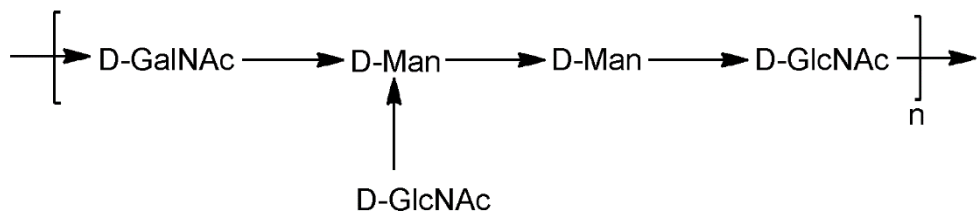
o O2’



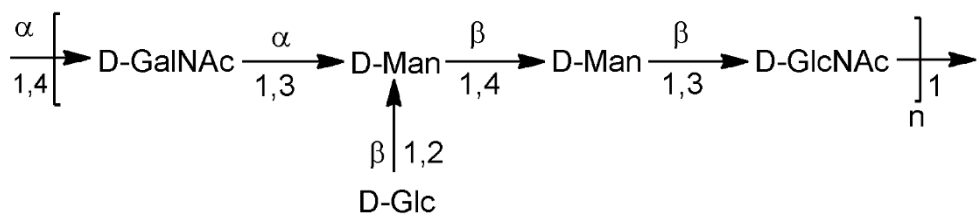
En otra modalidad específica, se proporciona en la presente un bioconjugado que comprende una proteína portadora (por ejemplo, EPA) ligada a un antígeno O6. En una modalidad específica, tal O6 antígeno comprende la fórmula O6Glc:



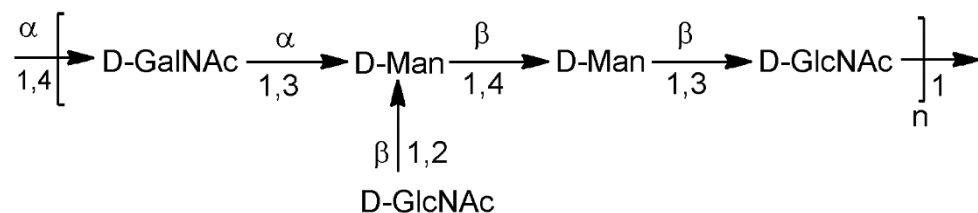
O6GlcNAc:



O6Glc':



o O6GlcNAc':



Los bioconjugados descritos en la presente pueden ser purificados por cualquier método conocido en la técnica para purificación de una proteína, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, intercambio aniónico, afinidad, y cromatografía de columna de clasificación), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Véase, por ejemplo, Saraswat *et al.*, 2013, Biomed. Res. Int. ID#312709 (p. 1-18); véase también los métodos descritos en el documento WO 2009/104074. Además, los bioconjugados pueden ser fusionados a secuencias de polipéptidos heterólogas descritas en la presente o de otro modo conocidas en la técnica para facilitar la purificación. Las condiciones actuales usadas para purificar un

bioconjugado particular dependerán, en parte, de la estrategia de síntesis (por ejemplo, producción sintética contra producción recombinante) y de factores tales como la carga neta, hidrofobicidad, y/o hidrofiliidad del bioconjugado, será aparente para aquellos que tienen habilidad en la técnica.

5.5 Anticuerpos contra O25B

El antígeno O25B descrito en la presente (véase Sección 5.2) y/o bioconjugados que comprenden el antígeno O25B descrito en la presente (véase Sección 5.4) pueden ser usados para estimular anticuerpos neutralizantes contra ExPEC. En una modalidad específica, el antígeno O25B descrito en la presente y/o bioconjugados que comprenden el antígeno O25B descrito en la presente pueden ser administrados a un sujeto (por ejemplo, un humano, ratón, conejo, rata, cobayo, etc.) para inducir una respuesta inmune que incluye la producción de anticuerpo. Tales anticuerpos pueden ser aislados usando técnicas conocidas por uno de habilidad en la técnica (por ejemplo, cromatografía de inmutioafinidad, centrifugación, precipitación, etc.).

Además, el antígeno O25B descrito en la presente puede ser usado para seleccionar anticuerpos a partir de bibliotecas de anticuerpos. Por ejemplo, el O25B aislado puede ser inmutioalizado a un soporte sólido (por ejemplo, un gel de sílice, una resina, una película plástica derivada, una perilla de vidrio, algodón, una perilla de plástico, una perilla de poliestireno, un gel de alúmina, o un polisacárido, una perilla magnética), y seleccionado para unión a anticuerpos. Como una alternativa, los anticuerpos que serán seleccionados pueden ser inmutioalizados a un soporte sólido y seleccionados para unión a O25B. Cualquier ensayo de selección, tal como un ensayo de paneo, ELISA, resonancia de plasmón de superficie, u otro ensayo de selección de anticuerpo conocido en la técnica, puede ser usado para seleccionar anticuerpos que se unen a O25B. La biblioteca de anticuerpo seleccionada puede ser una biblioteca de anticuerpo comercialmente disponible, una biblioteca generada *in vitro*, o una biblioteca obtenida por identificación y clonación o aislamiento de anticuerpos a partir de un individuo infectado con EXPEC. Las bibliotecas de anticuerpo pueden ser generadas de conformidad con los métodos conocidos en la técnica. En una modalidad particular, la biblioteca de anticuerpo es generada por clonación de los anticuerpos y usándolos en las bibliotecas de despliegue de fago o una biblioteca de despliegue de fagémido.

Los anticuerpos identificados o estimulados usando O25B y/o un bioconjugado de O25B pueden incluir moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas

que contienen un sitio de unión al antígeno que se unen específicamente a O25B. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂) o subclases de moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, Fvs de cadena única (scFv), anticuerpos de cadena única, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fvs ligados a disulfuro (sdFv), y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (que incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-Id a anticuerpos estimulados o identificados usando un método descrito en la presente), y fragmentos de unión al epítipo de cualquiera de los anteriores. En una modalidad específica, un anticuerpo estimulado o identificado usando O25B y/o un bioconjugado de O25 B es un anticuerpo monoclonal humanizado o humano.

Los anticuerpos estimulados o identificados usando O25B y/o un bioconjugado de O25B pueden ser usados para monitorear la eficacia de una terapia y/o progreso de la enfermedad. Un sistema de inmunoensayo conocido en la técnica puede ser usado para este propósito que incluye, pero no se limita a, sistemas de ensayo competitivo y no competitivo usando técnicas tales como radioinmunoensayos, ELISA (ensayos inmunosorbentes ligados a la enzima), inmunoensayos "intercalados", reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A y ensayos de inmunoelectroforesis.

Los anticuerpos estimulados o identificados usando O25B y/o un bioconjugado de O25B pueden ser usados para detectar cepas O25B de *E. coli*, por ejemplo, de una pluralidad de cepas de *E. coli* y/o diagnosticar una infección por una cepa O25B de *E. coli*.

5.6 Composiciones

5.6.1 Composiciones que Comprenden Células hospederas

En un aspecto, proporcionadas en la presente están composiciones que comprenden las células hospederas descritas en la presente. Tales composiciones pueden ser usadas en los métodos para generar los bioconjugados descritos en la presente (véase Sección 5.4), por ejemplo, las composiciones pueden ser cultivadas bajo condiciones adecuadas para la producción de proteínas. Subsecuentemente, los bioconjugados pueden ser aislados de tales composiciones usando métodos conocidos en la técnica.

Las composiciones que comprenden las células hospederas

proporcionadas en la presente, pueden comprender componentes adicionales adecuados para el mantenimiento y supervivencia de las células hospederas descritas en la presente, y pueden comprender adicionalmente compuestos adicionales requeridos o benéficos para la producción de proteínas por las células hospederas, por ejemplo, inductores para promotores inducibles, tales como arabinosa, IPTG.

5.6.2 Composiciones que Comprenden Antígenos y/o Bioconjugados

En otro aspecto, proporcionadas en la presente están composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) que comprenden uno o más de los antígenos O de *E. coli* descritos en la presente (véase Sección 5.2) y composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) que comprenden uno o más de los bioconjugados descritos en la presente (véase Sección 5.4). En una modalidad específica, una composición proporcionada en la presente comprende uno o más de los antígenos O de *E. coli* descritos en la presente (véase Sección 5.2). En otra modalidad específica, una composición proporcionada en la presente comprende uno o más de los bioconjugados descritos en la presente (véase Sección 5.4). En otra modalidad específica, una composición proporcionada en la presente comprende uno o más de los antígenos O de *E. coli* descritos en la presente (véase Sección 5.2) y uno o más de los bioconjugados descritos en la presente (véase Sección 5.4). Las composiciones descritas en la presente son útiles en el tratamiento y prevención de infección de sujetos (por ejemplo, sujetos humanos) con *E. coli* patogénico extra-intestinal (ExPEC). Véase Sección 5.7.

En ciertas modalidades, además de comprender un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2) y/o un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), las composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) descritas en la presente comprenden un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en la presente, el término “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno estatal o Federal, o listado en la Farmacopea Estadounidense o en otra farmacopea en general reconocida para uso en animales, y más particularmente en humanos. El término “portador”, como se usa en la presente en el contexto de un portador farmacéuticamente aceptable, se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo, con el cual se administra la composición farmacéutica. Las soluciones salinas y dextrosa acuosa y soluciones de glicerol también pueden ser empleadas como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables.

Los excipientes adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en “Remington's Pharmaceutical Sciences” por E.W. Martin.

En una modalidad específica, se proporciona en la presente una composición que comprende una proteína portadora (por ejemplo, una proteína portadora descrita en la Sección 5.3.2) ligada a un antígeno descrito en la presente, por ejemplo, un antígeno O de ExPEC descrito en la Sección 5.2.

En otra modalidad específica, una composición proporcionada en la presente comprende una proteína portadora (por ejemplo, una proteína portadora descrita en la Sección 5.3.2, por ejemplo, EPA o MBP) ligada a O25B de *E. coli* (véase Sección 5.2).

En otra modalidad específica, una composición proporcionada en la presente comprende una proteína portadora (por ejemplo, una proteína portadora descrita en la Sección 5.3.2, por ejemplo, EPA o MBP) ligada a O25A de *E. coli* (véase Sección 5.2).

En otra modalidad específica, una composición proporcionada en la presente comprende una proteína portadora (por ejemplo, una proteína portadora descrita en la Sección 5.3.2, por ejemplo, EPA o MBP) ligada a O1 de *E. coli* (véase Sección 5.2). En otra modalidad específica, tal macromolécula de O1 es O1A. En otra modalidad específica, tal macromolécula de O1 es O1B. En otra modalidad específica, tal macromolécula de O1 es O1C.

En otra modalidad específica, una composición proporcionada en la presente comprende una proteína portadora (por ejemplo, una proteína portadora descrita en la Sección 5.3.2, por ejemplo, EPA o MBP) ligada a O2 de *E. coli* (véase Sección 5.2).

En otra modalidad específica, una composición proporcionada en la presente comprende una proteína portadora (por ejemplo, una proteína portadora descrita en la Sección 5.3.2, por ejemplo, EPA o MBP) ligada a O6 de *E. coli* (véase Sección 5.2). En una modalidad específica, tal macromolécula de O6 es una macromolécula de O6 que comprende un monosacárido Glc de ramificación.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende (i) una macromolécula de O25 (por ejemplo, O25A u O25B), o un bioconjugado que comprende O25 (por ejemplo, O25A u O25B) y (ii) una macromolécula de O1 o un bioconjugado que comprende O1. Véase Sección 5.2. En una modalidad

específica, tal macromolécula de O25 es una macromolécula de O25B. En otra modalidad específica, tal macromolécula de O1 es O1A. En otra modalidad específica, tal macromolécula de O1 es O1B. En otra modalidad específica, tal macromolécula de O1 es O1C.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende (i) una macromolécula de O25 (por ejemplo, O25A u O25B), o un bioconjugado que comprende O25 (por ejemplo, O25A u O25B) y (ii) una macromolécula de O2 o un bioconjugado que comprende O2. Véase Secciones 5.2 y 5.4. En una modalidad específica, tal macromolécula de O25 es una macromolécula de O25B.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende (i) una macromolécula de O25 (por ejemplo, O25A u O25B), o un bioconjugado que comprende O25 (por ejemplo, O25A u O25B) y (ii) una macromolécula de O6 (por ejemplo, una macromolécula de O6 que comprende un monosacárido Glc de ramificación o un monosacárido GlcNAc de ramificación) o un bioconjugado que comprende O6. Véase Secciones 5.2 y 5.4. En una modalidad específica, tal macromolécula de O25 es una macromolécula de O25B. En otra modalidad específica, tal macromolécula de O6 es una macromolécula de O6 que comprende un monosacárido Glc de ramificación.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende O25B de *E. coli* (véase Sección 5.2) o un bioconjugado que comprende O25 (véase Sección 5.4) y al menos uno de los siguientes: (i) O1 de *E. coli* o un bioconjugado que comprende O1 (véase Secciones 5.2 y 5.4); (ii) O2 de *E. coli* o un bioconjugado que comprende O2 (véase Secciones 5.2 y 5.4); y/o (iii) O6 de *E. coli* o un bioconjugado que comprende O6 (véase Secciones 5.2 y 5.4). En otra modalidad específica, tal O1 es O1A. En otra modalidad específica, tal O1 es O1B. En otra modalidad específica, tal O1 es O1 C. En otra modalidad específica, tal O6 es O6 que comprende un monosacárido Glc de ramificación.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende al menos dos de los siguientes: (i) una macromolécula de O25 (por ejemplo, O25A u O25B) o un bioconjugado que comprende O25 (por ejemplo, O25A u O25B); (ii) una macromolécula de O1 o un bioconjugado que comprende O1; (iii) una macromolécula de O2 o un bioconjugado que comprende O2; y/o (iv) una macromolécula de O6 (por ejemplo, una macromolécula de O6 que comprende un

monosacárido Glc de ramificación o un monosacárido GlcNAc de ramificación) o un bioconjugado que comprende O6. En una modalidad específica, tal macromolécula de O25 es una macromolécula de O25B. En otra modalidad específica, tal macromolécula de O1 es O1A. En otra modalidad específica, tal macromolécula de O1 es O1B. En otra modalidad específica, tal macromolécula de O1 es O1C. En otra modalidad específica, tal macromolécula de O6 es una macromolécula de O6 que comprende un monosacárido Glc de ramificación.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende un bioconjugado que comprende O25B de *E. coli* y un bioconjugado que comprende O1A de *E. coli*. Tales bioconjugados son descritos en la Sección 5.4.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende un bioconjugado que comprende O25B de *E. coli* y un bioconjugado que comprende O1B de *E. coli*. Tales bioconjugados son descritos en la Sección 5.4.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende un bioconjugado que comprende O25B de *E. coli* y un bioconjugado que comprende O1C de *E. coli*. Tales bioconjugados son descritos en la Sección 5.4.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende un bioconjugado que comprende O25B de *E. coli* y un bioconjugado que comprende O2 de *E. coli*. Tales bioconjugados son descritos en la Sección 5.4.

En otra modalidad específica, se proporciona en la presente una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende un bioconjugado que comprende O25B de *E. coli* y un bioconjugado que comprende O6 de *E. coli*. Tales bioconjugados son descritos en la Sección 5.4.

En otra modalidad específica, una composición proporcionada en la presente comprende una proteína portadora (por ejemplo, una proteína portadora descrita en la Sección 5.3.2, por ejemplo, EPA o MBP) ligada a O25B de *E. coli* (véase Sección 5.2), (ii) una proteína portadora (por ejemplo, una proteína portadora descrita en la Sección 5.3.2, por ejemplo, EPA o MBP) ligada a un antígeno O de *E. coli* del serotipo O1, por ejemplo, O1A (véase Sección 5.2), (iii) una proteína portadora (por ejemplo, una proteína portadora descrita en la

Sección 5.1.2, por ejemplo, EPA o MBP) ligada a un antígeno O de *E. coli* del serotipo O2 (véase Sección 5.2), y (iv) una proteína portadora (por ejemplo, una proteína portadora descrita en la Sección 5.3.2, por ejemplo, EPA o MBP) ligada a un antígeno O de *E. coli* del serotipo O6 (véase Sección 5.2).

En ciertas modalidades, las composiciones anteriores comprenden una proteína portadora (por ejemplo, una proteína portadora descrita en la Sección 5.3.2, por ejemplo, EPA o MBP) ligada a un antígeno O de *E. coli* de un serotipo de *E. coli* distinto de O1, O2, O6, u O25. Otros serotipos de *E. coli* útiles se describen, por ejemplo, en el Ejemplo 1 y Tabla 1, abajo.

En otra modalidad específica, una composición proporcionada en la presente comprende una macromolécula de O25 (por ejemplo, O25A u O25B).

En otra modalidad específica, una composición proporcionada en la presente comprende una macromolécula de O1 (por ejemplo, O1A, O1B, o O1C).

En otra modalidad específica, una composición proporcionada en la presente comprende una macromolécula de O2.

En otra modalidad específica, una composición proporcionada en la presente comprende una macromolécula de O6 (por ejemplo, una macromolécula de O6 que comprende un monosacárido Glc de ramificación o un monosacárido GlcNAc de ramificación).

En otra modalidad específica, una composición proporcionada en la presente comprende una macromolécula de O25 (por ejemplo, O25A u O25B), una macromolécula de O1, una macromolécula de O2, y una macromolécula de O6 (por ejemplo, una macromolécula de O6 que comprende un monosacárido Glc de ramificación o un monosacárido GlcNAc de ramificación). En una modalidad específica, tal macromolécula de O25 es una macromolécula de O25B. En otra modalidad específica, tal macromolécula de O1 es O1A. En otra modalidad específica, tal macromolécula de O6 es una macromolécula de O6 que comprende un monosacárido Glc de ramificación.

Las composiciones proporcionadas en la presente pueden ser usadas para provocar una respuesta inmune en un hospedero a quien la composición es administrada, es decir, son inmunogénicas. De este modo, las composiciones descritas en la presente pueden ser usadas como vacunas contra la infección de ExPEC, o pueden ser usadas en el tratamiento de la infección de ExPEC, y pueden, por consiguiente, ser formuladas como composiciones farmacéuticas. Véase Sección 5.7.

Las composiciones que comprenden los bioconjugados y/o macromoléculas descritos en la presente pueden comprender cualquiera de los

componentes adicionales adecuados para uso en la administración farmacéutica. En modalidades específicas, las composiciones descritas en la presente, son formulaciones monovalentes. En otras modalidades, las composiciones descritas en la presente, son formulaciones multivalentes, por ejemplo, formulaciones bivalentes, trivalentes y tetravalentes. Por ejemplo, una formulación multivalente comprende más de un bioconjugado o antígeno O de *E. coli* descrito en la presente. Véase Secciones 5.2 y 5.4 para descripción del antígeno O de *E. coli* y bioconjugados, respectivamente. En una modalidad específica, una composición descrita en la presente es una formulación tetravalente que comprende una macromolécula o bioconjugado, en donde tales valencias son de antígenos O de *E. coli* de los serotipos/subserotipos O25B, O1A, O6, y O2.

En ciertas modalidades, las composiciones descritas en la presente comprenden adicionalmente un preservativo, por ejemplo, el derivado de mercurio timerosal. En una modalidad específica, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente comprenden 0.001% hasta 0.01% de timerosal. En otras modalidades, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente no comprenden un preservativo.

En ciertas modalidades, las composiciones descritas en la presente (por ejemplo, las composiciones inmunogénicas) comprenden, o son administradas en combinación con, un adyuvante. El adyuvante para administración en combinación con una composición descrita en la presente puede ser administrado antes, concomitantemente con, o después de la administración de tal composición. En algunas modalidades, el término “adyuvante” se refiere a un compuesto que cuando se administra en conjunto con, o como parte de una composición descrita en la presente, aumenta, mejora y/o refuerza la respuesta inmune a un bioconjugado, pero cuando el compuesto es administrado solo, no genera una respuesta inmune al bioconjugado. En algunas modalidades, el adyuvante genera una respuesta inmune al péptido poli bioconjugado y no produce una alergia u otra reacción adversa. Los adyuvantes pueden mejorar una respuesta inmune por varios mecanismos, que incluyen, por ejemplo, reclutamiento del linfocito, estimulación de células B y/o T, y estimulación de macrófagos.

Ejemplos específicos de adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, sales de aluminio (alum) (tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, y sulfato de aluminio), monofosforil lípido A 3 Des-O-acilado (MPL) (véase Patente del Reino Unido GB2220211), MF59 (Novartis), AS03 (Glaxo SmithKline), AS04 (Glaxo SmithKline), polisorbato 80 (Tween 80; ICL Americas, Inc.), compuestos de

imidazopiridina (véase Solicitud Internacional No. PCT/US2007/064857, publicada como Publicación Internacional No. WO2007/109812), compuestos de imidazoquinoxalina (véase Solicitud Internacional No. PCT/US2007/064858, publicada como Publicación Internacional No. WO2007/109813) y saponinas, tales como QS21 (véase Kensil et al., in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); Patente Estadounidense No. 5,057,540). En algunas modalidades, el adyuvante es adyuvante Freund (completo o incompleto). Otros adyuvantes son emulsiones aceite en agua (tales como aceite de escualeno o maní), opcionalmente en combinación con estimulantes inmunes, tales como monofosforil lípido A (véase Stoute et al., N. Engl. J. Med. 336, 86-91 (1997)). Otro adyuvante es CpG (Bioworld Today, Nov. 15, 1998).

En ciertas modalidades, las composiciones descritas en la presente, son formuladas para ser adecuadas para la ruta propuesta de administración a un sujeto. Por ejemplo, las composiciones descritas en la presente pueden ser formuladas para ser adecuadas para administración subcutánea, parenteral, oral, intradermal, transdermal, colorrectal, intraperitoneal, y rectal. En una modalidad específica, la composición farmacéutica puede ser formulada para administración intravenosa, oral, intraperitoneal, intranasal, intratraqueal, subcutánea, intramuscular, tópica, intradermal, transdermal o pulmonar.

En ciertas modalidades, las composiciones descritas en la presente comprenden adicionalmente uno o más amortiguadores, por ejemplo, amortiguador de fosfato y amortiguador de sacarosa fosfato glutamato. En otras modalidades, las composiciones descritas en la presente no comprenden amortiguadores.

En ciertas modalidades, las composiciones descritas en la presente comprenden adicionalmente, una o más sales, por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de calcio, fosfato de sodio, glutamato monosódico, y sales de aluminio (por ejemplo, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, alum (sulfato de aluminio potásico), o una mezcla de tales sales de aluminio). En otras modalidades, las composiciones descritas en la presente no comprenden sales.

Las composiciones descritas en la presente pueden ser incluidas en un contenedor, paquete, o dispensador junto con instrucciones para administración.

Las composiciones descritas en la presente pueden ser almacenadas antes del uso, por ejemplo, las composiciones pueden ser congeladas almacenadas (por ejemplo, a aproximadamente -20°C o a aproximadamente -

70°C); almacenadas en condiciones refrigeradas (por ejemplo, a aproximadamente 4°C); o almacenadas a temperatura ambiente.

5.7 Usos Profilácticos y Terapéuticos

Proporcionados en la presente están métodos para tratar y prevenir la infección de *E. coli* extraintestinal (ExPEC) de un sujeto que comprenden administrar al sujeto un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2). En una modalidad específica, las composiciones descritas en la presente (véase Sección 5.6.2) son usadas en la prevención de la infección de un sujeto (por ejemplo, sujetos humanos) por ExPEC, es decir, las composiciones descritas en la presente son usadas para vacunar un sujeto contra la infección de ExPEC. En otra modalidad específica, las composiciones descritas en la presente (véase Sección 5.6.2) son usadas en el tratamiento de un sujeto que ha sido infectado ExPEC.

También se proporcionan en la presente métodos para inducir una respuesta inmune en un sujeto contra ExPEC, que comprenden administrar al sujeto un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2). En una modalidad, tal sujeto tiene una infección de ExPEC al tiempo de la administración. En otra modalidad, tal sujeto no tiene una infección de ExPEC al tiempo de la administración.

También se proporcionan en la presente métodos para inducir la producción de anticuerpos opsonofagocíticos contra ExPEC en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2). En una modalidad, tal sujeto tiene una infección de ExPEC al tiempo de la administración. En otra modalidad, tal sujeto no tiene una infección de ExPEC al tiempo de la administración.

En una modalidad específica, se proporciona en la presente un método para prevenir una infección de *E. coli* (por ejemplo, ExPEC) en un sujeto, en donde tal método comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una composición descrita en la Sección 5.6.2. Los métodos para prevenir la infección de ExPEC en un sujeto proporcionado en la presente resultan en la inducción de una respuesta inmune en un sujeto que comprende administrar al sujeto una composición descrita en la Sección 5.6.2.

Uno de habilidad en la técnica entenderá que los métodos para inducir una respuesta inmune en un sujeto descritos en la presente resultan en la vacunación del sujeto contra la infección por las cepas de ExPEC cuyos antígenos O están presentes en la(s) composición(es).

En una modalidad específica, se proporciona en la presente un método para tratar una infección de *E. coli* (por ejemplo, ExPEC) en un sujeto, en donde tal método comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una composición descrita en la Sección 5.6.2.

En ciertas modalidades, la respuesta inmune inducida por un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es efectiva para prevenir y/o tratar una infección de ExPEC causada por cualquier serotipo, subserotipo, o cepa de ExPEC. En ciertas modalidades, la respuesta inmune inducida por un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es efectiva para prevenir y/o tratar una infección de ExPEC más de un serotipo de ExPEC.

En una modalidad específica, la respuesta inmune inducida por un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es efectiva para prevenir y/o tratar una infección causada por *E. coli* del serotipo O25. En una modalidad específica, tal serotipo O25 es O25B. En una modalidad específica, tal serotipo O25 es O25A.

En una modalidad específica, la respuesta inmune inducida por un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es efectiva para prevenir y/o tratar una infección causada por *E. coli* del serotipo O1. En una modalidad específica, tal Serotipo O1 es O1A. En otra modalidad específica, tal Serotipo O1 es O1B. En otra modalidad específica, tal Serotipo O1 es O1C.

En una modalidad específica, la respuesta inmune inducida por un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es efectiva para prevenir y/o tratar una infección causada por *E. coli* del serotipo O2.

En una modalidad específica, la respuesta inmune inducida por un

antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es efectiva para prevenir y/o tratar una infección causada por *E. coli* del serotipo O6.

En una modalidad específica, la respuesta inmune inducida por un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es efectiva para prevenir y/o tratar una infección causada por dos o más de los siguientes serotipos de *E. coli*: O25 (por ejemplo, O25B y O25A), O1 (por ejemplo, O1A, O1B, y O1C), O2, y/o O6.

En una modalidad específica, la respuesta inmune inducida por un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es efectiva para prevenir y/o tratar una infección causada por cada uno de los siguientes serotipos de *E. coli*: O25 (por ejemplo, O25B y O25A), O1 (por ejemplo, O1A, O1B, y O1C), O2, y O6.

Con el fin de tratar un sujeto que tiene una infección de ExPEC o inmunizar un sujeto contra una infección de ExPEC, el sujeto puede ser administrado con una composición única descrita en la presente, en donde tal composición comprende uno, dos, tres, cuatro, o más antígenos de *E. coli* descritos en la presente. Véase Sección 5.2. Alternativamente, con el fin de tratar un sujeto que tiene una infección de ExPEC o inmunizar un sujeto contra una infección de ExPEC, el sujeto puede ser administrado con bioconjugados múltiples descritos en la presente, por ejemplo, un sujeto puede ser administrado con dos, tres, cuatro o más bioconjugados descritos en la Sección 5.4. Alternativamente, con el fin de tratar un sujeto que tiene una infección de ExPEC o inmunizar un sujeto contra una infección de ExPEC, el sujeto puede ser administrado con composiciones múltiples descrita en la presente, por ejemplo, un sujeto puede ser administrado dos, tres, cuatro, o más composiciones descritas en la Sección 5.6.2.

En ciertas modalidades, la respuesta inmune inducida en un sujeto después de la administración de un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es efectiva para reducir síntomas que resultan de una infección de ExPEC. Los síntomas de la infección de ExPEC pueden variar dependiendo de la naturaleza de la infección y pueden incluir, pero no se limitan a: disuria, frecuencia o urgencia urinaria

incrementada, piuria, hematuria, dolor de espalda, dolor mientras orina, fiebre, resfriados, y/o náuseas (por ejemplo, en sujetos que tienen una infección del tracto urinario causada por ExPEC); fiebre alta, cefaleas, cuello rígido, náuseas, vómito, ataques, somnolencia y/o sensibilidad a la luz (por ejemplo, en sujetos que tienen meningitis causada por ExPEC); fiebre, frecuencia cardíaca incrementada, frecuencia respiratoria incrementada, disminución de la producción de orina, conteo de plaquetas reducido, dolor abdominal, dificultad para respirar, y/o función cardíaca anormal (por ejemplo, en sujetos que tienen sepsis causadas por ExPEC).

En ciertas modalidades, la respuesta inmune inducida en un sujeto después de la administración de un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es efectiva para reducir la probabilidad de hospitalización de un sujeto que sufre de una infección de ExPEC. En algunas modalidades, la respuesta inmune inducida en un sujeto después de la administración de un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es efectiva para reducir la duración de hospitalización de un sujeto que sufre de una infección de ExPEC.

En otro aspecto, proporcionados en la presente están métodos para prevenir y/o tratar una infección de ExPEC en un sujeto causada por *E. coli* del serotipo O25B administrando un anticuerpo descrito en la presente, es decir, un anticuerpo anti-O25B descrito en la presente. En modalidades particulares, el anticuerpo neutralizante es un anticuerpo monoclonal.

5.7.1 Terapias de Combinación

En ciertas modalidades, un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es administrada a un sujeto en combinación con una o más de otras terapias (por ejemplo, terapias antibacterianas o inmunomoduladoras). Una o más de otras terapias pueden ser benéficas en el tratamiento o prevención de una infección de ExPEC o pueden aliviar un síntoma o condición asociado con una infección de ExPEC. En algunas modalidades, una o más de otras terapias son aliviadores del dolor o medicaciones anti-fiebre. En ciertas modalidades, las terapias son administradas menos de 5 minutos aparte, menos de 30 minutos aparte, 1 hora aparte, a aproximadamente 1 hora aparte, a aproximadamente 1 a

aproximadamente 2 horas aparte, a aproximadamente 2 horas hasta
aproximadamente 3 horas aparte, a aproximadamente 3 horas hasta
aproximadamente 4 horas aparte, a aproximadamente 4 horas hasta
aproximadamente 5 horas aparte, a aproximadamente 5 horas hasta
aproximadamente 6 horas aparte, a aproximadamente 6 horas hasta
aproximadamente 7 horas aparte, a aproximadamente 7 horas hasta
aproximadamente 8 horas aparte, a aproximadamente 8 horas hasta
aproximadamente 9 horas aparte, a aproximadamente 9 horas hasta
aproximadamente 10 horas aparte, a aproximadamente 10 horas hasta
aproximadamente 11 horas aparte, a aproximadamente 11 horas hasta
aproximadamente 12 horas aparte, a aproximadamente 12 horas hasta 18 horas
aparte, 18 horas hasta 24 horas aparte, 24 horas hasta 36 horas aparte, 36 horas
hasta 48 horas aparte, 48 horas hasta 52 horas aparte, 52 horas hasta 60 horas
aparte, 60 horas hasta 72 horas aparte, 72 horas hasta 84 horas aparte, 84 horas
hasta 96 horas aparte, o 96 horas hasta 120 horas parte.

Cualquiera de los agentes anti-bacterianos conocidos por uno de habilidad en la técnica pueden ser usados en combinación con un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2). Ejemplos no limitantes de agentes anti-bacterianos incluyen Amikacina, Amoxicilina, Amoxicilina-ácido clavulánico, Anfotericina-B, Ampicilina, Ampicilina-sulbactam, Apramicina, Azitromicina, Aztreonam, Bacitracina, Bencilpenicilina, Caspofungina, Cefaclor, Cefadroxil, Cefalexin, Cefalotin, Cefazolina, Cefdinir, Cefepime, Cefixima, Cefmenoxima, Cefoperazona, Cefoperazona-sulbactam, Cefotaxima, Cefoxitin, Cefpiroma, Cefpodoxima, Cefpodoxima-ácido clavulánico, Cefpodoxima-sulbactam, Cefprozil, Cefquinoma, Ceftazidima, Ceftibutin, Ceftiofur, Ceftobiprol, Ceftriaxon, Cefuroxima, Cloramfenicol, Florfenicol, Ciprofloxacina, Claritromicina, Clinafloxacina, Clindamicina, Cloxacilina, Colistina, Cotrimoxazol (Trimtoprim/sulfametoxazol), Dalbavancina, Dalfopristina/Quinopristina, Daptomicina, Dibekacina, Dicloxacilina, Doripenem, Doxiciclina, Enrofloxacina, Ertapenem, Eritromicina, Flucloxacilina, Fluconazol, Flucitosina, Fosfomicina, ácido Fusífico, Garenoxacina, Gatifloxacina, Gemifloxacina, Gentamicina, Imipenem, Itraconazol, Kanamicina, Ketoconazol, Levofloxacina, Lincomicina, Linezolid, Loracarbef, Mecillnam (amdinocilina), Meropenem, Metronidazol, Meziocilina, Mezlocilina-sulbactam, Minociclina, Moxifloxacina, Mupirocian, ácido Nalidíxico, Neomicina, Netilmicina, Nitrofurantoina, Norfloxacina, Ofloxacina, Oxacilina, Pefloxacina, Penicilina V,

Piperacilina, Piperacilina-sulbactam, Piperacilina-tazobactam, Rifampicina, Roxitromicina, Sparfloxacin, Espectinomycin, Espiramicin, Estreptomycin, Sulbactam, Sulfamethoxazol, Teicoplanin, Telavancin, Telitromycin, Temocilin, Tetracycline, Ticarcilina, Ticarcilina-ácido clavulánico, Tigeciclina, Tobramicina, Trimetoprim, Trovafloxacin, Tilosina, Vancomycin, Virginiamycin, y Voriconazol.

En ciertas modalidades, una terapia de combinación comprende la administración de dos o más antígenos O de *E. coli* descrita en la presente (véase Sección 5.2), bioconjugados descrita en la presente (véase Sección 5.4), y/o composiciones descrita en la presente (véase Sección 5.6.2).

5.7.2 Poblaciones de Pacientes

En ciertas modalidades, un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es administrada a un sujeto naive (o sin tratamiento), es decir, un sujeto que no tiene una infección de ExPEC o que no ha tenido previamente una infección de ExPEC. En una modalidad, un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es administrada a un sujeto naive (o sin tratamiento) que está en riesgo de adquirir una infección de ExPEC.

En ciertas modalidades, un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es administrada a un sujeto quién ha sido diagnosticado con una infección de ExPEC. En algunas modalidades, un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es administrada a un sujeto infectado con ExPEC antes de manifestar los síntomas o los síntomas llegan a ser severos (por ejemplo, antes de que el paciente requiera hospitalización).

En ciertas modalidades, un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es administrada a un sujeto quién ha sido diagnosticado con una infección de UPEC. En algunas modalidades, un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es administrada a un

sujeto sufre de infecciones recurrentes del tracto urinario. En algunas modalidades, un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es administrada a un sujeto sufre de infecciones recurrentes del tracto urinario, pero está sano al momento del tratamiento. En algunas modalidades, un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es administrada a un sujeto que tiene o está en riesgo de adquirir bacteremia o sepsis.

En algunas modalidades, un sujeto que será administrado con un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es un animal. En ciertas modalidades, el animal es un ave. En ciertas modalidades, el animal es un canino. En ciertas modalidades, el animal es un felino. En ciertas modalidades, el animal es un caballo. En ciertas modalidades, el animal es una vaca. En ciertas modalidades, el animal es un mamífero, por ejemplo, un caballo, cerdo, ratón, o primate. En una modalidad específica, el sujeto es un humano.

En ciertas modalidades, un sujeto que será administrado con un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es un adulto humano. En ciertas modalidades, un sujeto que será administrado con un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es un adulto humano de más de 50 años de edad. En ciertas modalidades, un sujeto que será administrado con un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es un sujeto humano anciano.

En ciertas modalidades, un sujeto que será administrado con un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es un niño humano. En ciertas modalidades, un sujeto que será administrado con un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4),

o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es un infante humano. En ciertas modalidades, un sujeto que será administrado con un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es un infante humano prematuro. En algunas modalidades, un sujeto que será administrado con un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es un niño pequeño humano. En ciertas modalidades, un sujeto que será administrado con un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es administrada no es un infante de menos de 6 meses de edad.

En ciertas modalidades, un sujeto que será administrado con un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es un individuo quién está embarazado. En ciertas modalidades, un sujeto que será administrado con un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es una mujer quien ha dado a luz 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 semanas antes.

En ciertas modalidades, un sujeto que será administrado con un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es un individuo en riesgo incrementado de ExPEC (por ejemplo, un individuo inmunocomprometido o inmunodeficiente). En ciertas modalidades, un sujeto que será administrado con un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es un individuo en contacto cercano con un individuo que tiene o está en riesgo incrementado de infección de ExPEC.

En ciertas modalidades, un sujeto que será administrado con un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es un trabajador al cuidado de la salud (por ejemplo, un doctor o enfermera). En ciertas modalidades, un sujeto que será

administrado con un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es inmunocomprometido (por ejemplo, que sufre de la infección del VIH) o inmunosuprimido.

En ciertas modalidades, un sujeto que será administrado con un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) tiene diabetes. En ciertas modalidades, un sujeto que será administrado con un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) tiene esclerosis múltiple.

En ciertas modalidades, un sujeto que será administrado con un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) tiene una condición que requiere que el use catéter. En ciertas modalidades, un sujeto que será administrado con un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) tiene una lesión de la médula espina.

5.7.3 Dosificación y Frecuencia de Administración

La cantidad de un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) la cual será efectiva en el tratamiento y/o prevención de una infección de ExPEC dependerá de la naturaleza de la enfermedad, y puede ser determinada por técnicas clínicas estándares. La administración del antígeno-O, bioconjugado y/o composición puede hacerse mediante varias rutas conocidas por el especialista, por ejemplo, subcutánea, parenteral, intravenosa, intramuscular, tópica, oral, intradermal, transdermal, intranasal, etc. En una modalidad, la administración es mediante inyección intramuscular.

La dosificación precisa que será empleada en la formulación también dependerá de la ruta de administración, y la seriedad de la infección, y debe ser decidida de conformidad con el juicio del practicante y cada una de las circunstancias del sujeto. Por ejemplo, las dosificaciones efectivas también pueden variar dependiendo de los medios de administración, sitio objetivo, estado

fisiológico del paciente (que incluye la edad, peso corporal, salud), si el paciente es humano o un animal, otras medicaciones administradas, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Las dosificaciones de tratamiento son ópticamente tituladas para optimizar seguridad y eficacia.

En ciertas modalidades, se emplea un ensayo *in vitro* para ayudar a identificar los intervalos de dosificaciones óptimas. Véase Sección 5.8. Las dosis efectivas pueden ser extrapoladas a partir de curvas de respuesta de dosificación derivadas de sistemas de prueba de modelo animal o *in vitro*.

En ciertas modalidades, las dosificaciones ejemplares para vacunas a base de glicoconjugados (por ejemplo, composiciones que comprenden bioconjugados) varían desde aproximadamente 0.1 µg hasta 400 µg de carbohidratos por dosis. En otras modalidades, las dosificaciones ejemplares para vacunas a base de glicoconjugados (por ejemplo, composiciones que comprenden bioconjugados) varían desde aproximadamente 0.1 µg hasta 4000 µg de proteína(s) por dosis. En ciertas modalidades, una dosificación ejemplar para una vacuna a base de glicoconjugado (por ejemplo, una composición que comprende bioconjugados) comprende 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50 µg de carbohidrato(s) por dosis. En ciertas modalidades, una dosificación ejemplar para una vacuna a base de glicoconjugado (por ejemplo, una composición que comprende bioconjugados) comprende 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 µg de proteína(s) por dosis. En ciertas modalidades ejemplares, una dosificación para administración a un humano corresponde a 0.5 ml que contiene aproximadamente 1-10, por ejemplo, aproximadamente 2-6, por ejemplo, aproximadamente 4 µg de polisacárido para cada uno de los glicoconjugados incluidos.

En ciertas modalidades, un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es administrada a un sujeto una vez como una dosis única. En ciertas modalidades, un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es administrada a un sujeto como una dosis única seguida por una segunda dosis 3 a 6 semanas después. De conformidad con estas modalidades, las inoculaciones de refuerzo pueden ser administradas al sujeto a intervalos de 6 a 12 meses después de la segunda inoculación. En ciertas modalidades, las inoculaciones de refuerzo pueden utilizar

un antígeno O de *E. coli*, bioconjugado, o composición diferente. En algunas modalidades, la administración del mismo antígeno O de *E. coli*, bioconjugado, o composición puede ser repetida y las administraciones pueden ser separadas por al menos 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 7 días, 10 días, 15 días, 30 días, 45 días, 2 meses, 75 días, 3 meses, o al menos 6 meses. En ciertas modalidades, un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es administrada a un sujeto como una dosis única una vez por año.

En ciertas modalidades, un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) es administrada a un sujeto as 2, 3, 4, 5 o más dosis 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas o 6 semanas aparte. En algunas modalidades, 2, 3, 4, 5 o más dosis de un antígeno O de *E. coli* descrito en la presente (véase Sección 5.2), un bioconjugado descrito en la presente (véase Sección 5.4), o una composición descrita en la presente (véase Sección 5.6.2) son administrados a un sujeto 2, 3, 4, 5 o 6 semanas aparte a una dosificación de 0.1 µg hasta 0.5 mg, 0.1 µg hasta 0.4 mg, 0.1 µg hasta 0.3 mg, 0.1 µg hasta 0.2 mg, o 0.1 µg hasta 0.1 mg de contenido de carbohidrato. En ciertas modalidades, el antígeno O de *E. coli*, bioconjugado, o composición administrada es el mismo cada vez. En ciertas modalidades, el antígeno O de *E. coli*, bioconjugado, o composición administrados es diferente cada vez.

Para inmunización pasiva con un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-O25B), la dosificación puede variar desde aproximadamente 0.0001 hasta 100 mg de anticuerpo por kg de peso corporal, o desde 0.01 hasta 5 anticuerpo por kg de peso corporal. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg o, en otras palabras, 70 mg o 700 mg o dentro del intervalo de 70-700 mg, respectivamente, para un paciente de 70 kg. Un régimen de tratamiento ejemplar vincula la administración una vez por semana cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses por un periodo de un año o durante varios años, o durante intervalos de varios años. Los intervalos pueden ser irregulares y alterados con base en los niveles en sangre del anticuerpo en el paciente.

5.8 Ensayos

Ensayo para Evaluar la Capacidad de Bioconjugados para Inducir una Respuesta Inmune

La capacidad de los bioconjugados/composiciones descritos en la presente para generar una respuesta inmune en un sujeto puede ser evaluada usando cualquier procedimiento conocido por aquellos de habilidad en la técnica o descrito en la presente. En algunas modalidades, la capacidad de un bioconjugado para generar una respuesta inmune en un sujeto puede ser evaluada inmunizando un sujeto (por ejemplo, un ratón) o serie de sujetos con un bioconjugado descrito en la presente e inmunizando un sujeto adicional (por ejemplo, un ratón) o serie de sujetos con un control (PBS). Los sujetos o serie de sujetos pueden ser subsecuentemente estimulados con ExPEC y la capacidad del ExPEC para causar la enfermedad (por ejemplo, UTI) en los sujetos o serie de sujetos, puede ser determinada. Aquellos expertos en la técnica reconocerán que si el sujeto o serie de sujetos inmunizados con el control sufre(n) de enfermedad subsecuente a la estimulación con el ExPEC, pero el sujeto o serie de sujetos inmunizados con un bioconjugado(s) o composición del mismo descrita en la presente sufre menos de o no sufre de la enfermedad, entonces el bioconjugado es capaz de generar una respuesta inmune en un sujeto. La capacidad de un bioconjugado(s) o composición del mismo descrita en la presente para inducir antisuero que reacciona cruzado con un antígeno O de ExPEC puede ser probada mediante, por ejemplo, un inmunoensayo, tal como un ELISA.

Ensayos Bactericidas *in vitro*

La capacidad de los bioconjugados descritos en la presente para generar una respuesta inmune en un sujeto puede ser evaluada usando un ensayo bactericida en suero (SBA) o ensayo de eliminación opsonofagocitocítica (OPK), el cual representa un método establecido y aceptado que ha sido usado para obtener aprobación de las vacunas a base de glicoconjugados. Tales ensayos son bien conocidos en la técnica y, brevemente, comprenden las etapas de generar y aislar los anticuerpos contra un objetivo de interés (por ejemplo, un antígeno O, por ejemplo, O25B, de *E. coli*) administrando a un sujeto (por ejemplo, un ratón) un compuesto que estimula tales anticuerpos. Subsecuentemente, la capacidad bactericida de los anticuerpos puede ser evaluada mediante, por ejemplo, cultivar la bacteria en cuestión (por ejemplo, *E. coli* del serotipo relevante) en la presencia de tales anticuerpos y complementos y - dependiendo del ensayo - células neutrofílicas y someter a ensayo la capacidad de los anticuerpos para eliminar y/o neutralizar la bacteria, por ejemplo, usando procedimientos

microbiológicos estándares.

5.9 KITS

Se proporciona en la presente un paquete farmacéutico o kit que comprende uno o más contenedores llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones descritas en la presente (véase Sección 5.6.2), tales como uno o más antígenos de *E. coli* (véase Sección 5.2) y/o bioconjugados (véase Sección 5.4) proporcionada en la presente. Opcionalmente asociado con tal(es) contenedor(es) pueden estar una notificación en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la manufactura, uso o venta de farmacéuticos o productos biológicos, en la cual la notificación refleja la aprobación por la agencia de manufactura, uso o venta para administración humana. Los kits abarcados en la presente pueden ser usados en los métodos de tratamiento anteriores y en inmunización de sujetos.

6. EJEMPLOS

MÉTODOS

Aglutinación

Un proceso en el cual las células o masa de células lisadas es mezclado con antisuero que contiene anticuerpos específicos para una estructura polimérica, por ejemplo, antígeno O. Los agregados insolubles, visibles, se forman cuando el antisuero reconoce las estructuras celulares. Este método es clásicamente usado para identificar serotipos O, K, y H. Véase DebRoy, *et al.*, (2011) *Animal health research reviews/Conference of Research Workers in Animal Diseases* 12, 169-185

Preparación de muestra LPS para análisis por SDS PAGE

El LPS de células Gram-negativas está compuesto de una base lípida A, modificada con un núcleo de oligosacárido que proporciona la unión para el antígeno O. Para analizar el LPS de aislados clínicos, las células se hicieron crecer en medio LB estándar a 37°C por 24 h, y la biomasa que corresponde a 1 ml de cultivo con OD600 de 2 se recolectó y sometió a lisis en amortiguador de muestras Lamml 1x y se incubó a 95°C por 10 minutos. Los extractos se trataron además por 1 hora a 65°C para remover alguna señal de proteína usando 1 g/1 de proteinasa K. Los extractos tratados se separaron por SDS PAGE y se visualizó LPS por tinte de plata o manchado Western usando antisuero apropiado.

Preparación de LPS para recubrimiento de placas de ELISA

Se preparó LPS usando un método descrito por Apicella, (2008) *Métodos Mol Biol* 431, 3-13, y además se purificó como se describe por Perdomo and Montero, (2006) *Biotechnología Aplicada* 23: 124-129.

HPLC de OPS 2AB: "Marca de LLO"

Este método se usó para analizar la estructura de OPS ligada a UPP

Para extraer glicanos ligados a UPP, células de *E. coli* se lavaron con 0.9% de NaCl y se liofilizaron. Las células secas se extrajeron con solvente orgánico (Metanol:Agua (M:W=17:3 a 19: 1, v/v), y/o mezclas de Cloroformo:Metanol:Agua de relaciones optimizadas (por ejemplo, C:M:W = 10:10:3; v/v/v)). Los extractos se secaron bajo una corriente de N₂, y se resuspendieron en C:M:W=3:48:47. Para purificar los glicolípidos extraídos, la resuspensión de 3:48:47 se pasó a través de un cartucho Sep-PAK tC₁₈. El cartucho se acondicionó con 10 ml de metanol, seguido por equilibrio con 10 ml de 3:48:47 (C:M:W). Después de cargar la muestra, el cartucho se lavó con 10 ml de 3:48:47 (C:M:W) y se eluyó con 5 ml de metanol y 5 ml de 10:10:3 (C:M:W). Las eluciones combinadas se secaron bajo N₂. Las muestras de glicolípidos se hidrolizaron disolviendo las muestras secas en 2 ml de n-propanol:2M de ácido trifluoroacético (1:1), calentamiento a 50 °C por 15 min, y después evaporación a sequedad bajo N₂ (Glover, et al, Proc Natl Acad Sci U S A 102(40): 14255-9). Las muestras secas se suspendieron una vez más en 3:48:47 y se pasaron a través de un cartucho tC₁₈, y el flujo a través de este se secó bajo N₂. El etiquetado con 2-AB y limpieza de glicano se realizó usando el método de disco de papel como se describe (Bigge, et al., Anal Biochem 230(2): 229-38; Merry, et al., Anal Biochem 304(1): 91-9).

Glicanos etiquetados con 2-AB se separaron por HPLC usando una columna de fase normal GlycoSep-N de conformidad con Royle et al., pero modificada a un sistema de tres solventes (Royle, et al., Anal Biochem 304(1): 70-90). El Solvente A fue 10 mM de formiato de amonio pH 4.4 en 80 % de acetonitrilo. El Solvente B fue 30 mM de formiato de amonio pH 4.4 en 40 % de acetonitrilo. El Solvente C fue 0.5 % de ácido fórmico. La temperatura de la columna fue 30 °C y glicanos etiquetados con 2-AB se detectaron por fluorescencia (excitación λ_{ex} = 330 nm, emisión λ_{em} = 420 nm). Las condiciones del gradiente fueron un gradiente lineal de 100 % A hasta 100 % B durante 160 min a una velocidad de flujo de 0.4 ml/min, seguido por 2 min 100 % B a 100 % C, incrementando la velocidad de flujo a 1 ml/min. La columna se lavó por 5 min con 100 % C, regresando a 100 % A durante 2 min y corriente por 15 min a 100 % A, a una velocidad de flujo de 1 ml/min, después regresando la velocidad de flujo a 0.4 ml/min por 5 min. Las muestras se inyectaron en agua.

Ensayo de desacetilación

Un equivalente de glicano etiquetado con 2-AB se secó a 30°C, se

resuspendió en 50 µL de agua con (muestra) o sin (falso) 200 mM de NaOH (pH ~ 14), e incubó por 25 horas a 37°C. La solución entonces se llevó a temperatura ambiente y se neutralizó por la adición de 200 mM de solución de HCl (pH ~ 1). Después del secado en vacío de velocidad a 30°C, la muestra se reetiquetó con 2AB y se analizó por HPLC.

HPLC de Hidrazinólisis

Se usó la misma técnica de HPLC de fase normal descrita anteriormente para separar OPS liberado de bioconjugados después de la hidrazinólisis. Previo a la hidrazinólisis, los bioconjugados que corresponden a 1 mg de proteína fueron completamente secados bajo una corriente de N₂. El polisacárido liberado se realizó usando el kit de Liberación de Glicano por Hidrazinólisis Liberada de Ludger (Ludger #LL-HYDRAZ-A2) de conformidad con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se agregaron 450 µl de hidrazina a las muestras secadas bajo un manto de N₂ e incubaron por 16 horas a 85°C. La hidrazina se removió por evaporación bajo N₂ a 45°C. La re-N-acetilación de los polisacáridos se realizó por incubación en 471 µl de anhídrido acético al 4.5% en 1 M de bicarbonato de sodio por dos horas en hielo. Posteriormente, 600 µl de una solución de TFA al 5% se agregaron y las muestras se hidrolizaron por otra hora en hielo. La purificación se realizó en una columna EB20 usando los amortiguadores correspondientes EB20 A y B.

Los polisacáridos liberados y purificados se cargaron con 2-AB y se analizaron por NP-HPLC como se describe para las muestras de LLO. Se recolectaron los picos de interés e identificaron por MS/MS.

MS y MS/MS de picos de HPLC

Para analizar la secuencia de monosacárido de una molécula de interés de OPS, se realizó análisis de espectroscopia de masas. Las fracciones recolectadas secas, que corresponden a picos de HPLC específicos se resuspendieron en 5 µl al 10% de acetonitrilo (ACN), 0.1 % de ácido trifluoroacético (TFA) y se mezclaron 1:1 con solución de matriz (40mg/ml de DHB en 50% de ACN, 0.1% de TFA) en la placa objetivo. Los datos de MS y MS/MS fueron adquiridos manualmente en el modo de ion positivo en un espectrómetro de masas MALDI-Tof/ToF Ultraflex-II (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). Se obtuvieron MS/MS usando el método LIFT. Se usó una mezcla de péptido estándar (Bruker Daltonik GmbH) para calibración externa. Los espectros se reportaron usando el software de Análisis Flex (Bruker Daltonik GmbH) y se analizaron manualmente.

Células hospederas

Se produjeron bioconjugados por células *E. coli* recombinantes que expresan, mediante plásmido(s), proteína(s) portadora(s) y oligosacaril transferasa de *C. jejuni* (PglB), y OPS de mutantes de inserción cósmidos o cromosomales.

Se usó EPA genéticamente destoxificado (Exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* que contiene las mutaciones L552V, Δ E553) como una proteína portadora, y se modificó para comprender 2 o 4 sitios de glicosilación (referido en la presente como 2S-EPA y 4S-EPA, respectivamente) y una etiqueta HIS C-terminal, y se expresó a partir de un plásmido inducible por arabinosa, derivado de pBR322 (véase Ihssen, *et al.*, (2010) *Microbial cell factories* 9, 61).

La MBP (proteína de unión a maltosa), una proteína de *E. coli* soluble, periplásmica nativa, se expresó a partir de una pGVXN579. La pGVXN579 es un plásmido pMAL-p2X modificado (New England Biolabs) que codifica tres secuencias consenso de N-glicosilación bacterianas en una fila seguida por una etiqueta Myc C-terminalmente fusionada a la proteína de unión a maltosa ORF codificada en el plásmido. Este ajuste siguió purificación de afinidad del bioconjugado de MBP independiente de una etiqueta HIS. La inducción de la expresión es controlada por el promotor tac e inducible usando IPTG.

La proteína PglB se expresó a partir del plásmido pEXT21 (un fragmento EcoRI/BamHI De pMAF10 (Feldman *et al.*, 2005, PNAS USA 102(8):3016-3021) se clonó en pEXT21 con una etiqueta HA C-terminalmente fusionada. Las variantes del plásmido de expresión son optimización de codón (pGVXN939), optimización de codón con una supresión del sitio de glicosilación (pGVXN948), y etiqueta HA-T removida (pGVXN970) y optimización de codón y etiqueta HA suprimida (pGVXN971).

Los aislados clínicos se aislaron por su capacidad para sintetizar ciertos OPS usando aglutinación, manchado Western, teñido de plata, marca de LLO, serotipado de PCR, o tecnologías similares que permiten la identificación de las características estructurales de OPS, y también por su fenotipo de resistencia al antibiótico. Ciertos aislados clínicos fueron además cromosomalmente detectados para la enzima ligasa, *WaaL*, para mejorar la disponibilidad de OPS para glicosilación de proteína o análisis de OPS.

Para analizar además los aislados clínicos, el grupo *rfb* de la cepa de laboratorio W3110 se reemplazó por el grupo *rfb* clonado a partir de aislados clínicos, y se analizó la biosíntesis de OPS. El gen *waaL* se suprimió para mejorar la eficiencia de la producción de bioconjugado.

Los intercambios de grupo y supresiones de *waaL* se lograron por

recombinación homóloga usando un método optimizado (véase Solicitud de Patente Internacional No. PCT/EP2013/068737) o procedimientos publicados (Datsenko and Wanner, (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97, 6640-6645). Para intercambio de grupo OPS, el grupo de interés *rfb* de un aislado clínico se clonó en el plásmido de selección contador pDOC-C, junto con un casete de resistencia al antibiótico, para integración subsecuente en el sitio *rfb* de la cepa de *E. coli* W3110 (Kuhlman and Cox, 2010, Nucleic acids research 38, e92; Lee *et al.*, 2009, BMC Microbiol 9, 252). La recombinación homóloga de grandes grupos de *rfb* de interés se logró usando ADN que flanquea la secuencia codificante del grupo *rfb* de W3110 de 0.5 a 1.5 kilobases de longitud y linearización *in vivo* del inserto de ADN a partir del *rfb* originado del plásmido. La cepa resultante contiene un grupo *rfb* reemplazado (con o sin casete de resistencia al antibiótico), es decir, el grupo *rfb* de W3110 se reemplazó por una molécula de ADN entre los genes *gale* y *gnd* por el estiramiento análogo aislado de un aislado clínico de *E. coli*.

En ciertos experimentos, las cepas W3110 que contienen un cósmido que codifica el grupo *rfb* de un serotipo de *E. coli* dado se usaron como cepas hospederas.

Para la producción de bioconjugados recombinantemente expresados en cepas a base de W3110, se suprimieron genes originados de W3110 que interfieren con la producción de OPS recombinante. Por ejemplo, para la producción de células hospederas de bioconjugados de O25B, los grupos *gtrABS* de W3110 se suprimieron. Para lograr esto, la recombinación homóloga de conformidad con un método publicado (Bloor AE, Cranenburgh RM. Appl Environ Microbiol. 2006 Abr; 72(4):2520-5.) usando secuencias de homología flanquea corriente arriba el gen *gtrA* y corriente abajo el gen *gtrS*.

Para ensamblar cepas de producción, la cepa hospedera se transformó con una *pglB* y un plásmido de expresión de portador por transformación. Véase Wacker *et al.*, 2002, Science 298: 1790-1793.

Producción de Bioconjugado

Se realizó producción de bioconjugado haciendo crecer células hospederas y purificando bioconjugados producidos en el espacio periplásmico. El crecimiento se realizó ya sea en agitadores o matraces o en un proceso de fermentación de lote de alimentación a escala industrial.

Se realizaron cultivos de matraz agitado a 37°C, usando un medio compuesto de los antibióticos apropiados en caldo Terrific algunas veces complementado con 5 mM de MgCl₂. El medio se inoculó a un OD de 0.05 con un cultivo durante la noche de células de producción recientemente transformadas,

que crecen hasta la fase semi-log, inducido con 0.2% de arabinosa y 1mM de IPTG, además se hizo crecer y se recolectó después de 20 hs de crecimiento.

Fermentaciones de lote de alimentación

Se usó una alícuota de un banco de línea de células de producción para inocular un matraz sacudido que tiene medio LB de Soya con los antibióticos apropiados. El matraz sacudido se incubó a 180 rpm, 37°C por aproximadamente 12 horas. Los medios del lote sin complementos se esterilizaron directamente dentro del biorreactor (33 min a $\geq 121^\circ\text{C}$), se enfriaron y se agregaron los complementos. KOH 4 M o 25% de ácido fosfórico se unieron al fermentador para regulación de pH y el pH se ajustó a pH7. La inoculación del biorreactor y el cultivo del lote del pre-cultivo se hizo para proporcionar un OD₆₀₀ inicial de 0.005. El pH se mantuvo establemente por la adición de KOH 4M o 25% de ácido fosfórico. La tensión de oxígeno disuelto (DO) se mantuvo. La presión de cabeza se mantuvo a 600 mbar. La formación del producto se indujo con L-Arabinosa (0.1%) y/o IPTG (1 mM). Inmediatamente después de la inducción, se inició la alimentación por adición de medio de alimentación que contiene 2.5% de Arabinosa e IPTG. 24±2 horas después de la inducción, el biorreactor se enfrió a 25°C, la alimentación se detuvo y se realizó la recolección por filtración de flujo tangencial o centrifugación.

La biomasa se sometió a lisis en 0.5% de Triton X-10 por interrupción durante 4 ciclos de homogenización a alta presión a 800 bar.

Los bioconjugados se purificaron por cromatografía en columna. Se usaron varias técnicas cromatográficas para preparar bioconjugados, principalmente IMAC, cromatografía de intercambio aniónico a base de resina Q (AEC), y cromatografía por exclusión de tamaño (SEC). Véase, por ejemplo, Saraswat *et al.*, 2013, Biomed. Res. Int. ID#312709 (p. 1-18) y WO 2009/104074 para descripción de tales métodos.

Producción de bioconjugado para experimentos clínicos

A partir del pre-cultivo, se transfirió una cantidad definida a un biorreactor que contiene un medio rico a $35 \pm 0.2^\circ\text{C}$. El pH y tensión de oxígeno disuelto se mantuvieron. La velocidad de agitación alcanzó 700 rpm.

Cuando la densidad celular alcanzó OD₆₀₀ = 40 ± 5 , se indujo la formación de producto con L-Arabinosa (0.1%) y IPTG (1 mM). La alimentación se inició 24±2 horas después de la inducción y el biorreactor se enfrió. Tan pronto como la temperatura alcanzó 25°C, la alimentación se detuvo y las células se recolectaron.

Homogenización a Alta Presión

Una biomasa que corresponde a 50 L en la recolección, se

descongeló por 1 día de 2 a 8°C. Después 2.5L de amortiguador de Lisis y clarificación se agregaron al contenedor. Se agregó Triton X-100 a una concentración final de 0.5% y las células completamente descongeladas se rompieron por 4 ciclos de homogenización a alta presión a 800 bar. Las células se recolectaron y lavaron usando técnicas estándares.

Análisis de composición de monosacárido

Los bioconjugados que contienen aproximadamente 8 ug de polisacárido se hidrolizaron por seis horas en 104 µl de TFA 3 M a 99°C. El TFA se removió por evaporación y las muestras se lavaron una vez con 500 µl de 2-propanol. Los monosacáridos resultantes se suspendieron en 100 µl de mezcla de etiquetado que contiene 87.1 mg/ml de 1-fenil-3-metil-5-pirazolona (PMP), 50% de MeOH y 150 mM de NaOH. El etiquetado se realizó durante 60 minutos a 70°C. Las muestras se neutralizaron por la adición de 50 µl de 300 mM de HCl y 20 µl de 100 mM de Tris/HCl pH 7.0. Los monosacáridos etiquetados con PMP se purificaron por extracción, una vez con 1 ml de di-butiléter y tres veces con 1 ml de CHCl₃.

Los monosacáridos derivados de PMP fueron separados por RP-HPLC (Merck-Hitachi) en una columna ODS-3 C18 Inertsil (GL Sciences) equipado con una pre-columna. Un gradiente de dos etapas de 100% amortiguador A (13% de acetonitrilo, 87% de H₂O (0.045% de KH₂PO₄, 0.05% de trietilamina, pH 7.0) a 50% de amortiguador A/50% de amortiguador B (21% de acetonitrilo, 79% de H₂O (0.045% de KH₂PO₄, 0.05% de trietilamina, pH 7.0) durante 4 minutos a 100% de amortiguador B durante 47 minutos, se aplicó a 35°C y una velocidad de flujo de 1 ml/min. El volumen de inyección fue 50 µl y la elución se monitoreó por detección UV en línea a 250 nm. Los picos individuales se identificaron por sobreposición con cromatogramas de D-glucosa estándar de monosacárido comercialmente disponible (Sigma-Aldrich #G7528), L-ramnosa (Sigma-Aldrich #R3875), N-acetil-D-glucosamina (Sigma-Aldrich #A8625) y N-acetil-L-fucosamina (Omicron Biochemicals #FUC-006).

Ejemplo 1: Epidemiología

Para determinar la distribución del serotipo de *E. coli* que causa infección del tracto urinario (UTI), se realizó un estudio de epidemiología. Más de 1800 aislados de *E. coli* de muestras de orina humana se recolectaron de sujetos en Suiza y serotipos de antígeno O (OPS) de cada muestra se analizaron usando técnicas de aglutinación clásica. Véase Figura 4.

Se analizaron muestras de orina humana aislada para determinar la identidad de los patógenos en esta y sus patrones de resistencia al antibiótico. Se

obtuvieron aislados de *E. coli* a partir de las muestras después del análisis. Se identificaron aislados de *E. coli* por estrategias de exclusión e inclusión microbiológica que involucran crecimiento en el cromosoma (CPS3) y MacConkey agar. Además, se analizaron aislados de *E. coli* usando un ensayo de aglutinación para determinar su serotipo de antígeno O. Véase DebRoy et al. (2011) Animal health research reviews/Conference of Research Workers in Animal Diseases 12, 169-185. Los aislados de los mismos serogrupos de antígeno O se analizaron, además, para determinar la estructura química de la cadena O de cada aislado. Véase Tabla 1 A. Ciertas cepas aisladas de *E. coli* se determinaron por ser resistentes al antibiótico, que incluyen identificación de cepas resistentes a fluoroquinolona y cepas que producen beta-lactamasa de espectro extendido (ESBL).

Tabla 1A: Distribución de los serotipos de *E. coli* asociados con UTI más comunes a partir de la recolección de 1841 muestras de orina recolectadas en Suiza en 2012. Se muestra la distribución del serotipo de muestras a partir de una subpoblación relevante de 671 sujetos, y la distribución para todas** las muestras.

Serotipos de <i>E. coli</i> más prevalentes asociados con UTI			
Serotipo-O	UTI adquirido en la Comunidad de 18-70 años de edad** (n=671)	Serotipo-O	UTI adquirido en el hospital y la comunidad de todas las edades** (n=1871)
6	10.75%	2	8.75%
2	9.55%	6	8.47%
25	6.87%	25	8.37%
1	5.52%	75	4.56%
4	5.37%	1	4.29%
75	4.78%	8	3.86%
8	3.43%	18	3.53%
18	3.28%	4	3.26%
15	3.28%	15	2.39%
73	2.24%	73	2.17%
16	2.24%	16	1.85%
7	1.94%	7	1.68%

Los Serotipos O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O25, O73, y O75 se aislaron a partir de sujetos independiente de la ubicación, tiempo de aislamiento, síntomas, y población objetivo, sugiriendo que estos son los serotipos predominantes de *E. coli* uropatogénico (UPEC). Por consiguiente, la identificación de los serotipos de antígeno O más prevalentes indica que las vacunas específicas del antígeno O podrían ser limitadas a una subserie de serotipos, es decir, aquellos más asociados con la enfermedad, como se identifica en el estudio descrito en este ejemplo.

Un análisis de retrospectiva de serotipos UTI en 1323 aislados de las tres décadas pasadas en los Estados Unidos obtenidos a partir del centro de referencia de *E. coli* (ECRC), permitió una comparación completa con la literatura y los datos actuales de Suiza. La prevalencia de los 20 serotipos principales se encontró independientemente de la ubicación, tiempo de aislamiento, síntomas, o población objetivo y sugiere serotipos predominantes asociados con UPEC (véase Tabla 1B).

Tabla 1B: Prevalencia de serotipos asociados a UTI más comunes seleccionados de la literatura que varían desde 1987-2011 y de datos Estadounidenses retrospectivamente analizados desde 2000-2011 (ECRC).

INDICACIÓN	UTI TOTAL	CISTITIS	PIELONEFRITIS	US 2000-2010
	datos disponibles de 1860 aislados	datos disponibles de 1089 aislados	datos disponibles de 373 aislados	315 (todos especímenes UTI excepto fecal, todas las edades F+M) ¡Número de no tipables no estuvieron disponibles!
Serotipo				
O1	4.8%	4.1%	5.4%	7.0%
O2	7.1%	4.9%	15.3%	14.0%
O4	7.8%	6.0%	3.2%	3.2%
O6	16.9%	16.3%	7.8%	18.7%
O7	3.3%	2.4%	2.4%	1.9%
O8	1.7%	3.2%	0.8%	3.5%
O15	0.6%	1.5%	0.8%	1.3%
O16	4.3%	3.2%	7.2%	1.9%
O18	7.0%	7.1%	6.7%	7.0%
O21	na	na	na	1.3%
O22	0.6%	0.6%	0.5%	0.0%
O25	3.0%	4.8%	0.5%	8.6%
O75	7.5%	6.0%	8.6%	3.8%
O83	1.9%	0.7%	0.5%	1.3%
O20				1.6%
O77				2.2%
O82				1.9%
otros y no tipables/ no disponibles	33.3%	39.2%	40.2%	
Otros tipos-O (NT no disponibles)				21.0%

Los aislados de serotipos descritos se calcularon como porcentajes en el número total de aislados (Andreu *et al.*, 1997, *J Infect Dis* 176:464-469; Blanco *et al*, 1996, *Eur J Epidemiol* 12: 191-198; Fathollahi *et al.*, 2009, *Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases* 4:77-81; Johnson *et al*, 2005, *J Clin Microbiol* 43:6064-6072; Molina-Lopez *et al*, 2011, *Journal of infection in developing countries* 5:840-849; Sandberg *et al.*, 1988, *J Clin Microbiol* 26: 1471-1476; K. L. 2007, *The Journal of infection* 55:8-18; Terai *et al.*, 1997, *IntJ Urol* 4:289-294). En ciertos casos los datos específicos no están disponibles; por lo tanto, los números de porcentaje pueden solamente dar una indicación de la distribución total del serotipo a partir de diferentes aislados de UTI en estudios descritos y debe ser considerado con precaución. Los otros serotipos descritos identificados, sin embargo, menos prevalentes (O15, O20, O21, O22, O77 y O82)

también están incluidos.

Toda la información de análisis de epidemiología se tomó en conjunto, los 10 serotipos predominantes podrían cubrir un estimado de 60-80% de infecciones de *E. coli* asumiendo una cobertura de subporciones de las cepas no tipeables. Además, los datos muestran la importancia inesperada del serotipo O25 en el estudio de epidemiología de Suiza, cuando se compara con los datos de literatura y datos recientes de los Estados Unidos. Véase Tablas 1 A y B.

Los serotipos de antígeno O de *E. coli* a menudo están compuestos de subtipos, los cuales son distintos, aún estructuralmente y antigénicamente similares. Para identificar subtipos conocidos/no reportados entre los aislados clínicos recolectados, y para identificar los subtipos del antígeno O más prevalentes, las estructuras químicas de los antígenos O a partir de los serotipos más prevalentes se analizaron en más detalle.

Ejemplo 2: O25 de *E. coli*

En años recientes, la incidencia incrementada de cepas positivas a O25 ha sido observada (véase George and Manges (2010) *Epidemiol Infect* 138, 1679-1690) y es evidenciada por el estudio descrito en el Ejemplo 1, donde el serotipo O25 se encontró por ser uno de los cuatro serotipos de *E. coli* principales en términos de prevalencia.

O25A

Una estructura de la unidad de repetición del antígeno O del serotipo O25 de *E. coli*, ha sido previamente publicada (véase Kenne *et al.*, 1983, *Carbohydrate Research* 122, 249-256; y Fundin *et al.*, 2003, *Magnetic Resonance in Chemistry* 41, 4) y se presenta en la Figura 2B. Un grupo *rfb* relacionado con el antígeno O O25 a partir de la cepa de *E. coli* E47a está públicamente disponible (GenBank GUO14554), y es presentado en la Figura 2A. La E47a de *E. coli* se usa como una cepa de referencia para el serotipado de O25. Además, la información de secuencia del grupo *rfb* está disponible a partir de la secuencia del genoma de una cepa que causa bacteriuria asintomática, *E. coli* 83972. (véase Zdziarski *et al.*, 2010, *PLoS Pathog* 6, e1001078). Aunque la expresión fenotípica de O25 no ha sido confirmada, las secuencias del grupo *rfb* de *E. coli* E47a y 83972 son 99.49% idénticas, y sugieren fuertemente que codifican al mismo antígeno O.

El antígeno O a partir de la cepa de *E. coli* 83972 y E47a es designado en la presente como "O25A", debido a que, como se describe abajo, un nuevo antígeno O de *E. coli*, designado "O25B", se identificó con base en el análisis de los aislados clínicos obtenidos en el estudio de epidemiología descrito

en el Ejemplo 1, anterior.

Las funcionalidades para los productos del gen predicho de las cepas de *E. coli* 83972 y E47a han sido propuestas. Véase Tabla 2; GenBank GU014554; y Szijarto, *et al.*, (2012) FEMS Microbiol Lett 332, 131-136.

Tabla 2. Predicciones del gen del antígeno O de O25A a partir del grupo *rfb* como se publica por Wang, *et al.*, (2010) J Clin Microbiol 48, 2066-2074; véase también GenBank GU014554.

Nombre del gen	Función Putativa	Homología más significativa/proteína [organismo], acceso, identidad máx. (BLAST)
<i>rmlB</i>	dTDP-Glucosa 4,6-deshidratasa	dTDP-Glucosa 4,6-deshidratasa (<i>E. coli</i> IAI39), YP_002406996.1, 98%
<i>rmlD</i>	dTDP-6-Desoxi-D-glucosa 3,5-epimerasa	dTDP-6-Desoxi-L-manosadeshidrogenasa (<i>E. coli</i>), ACA24825.1, 97%
<i>rmlA</i>	Glucosa-1-fosfato timidililtransferasa	Glucosa-1-fosfato timidililtransferasa (<i>E. coli</i> IAI39), YP_002406998.1, 99%
<i>rmlC</i>	dTDP-4-deshidroramnosa 3,5-epimerasa	RmlC (<i>E. coli</i>), ACA24796.1, 70%
<i>Wzx</i>	flipasa de antígeno O	transportador de antígeno-O (<i>E. coli</i>), WP_000021239.1, 100%
<i>wekA</i>	Glicosiltransferasa	dTDP-Rha:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP α -1,3-ramnosiltransferasa (<i>E. coli</i>), WP_000639414.1, 99%
<i>wekB</i>	Glicosiltransferasa	WcmS; UDP-Glc:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP β -1,6-glucosiltransferasa (O158 de <i>E. coli</i>) ADN43874.1, 40%
<i>Wzy</i>	polimerasa de antígeno O	Wzy (<i>E. coli</i>), ADR74237.1, 30%
<i>wekC</i>	Glicosiltransferasa	WfbF; UDP-Glc:FucNAc-GlcNAc-UPP α -1,3-glucosiltransferasa (<i>E. coli</i>), ABG81807.1, 46%
<i>fnlA</i>	UDP-N-acetilglucosamina-4,6-deshidratasa/5-epimerasa	UDP-N-acetilglucosamina 4,6-deshidratasa/5-epimerasa (<i>E. coli</i>), WP_001556096.1, 95%

Nombre del gen	Función Putativa	Homología más significativa/proteína [organismo], acceso, identidad máx. (BLAST)
<i>fnlB</i>	UDP-2-acetamido-2,6-didesoxi-beta-L-talosa 4-deshidrogenasa	FnlB (<i>E. coli</i>), AAY28261.1, 97%
<i>fnlC</i>	UDP-N-acetilglucosamina 2-epimerasa	UDP-N-acetilglucosamina 2-epimerasa (<i>E. coli</i>) WP_000734424.1, 98%
<i>wbuB</i>	Glicosiltransferasa	UDP-L-FucNAc: GlcNAc-UPP α -1,3- N-Acetilfucosaminiltransferasa (<i>E. coli</i>) P12b, O26], YP_006169152.1, 73%
<i>wbuC</i>	Glicosiltransferasa truncada	WbuC (<i>E. coli</i>), AAV74548.1, 72%

Las comparaciones de estructura y grupo de gen implican que todas las funciones necesarias para el ensamble de OPS de O25A son codificadas dentro del grupo *rfb* localizado entre *galE* y *gnd*. Las funciones de las varias enzimas del grupo de genes *rfb* (véase Fig. 2A) son como sigue:

El RmlBDAC codifica enzimas requeridas para la biosíntesis de dTDP-L-Ramnosa, el cual es el sustrato para la adición de ramificación L-Rha a la unidad de repetición OPS.

El FnlABC codifica las enzimas requeridas para la biosíntesis de UDP-L-FucNAc, el cual es el sustrato donador para la adición de L-FucNAc a la repetición OPS de O25.

WekABC y wbuBC son glicosiltransferasas de conformidad con el análisis de homología. Sin embargo, wbuC aparece corto y truncado y improbable que sea funcional. De este modo, la anotación funcional más probable indica que existen cuatro glicosiltransferasas que generan los cuatro enlaces para ensamble de la unidad de repetición.

Wzx y Wzy son requeridos para intercambio del BRU al espacio periplásmico y su polimerización en Und-PP.

Todas las funciones requeridas para sintetizar la estructura de la unidad de repetición O25 A publicada son codificadas por los grupos *rfb* de *E. coli* E47a y 83972. De este modo, se concluye que el grupo *rfb* es responsable de la codificación de OPS de O25A.

O25B

En 2009, aislados clínicos de *E. coli* a partir del entorno hospitalario Español se caracterizaron por determinar grupos clonales. Véase Blanco, *et al.*, (2009) J Antimicrob Chemother 63, 1135-1141. Se hizo la caracterización de a) el tipo ESBL, b) el serotipo O, c) genes de virulencia, d) tipado de secuencia de sitio múltiple (MLST), y e) tipado de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). Los resultados indican que aproximadamente 20% de todos los aislados podrían ser atribuidos al mismo clon: Serotipo y MLST O25:H4 ST131, ESBL tipo CTX-M15, Filogrupa B2, que codifica una serie específica de genes de virulencia. El análisis de los componentes del grupo *rfb* de aislados clínicos representativos mostró una secuencia al 3' desconocida cuando se compara con la secuencia de la cepa tipada a partir de la cepa E47a, y también de aislados clínicos identificados por un método de tipado por PCR específico del alelo (Véase Clermont *et al.*, 2008, J Antimicrob Chemother. 61(5): 1024-8.; Clermont *et al.*, Diagn. Microbiol Infect Dis. 2007, 57(2): 129-36.; y Li, *et al.*, 2010, J Microbiol Métodos 82, 71-77. En 2013, Phan *et al.*, publicó la secuencia del genoma del clon O25B:H4 ST131, confirmando que el clon es un derivado K-12 de acuerdo con la estructura de su grupo de genes como se reportó antes. Véase Phan *et al.*, 2013, PLOS Genetics 9(10): 1-18 (e1003834). En conjunto, los datos sugieren que un nuevo clon de aglutinación O25 ha surgido en *E. coli* aislado de entornos hospitalarios, y que el clon tiene fenotipos específicos ESBL, MLST, y PFGE, y contiene un grupo de gen de antígeno O alterado.

Tipado de PCR

Para determinar si el serotipo O25B está presente entre las cepas de *E. coli* aisladas identificadas en el estudio de epidemiología descrito en el Ejemplo 1, las cepas positivas a aglutinación de O25 se analizaron por tipado de pCR par O25 y O25B. Se realizó PCR usando colonias elegidas de una caja de petri como fuente de ADN de plantilla y diferentes cebadores de oligonucleótidos. Se usaron cebadores específicos de O25, que se basan en la amplificación de *wzy* de E47a O25, y se describen en Li, *et al.*, (2010) J Microbiol Métodos 82, 71-77. También se usaron donde los cebadores específicos para O25B descritos en Blanco, *et al.*, (2009) J Antimicrob Chemother 63, 1135-1141, los cuales son específicos para una porción al 3' no definida del grupo *rfb* de O25B (LNB220). De conformidad con Phan *et al.*, 2013, este par de oligonucleótido específico de O25B se templea en una porción al 3' del grupo de *rfb* de O25B.

De los 24 aislados clínicos probados con un fenotipo positivo a aglutinación de O25, 20 se asignaron al serotipo O25B por tipado de PCR,

mientras los 4 restantes fueron positivamente identificados por pertenecer al serotipo O25A por tipado de PCR. De este modo, de manera sorprendente, las cepas del serotipo O25B fueron determinadas por ser más frecuentes entre las cepas analizadas que las cepas del serotipo O25A.

Secuenciamiento del Grupo

Para analizar el grupo *rfb* de O25B genéticamente, se secuenció el grupo de una cepa positiva a PCR de O25B, designada “upec138”. Se identificaron los genes y sus homólogos de proteína relevante más cercanos con nomenclatura sugerida son listados en la Tabla 3, abajo. Los genes específicos para O25B y ausentes en O25A están indicados con un asterisco.

Tabla 3. Predicciones del gen del antígeno O de O25B a partir del grupo *rfb*.

Nombre del gen	Función Putativa	Homología más significativa/proteína [organismo], acceso, identidad máx. (BLAST)
<i>rmlB</i>	dTDP-Glucosa 4,6-deshidratasa	producto del gen rffG [NA114 de <i>E. coli</i>], YP_006139244, 99%
<i>rmlD</i>	dTDP-6-Desoxi-D-glucosa 3,5-epimerasa	dTDP-4-deshidroramnosa reductasa [NA114 de <i>E. coli</i>], YP_006139243, 100%
<i>rmlA</i>	Glucosa-1-fosfato timidililtransferasa	producto del ge rffH2 [NA114 de <i>E. coli</i>], YP_006139242, 100%
<i>rmlC</i>	dTDP-4-deshidroramnosa 3,5-epimerasa	dTDP-4-deshidroramnosa 3,5-epimerasa [NA114 de <i>E. coli</i>], YP_006139241, 99%
<i>Wzx</i>	flipasa de antígeno O <i>Wzx</i>	<i>Wzx</i> [<i>E. coli</i> cepa E47a], ADI43260, 99%
<i>wekA</i>	Glicosiltransferasa (GT)	dTDP-Rha:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP α -1,3-ramnosiltransferasa [<i>E. coli</i> 83972], ZP_04004894, 93%
<i>wekB</i>	Glucosiltransferasa (GT)	UDP-Glc:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP β -1,6- glucosiltransferasa [<i>E. coli</i> 83972], YP_006106413, 93%
<i>Wzy</i>	polimerasa del antígeno O	proteína de la membrana [<i>E. coli</i> 83972], YP_006106412, 94%
<i>wbbJ*</i>	O-acetil transferasa	O-acetil transferasa [<i>E. coli</i> 83972], YP_006106411, 95%
<i>wbbK*</i>	Glicosiltransferasa (GT)	UDP-Glc:Rha-GlcNAc-UPP α -1,3-glucosiltransferasa [<i>E. coli K-12</i>], AAB88407, 60%
<i>wbbL*</i>	Glucosiltransferasa (GT)	proteína de biosíntesis de lipopolisacáridos, fragmento C-ter, proteína truncada [<i>E. coli</i> DH1], YP_006129367, 62%; dTDP-Rha:GlcNAc-UPP α -1,3-ramnosiltransferasa

La composición del grupo *rfb* muestra claras diferencias con la composición del grupo O25A. Los genes en la porción 5' del grupo son cercanamente homólogos entre sí (*rmlD* a *wzy*; *E. coli* E47a y 83972). Esto no es sorprendente para los genes *rml* los cuales son homólogos en muchas cepas de

E. coli que sintetizan L-ramnosa. La homología de los productos del gen de O25A y B alcanza al gen *wecC* (O25A), antes de que caiga a niveles por debajo de 25% de identidad, indicando falta de relación de las secuencias de la proteína. Véase Figura 3B. Además, se encontró que los genes de biosíntesis de UDP-Nacetilfucosamina de O25A están ausentes en la cepa upec138 (O25B), ya que son dos glicosiltransferasas corriente abajo de *fnlABC*. Véase Fig. 3B. Tomados en conjunto, estos datos sugieren que las cepas O25B son incapaces de sintetizar UDP-L-FucNAc, excepto que los genes de la biosíntesis de L-FucNAc podrían ser codificados fuera del grupo *rfb*. Sin embargo, no existe un caso único reportado para un sitio *fnlABC* fuera del grupo *rfb* cuando el L-FucNAc está presente en el BRU del antígeno O. De este modo, no es probable que la cepa 138 sea capaz de sintetizar la unidad de repetición básica de O25A publicada (BRU).

Los genes identificados en el grupo *rfb* de O25B que no están presentes en el grupo *rfb* del serotipo O25A codifican dos glicosiltransferasas y una O-acetiltransferasa. Estos tres grupos comparten la misma organización y las proteínas codificadas tienen alta homología con los genes *wbbJKL* codificados encontrados y caracterizados en las cepas K-12 de *E. coli* del genotipo del grupo *rfb* O16. Véase Figura 3B. De conformidad con el parentesco genético entre los serotipos O25B y O16, la nomenclatura de los genes *rfb* de O16, *wbbJKL*, se aplicó a los genes homólogos identificados en el grupo *rfb* de O25B.

Se conoce la estructura del BRU de O16 y las funciones del gen de *wbbJKL* han sido determinadas. Véase Steveneson *et al.*, (1994) J Bacteriol. 176(13):4144-56. Los *wbbJKL* son responsables de la acetilación de L-Ramnosa, transferencia de un residuo D-Glc a L-Rha-D-Glc-UndPP, y la transferencia del L-Rha a D-GlcNAc-UPP, el cual se forma por *wecA* a partir del grupo ECA. Con base en la homología con *wbbJKL* de O16, y las funciones conocidas de *wbbJKL* de O16, se deduce que el grupo *rfb* de O25B sintetiza una estructura que contiene elementos parcialmente O16 y parcialmente O25A en conjunto. Se razonó que puede ser altamente probable que *WbbJKL*_{O25B} sintetice la misma estructura como *WbbJKL*_{O16}, es decir α -D-Glc-1,3- α -L-Rha(2Ac)-1,3- α -D-GlcNAc. Esta estructura de trisacárido es idéntica al esqueleto de "núcleo" no ramificado de O25A con la única excepción de que L-Rha(2Ac) reemplaza el L-FucNAc. El reemplazo podría ser, por consiguiente, uno conservativo, ya que D-FucNAc y L-RhaOAc son ambos monosacáridos con una función 6-desoxi y 2-acetilo. La única diferencia es la conformación, ya que la fucosa está relacionada con galactosa, y ramnosa a manosa, resultando en una orientación diferente del grupo OH en la posición 3 y el grupo metilo en la posición 5. Los enlaces entre los monosacáridos podrían ser

idénticos (todos α -1,3), indicando que las estructuras podrían ser similares en forma y características químicas. En analogía, las proteínas codificadas en la parte corriente arriba de los grupos *rfb* de O25A y B (*rmlDCAB* y *wekAB*) ramifican el BRU de O25A o B por unión de la ramificación D-Glc y L-Rha a ya sea el trisacárido del esqueleto del “núcleo”. Esto podría significar que pueden aceptar cualquier esqueleto (con L-FucNAc o L-Rha(2Ac)) como un sustrato.

La presencia de L-Rha como el segundo monosacárido a partir del extremo reductor de O25B BRU explica porqué la biosíntesis de L-FucNAc puede estar ausente en O25B. El UDP-L-FucNAc no es necesario, debido a que es reemplazado por los genes de la biosíntesis de dTDP-L-Rha que están presentes en el extremo 5' del grupo (*rmlDBAC*).

Phan *et al.*, 2013 tiene un análisis genético similar en un aislado clínico de O25B, pero concluye de manera diferente. También tiene secuenciado el genoma completado para búsqueda para el grupo del gen de la biosíntesis de UDP-FucNAc; sin embargo, declara que la maquinaria para UDP-L-FucNAc en la cepa O25B:H4 ST131 EC958 está perdida no solamente en el grupo *rfb* de O25B, sino también en la cepa completa. Sin embargo, Phan concluye que el UDP-L-FucNAc debe ser sintetizado en una forma diferente, asumiendo que O25B:H4 ST131 EC958 hace la misma estructura del antígeno O como E47a, es decir, O25A. Sin embargo, se describe en la presente que el escenario más probable es que las cepas de O25B no puedan hacer L-FucNAc, sino probablemente reemplazar el segundo residuo del BRU con un residuo de L-ramnosa O-acetilado, y los genes requeridos para este cambio son exclusivamente codificados en el grupo *rfb*.

Además, la presencia de un homólogo de O-acetil transferasa en el grupo O25B sugiere la O-acetilación en el BRU de O25B, una modificación ausente en O25A. Por consiguiente, se determinó que las estructuras del antígeno O25 de los serotipos O25A y O25B deben ser diferentes.

Análisis Estructural de O25B

Para confirmar la hipótesis de una diferente estructura del antígeno O25, se analizaron la composición química y arreglo de los antígenos O de los aislados clínicos de O25 descritos en el Ejemplo 1. Para caracterizar las estructuras de OPS de O25 en más detalle, se usaron varios métodos.

Primero, la estructura del antígeno O se analizó por SDS PAGE. El lipopolisacárido (LPS) de aislados clínicos se analizó por diferencias en la movilidad electroforética usando diferentes métodos de tñido después de SDS PAGE. Para visualizar cantidades de LPS, se realizaron tñido de plata y

manchado Western específicos de anti-O25. Véase Fig. 5, los cuales representan resultados del análisis de 10 aislados. Los datos muestran que intensidades de señal similares se obtienen por teñido de plata de las diferentes preparaciones de LPS. Por el contrario, probar con el antisuero específico mostró intensidades de señal más fuertes en 3 de 10 muestras (aislados upec436, upec767, upec827). Se especula que las diferentes intensidades de señal se originan debido a diferencias en la estructura de OPS.

Para elucidar la estructura de O25B en detalle, se aplicaron diferentes métodos analíticos. El aislado clínico upec138 fue positivo para el O26B por PCR, y presentó un reconocimiento más débil por el antisuero de aglutinación de O25 que las cepas de O25A. Véase Fig. 5. Además, la cepa es ESBL, pero sensible a FOS, IPM, y TZP, y resistente a AM, CXM, NOR, y CIP. Otro aislado clínico, la cepa upec436, fue negativa para O25B por PCR, pero positiva para el O25 general (O25A) por PCR. El upec436 también se encontró por ser fuertemente reactivo con el antisuero de aglutinación O25 cuando su LPS se analizó por manchado Western. Véase Fig. 5. El LLO de ambas cepas se extrajo, se etiquetó con un 2AB y se analizó por HPLC de fase normal. Véase Fig. 6; el LLO de upec138 y upec436, 9.079 y 9.081). Los patrones de elución mostraron diferencias claras entre los dos extractos. El análisis de MS/MS de los picos específicos de la cepa detectó señales compatibles con las estructuras de BRU esperadas.

Señales en la cepa upec436 (9.081): Se analizó el pico al tiempo de elución de 62' por MS y se encontró que contiene como la masa principal una molécula con $m/z=1021$ Da, es decir, una molécula que corresponde a la masa esperada del BRU de OPS O25A completo. El MS/MS produce un patrón de fragmentación compatible con la secuencia de monosacárido de O25A (Fig. 7A; MS/MS de $m/z=1021$).

Señales en la cepa upec138: La masa principal en el pico al tiempo de elución de 50' fue m/z 1022 Da, es decir, un Da más que la unidad de repetición completa de O25A. El análisis de MS/MS (Fig. 7B; MS/MS de O25B) mostró comportamiento de fragmentación casi idéntico a la unidad de repetición de O25A, y localizó una diferencia de 1 Da en el 2do. monosacárido a partir del extremo reductor (identificado por un ion Y de fragmentación de $m/z=551$ en MS/MS de O25A, y $m/z=552$ en la cepa upec138). Un pico adicional de elución a 60' mostró fragmentación similar, pero una diferencia de 42 Da en la masa iónica madre ($m/z=980$) que localiza al mismo monosacárido ($m/z=510$), es decir, el segundo a partir de extremo reductor. La interpretación de estos resultados se proporciona

abajo.

La extracción de OPS, hidrólisis y procedimiento de etiquetado de 2AB, involucra el tratamiento de ácido para remover el Und-PP a partir del OPS. Se mostró que las condiciones de tratamiento remueven parcialmente la O-acetilación, pero no la N-acetilación. De este modo, es probable que el pico en 60' represente una masa BRU desacetilada que emerge de la hidrólisis química del material en el pico a 50'. Tomados en conjunto, estos datos indican que existe una O-acetilación en O25B en la misma posición del monosacárido ya que existe una N-acetilación en el L-FucNAc de O25A.

Para confirmar químicamente que la acetilación en el segundo residuo a partir del extremo reductor está O-ligada, se realizó un ensayo de desacetilación. El pico específico de O25N de HPLC de LLO 2AB al tiempo de elución de 50', se recolectó a partir de una cepa positiva por PCR de O25B y se trató con álcali descrito bajo "Métodos". El re-análisis por HPLC resultó en un pico al tiempo de elución 60' como se identifica en un pico O25B de la Fig. 6, que contiene una masa principal de $m/z=979$, con un patrón iónico de fragmentación de MS/MS consistente con un BRU de O25B que tiene pérdida de su grupo O-acetilo. Los grupos N-acetilo son estables hacia el tratamiento álcali como se muestra por el grupo N-acetilo restante en el extremo reductor D-GlcNAc en la misma molécula.

En conclusión, se determinó que la cepa upec138 representativa de O25B es estructuralmente y genéticamente relacionada con el O25A y O16 de OPS (Fig. 3 A y B) de *E. coli*. El O25B difiere de O25A en que tiene una estructura de unidad de repetición que contiene un grupo acetil-O en lugar de un grupo N-acetilo en el segundo monosacárido de la unidad de repetición, el cual es un residuo L-Rha y no uno D-FucNAc. Estos cambios fueron más probablemente causados por un reemplazo de la maquinaria de biosíntesis de UDP-FucNAc y la transferasa de D-FucNAc por un estiramiento de ADN que codifica dos glicosiltransferasas y una O-acetiltransferasa. Estos genes están relacionados con el grupo del gen O16, con base en la homología y análisis de funcionalidad. Las estructuras finales son diferentes, pero similares, explicando la reactividad cruzada observada con el antisuero de aglutinación de O25.

Como se discute anteriormente, se concluye y se propone con base en los análisis de sus grupos de *rfb*, que el OPS de O25A contiene L-FucNAc, mientras la estructura está ausente en O25B. Para investigar si el FucNAc está ausente de O25B, se realizó análisis de composición de monosacárido de bioconjugados de EPA producidos en las cepas O25A y O25B (Fig. 9) usando el

método de etiquetado de PMP y método de análisis de HPLC descrito anteriormente. Para producir bioconjugados, se prepararon aislados clínicos de *E. coli* con los fenotipos O25A y O25B, y se modificaron para producción óptima del bioconjugado. Como parte de la modificación, los genes *waaL* de las cepas upec_436 (O25A) y uepc_138 (O25B) se detectaron como se describe previamente (véase Datsenko and Wanner, (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97, 6640-6645) informado por el método para determinación de tipo de núcleo (véase Amor, et al., (2000) Infect Immun 68, 1116-1124). Las cepas resultantes se transformaron con los plásmidos de expresión para 4S-EPA (pGVXN659) y una oligosacaril transferasa, PglB (pGVXN939), para producción de O25A; y con pGVXN14 y pGVXN539 (produciendo 2S-EPA) para producción de la producción del bioconjugado de O25B. Los bioconjugados de O25B se produjeron en un matraz agitado de 2L con purificación de afinidad subsecuente a partir de los extractos periplásmicos por IMAC. Se produjeron conjugados de O25A por fermentación de alimentación por lotes, y se purificaron por un procedimiento de purificación de dos etapas partiendo del homogenado de célula completa clarificado generado por homogenización a alta presión como se describe en la sección de métodos anterior. Se realizó análisis de composición de monosacárido como se describe anteriormente.

Estos resultados confirman que la ausencia de una señal para FucNAc en los bioconjugados se deriva de O25B, mientras los bioconjugados que contienen O25A muestran un pico en el tiempo de elución esperado como se determina sometiendo una mezcla de monosacáridos al mismo procedimiento de procesamiento como un control. De este modo, se confirmó que la estructura putativa de O25B es, como se esperaba, con base en el análisis del grupo *rfb*, menos L-FucNAc.

La estructura completa de la unidad de repetición (RU) del polisacárido del antígeno-O (O-PS) a partir del antígeno O de O25B de *Escherichia coli* se determinó por resonancia magnética nuclear del bioconjugado después de la digestión parcial de la porción de la proteína portadora EPA. El análisis confirmó que el O-PS O25B está compuesto de un RU pentasacárido. Las señales ^1H y ^{13}C fueron asignadas por técnicas de correlación de NRM 2d, lo cual confirma que la estructura del RU de OP-S O25B difiere de la estructura de RU de OP O25A publicada (Kenne, L., et al. 1983, Carbohydr. Res. 122:249-256; Fundin, J. Et al. 2003. Magn. Reson. Chem. 41:202-205) por la sustitución de un residuo α -3-FucpNAc por un residuo α -3-Rhap, con más del 90% de este residuo siendo O-acilado en la posición C2. Se muestra el O25B O-PS RU completo abajo (O25B'):

Producción y caracterización de Bioconjugado

Para analizar los antígenos de polisacárido O25A y O25B adicionales, se produjo más material de bioconjugado. Para O25A, el lote purificado de O25A-EPA de lo anterior se usó para experimentos de caracterización adicional. Para la producción de O25B-EPA, se construyó una cepa con un grupo de O25B genotípicamente integrado: W3110 Δ waaL AgtrAB Δ rfaO16:rfa(upec138), con pGVXN1076 y pGVXN970 plásmido. Esta cepa se construyó partiendo de W3110 por los métodos de Datsenko y Wanner y una técnica de recombinación homóloga para integración dirigida al sitio de insertos grandes en cromosomas bacterianos (véase Solicitud de Patente Internacional No. PCT/EP2013/071328).

Los bioconjugados O25B resultantes se caracterizaron usando ensayos de liberación estándar y caracterización. Los bioconjugados se purificaron usando dos etapas de cromatografía de exclusión de tamaño e intercambio aniónico consecutivas, proporcionando 97.2 y 98.1% de preparaciones del bioconjugado O25A y O25B puras, respectivamente. Se usó la cuantificación SDS PAGE para análisis de pureza. Véase fig. 10, (O25A) y Fig. 11 (O25B). Se calcularon relaciones de azúcar a proteína con base a la cuantificación de azúcar por el ensayo de antrona (véase Laurentin and Edwards, (2008) Anal Biochem 315, 143-145) y el ensayo BCA de la concentración de proteína, resultando en 40.2 y 26.6% para bioconjugados de O25A y O25B. La cromatografía de exclusión por tamaño analítico mostró un estado monomérico de las partículas de acuerdo con el radio hidrodinámico esperado de EPA con las cadenas de glicano unidas.

Aplicaciones

Para atender el potencial inmunogénico de la estructura O25B, se realizaron bioconjugados O25B y O25A usando experimentos preclínicos variados. Como se muestra en la Fig. 5, todos los aislados clínicos identificados como O25 positivo en el Ejemplo 1 (es decir, aislados tanto O25A como O25B) son positivos con antisero O25A comúnmente usado para detectar serotipos O25 (suero de tipificación de la cepa E47a de O25A) en manchados Western. Así, el antisero antiO25A parece ser reactivo cruzado al LPS de las cepas O25B. Para analizar la respuesta del anticuerpo y reactividad cruzada en detalle, se produjeron los bioconjugados O25. Se usó proteína de unión a maltosa (MBP) como una proteína portadora, y la proteína portadora se unió a O25A u O25B. La tabla 4 describe las cepas usadas para producción de proteína. Las cepas usadas se identificaron por PCR por su genotipo O25A o B. Se realizó la expresión en medio TB y el

producto de proteína se purificó de extractos periplásmicos.

Tabla 4

Bioconjugado	Cepa	Plásmido pgIB	Plásmido portador	Procedimiento de purificación
MBP-O25A	upec436 <i>ΔwaaL::kanR</i>	pGVXN939	pGVXN659	Q, A
MBP-O25B	upec350 <i>ΔwaaL::clmR</i>	pGVXN939	pGVXN659	Q, A, S

Q: Recurso Q purificación; A: resina de amilosa; S: cromatografía de exclusión de tamaño

Se realizaron inmunizaciones usando los bioconjugados obtenidos usando protocolos de inmunización de conejo estándar (el protocolo de velocidad del día 28 eurogenetech). Se inyectó 50 µg de polisacárido unido a MBP en los días 0, 7, 8 y 18 con un compuesto inmunoestimulador libre de Freud propietario. El antisuero mezclado final resultante obtenido en el día 28 después de la primera inmunización se probaron por su especificidad hacia LPS de O25A u O25B. La figura 22 muestra una comparación de las reactividades antisuero hacia los LPS respectivos (O25A u O25B). Se preparó LPS de upec436 y upec138 por digestión de la proteína K de las muestras de célula completa en amortiguador Lämmli SDS-PAGE. La misma cantidad de LPS se cargó en dos geles SDS-PAGE seguida por electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa y detección usando antisuero O25A y O25B. Los resultados muestran que el antisuero O25A reconoce el LPS O25A mejor que LPS O25B, mientras el antisuero O25B reconoce el LPS O25B mejor que LPS O25A. Este resultado indica que el antígeno autólogo hace un mejor antígeno. Así, la inclusión del antígeno O25B en una vacuna puede proporcionar mejor protección contra las cepas clínicas O25B predominantes del grupo O25 que el antígeno O25A.

Ejemplo 3: O1 de E. coli

Las bases de datos estructurales listan diferentes estructuras de subserotipo para O1 de *E. coli*. En particular, O1A, O1A1, O1B, O1A y O1A1 son estructuralmente idénticos y se cree que están asociados con enfermedades, a pesar de que O1B y C no han sido reportados por ser patogénico (véase Gupta, et al. (1992) J Bacteriol 174, 7963-7970), y representan una minoría entre aislados

de O1. Las estructuras de O1A/O1A1, O1B Y O1C se muestran en la Fig. 12B. Para analizar la distribución del subserotipo de O1 en el estudio epidemiológico de UPEC del Ejemplo 1, las estructuras del antígeno O de varios aislados clínicos del estudio se analizaron en detalle. Primero, la estructura LPS de 12 cepas determina ser positivo para O1 por ensayo de aglutinación se analizaron por SDS PAGE. Véase Fig. 13: teñido de plata O1 y manchado Western.

El teñido de plata mostró señales LPS típicas en todas las líneas que contienen extractos de los aislados clínicos O1. El teñido fuerte en una movilidad electroforética de aproximadamente 10-15 kDa describe el núcleo A de lípido, y una señal como escalera con movilidades más lentas representa el núcleo A de lípido modificado con polímeros de carbohidrato compuestos de diferentes números de unidades de repetición del antígeno O. Cuando se compararon los LPS de diferentes aislados, aparecen diferencias en la distribución de longitud modal, la movilidad electroforética de bandas individuales, y el patrón líder. Con base a estas observaciones, se pueden identificar tres grupos: (i) más aislados (upec002, upec010, upec032, upec140, upec108, upec143, upec276, upec399 y upec425) exhiben movilidad electroforética indistinguibles de bandas individuales, solamente difieren en intensidad de señal y longitud de cadena promedio (distribución de longitud modal); (ii) dos aislados (upec119 y upec256) aparecen por tener movilidad ligeramente más rápida en cada banda LPS de unidad de repetición, lo que sugiere una estructura diferente, por ejemplo, una modificación diferente del núcleo A de lípido; y (iii) señales obtenidas de upec1096 aislado aparece como una columna en lugar de una escalera, indicando una estructura OPS diferente. Véase Fig. 13A.

En análisis por manchado Western y detección usando el antisuero antiO1 muestra que LPS de todos, pero upec1096 se detecta por anticuerpos O1 específicos, indicativo de moléculas LPS reactivo cruzado. Esto significa que 11 de los aislados son O1, y que upec1096 es más probable no un aislado O1 (es decir, fue un positivo falso por ensayo de aglutinación).

Para analizar la similitud estructural de los antígenos O1 en detalle, el etiquetado 2AB de LLO y la técnica HPLC de fase normal de alta resolución se usó como se describe anteriormente. La fig. 14A muestra una superposición de los cromatogramas obtenidos desde 5 de los 11 aislados clínicos. El área de huella dactilar del OPS aparece en los tiempos de retención de 110 a 150 minutos. Los perfiles indican que todas las muestras tienen señales que aparecen en los mismos tiempos de retención, indicando estructuras de moléculas idénticas. Las diferencias observadas son la distribución de intensidad, es decir, el tiempo de

elución de la señal máxima media, y las intensidades de señal general. Los 6 extractos restantes resultan en picos en los mismos tiempos de elución con diferencias en intensidades. Solamente la muestra upec1096 fue diferente con respecto al patrón del pico, que confirma la diferencia estructural notada anteriormente.

Se utilizó el análisis de MS/MS de los contenidos de pico individuales por análisis MALDI-TOF/TOF para identificar la secuencia de monosacáridos en las muestras de O1 (ver Fig. 14B). El análisis por MS se realizó de muestras extraídas no de aislados clínicos, pero de una cepa W3110 Δ waaL que contiene un cósmido con el grupo *rfb* de upec032. Los picos eluidos a tiempo de elución de 50, 80, 96, y 108 minutos contenían masas principales de $m/z = 1021.4, 1849.6, 2693.9, 3540.4$. La serie de iones de fragmentación obtenida después de MS/MS fueron consistentes con 1, 2, 3, y 4 unidades de repetición de un HexNAc, tres desoxihexosas, y un HexNAc de ramificación. Estos datos sólo se pueden explicar por la estructura de subserotipo O1A. La serie de picos descrita representa el OPS O1 unido a UPP en los aislados clínicos, y cada pico consecutivo difiere del anterior por una unidad de repetición.

Estos datos confirman las declaraciones de la literatura que la estructura representativa del serotipo O O1 de *E. coli* en los aislados de UTI clínicos del estudio descrito en el Ejemplo 1 es el subtipo O1A.

Para producir un bioconjugado que lleva el polisacárido O1A, las cepas de *E. coli* W3110 se diseñaron genéticamente para expresar el OPS O1A. Las cepas resultantes fueron W3110 Δ *rfb*O16::*rfb*O1 Δ waaL, que contienen el grupo *rfb* de un aislado clínico positivo O1 (GU299791*, grupo que varía desde *rmlB-wekO*). El OPS O1A que expresa las cepas huésped se construyó mediante recombinación homóloga. El grupo *rfb* de un aislado clínico de O1A se amplificó usando apareamiento de oligonucleótidos por PCR en el ADN que flanquea el grupo *rfb*. El ADN amplificado luego se utilizó para reemplazar el grupo de antígeno O endógeno de la cepa W3110 de laboratorio bien caracterizada por la recombinación homóloga descrita en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/EP2013/071328. Los plásmidos de expresión para las proteínas portadoras pGVXN659 y para Pg1B (pGVXN114, 939, 970, 971) se insertaron por transformación y se confirmó la expresión de O1 (ver la Fig. 15 y Fig. 16).

En un experimento separado, el aislado de O1 clínico upec032 se diseñó genéticamente para producir bioconjugados. La ingeniería requirió que se considerara el fenotipo sensible a antibióticos del aislado clínico. upec032 Δ waaL se construyó y se transformó con pGVXN939 y pGVXN579 para la producción de

bioconjugado usando MBP como proteína portadora. La ventaja de usar MBP y EPA como proteínas portadoras es la posibilidad de producir antisueros con ambas lo que resulta en antisueros que son de reacción cruzada hacia el componente de polisacárido, pero no el portador. Tales antisueros son herramientas útiles para la evaluación de experimentos preclínicos, por ejemplo, como agentes de revestimiento para desarrollar ensayos de ELISA específicos de polisacáridos.

Ejemplo 4: O6 de *E. coli*

El serotipo O6 de *E. coli* es el ExPEC más frecuente reportado hasta la fecha (George, D. B. y Manges, A. R. (2010) *Epidemiol Infect* 138, 1679-1690). No sólo el estudio descrito en el Ejemplo 1, sino también los datos tomados de la literatura confirman que el serotipo O6 está entre los cuatro mejores serotipos en muchos ExPEC que causaron manifestaciones (ver Fig. 4).

Dos estructuras del OPS O6 se han reportado en la literatura (ver Jann et al, *Carbohydr. Res.* 263 (1994) 217-225, y Jansson et al., *Carbohydr. Res.* 131 (1984) 277- 283). Las estructuras de los antígenos O6 reportados se muestran en la Fig. 17B. Son idénticas excepto por el monosacárido de ramificación de cada uno, que es ya sea Glc o GlcNAc. Sin embargo, la literatura no ha identificado la estructura O6 predominante en aislados clínicos implicados en UTI.

Para elegir la estructura más representativa del antígeno O6 para fines de vacuna, las estructuras de OPS de aislados de *E. coli* clínicos positivos a aglutinación de O6 del estudio del Ejemplo 1 se investigaron usando el mismo enfoque que se describió anteriormente para los serotipos O1. La tinción con plata y manchado Western usando antisuero anti O6 identificaron uno de 12 aislados clínicos no reactivos al suero anti O6, aunque LPS se tiñó con plata en todas las muestras (no mostrado), lo que sugiere un resultado de aglutinación falso positivo. Sin embargo, es probable que las diferencias de Glc o GlcNAc no sean detectadas por desplazamiento de movilidad electroforética en geles.

Para un análisis de estructura detallado, se utilizó obtención de huella de LLO. Como referencia para cualquiera de las dos estructuras reportadas, los extractos de las cepas con Glc (CCUG11309) y GlcNAc (CCUG11311) de ramificación reportadas se incluyeron en el análisis. La comparación de las dos trazas de HPLC muestran series de picos eluidos a 70.8, 103.3 y 122.2' para muestras derivadas de CCUG11309, y series de 68.8, 100.3 y 118.3 para las muestras de CCUG11311. Ver Fig. 18A. Los picos se analizaron por MS para las principales masas presentes en los picos y MS/MS para la secuencia de

monosacáridos de estas masas principales. Los datos confirmados para las series de pico derivadas de extracto de CCUG11311 $m/z = 1094.4$, 2027.6 , y 2962 (MS0154), correspondieron a 1, 2, y 3 polímeros con ramificación GlcNAc como se esperaba. $m/z = 1053.4$, 1945.7 , 2836.9 y con Glc de ramificación se identificaron previamente en extractos de una cepa W3110 que expresa el grupo *rfb* clonado de aislado clínico de CFT O6, que tiene tiempos de elución de pico de huella 2AB idénticos como CCUG11309 (MS0138). Cuando los cromatogramas obtenidos de los 12 aislados clínicos se compararon con las cepas de referencia, 11 señales contenían las series de pico indicativas del OPS O6 con un residuo Glc de ramificación. Cinco de estos 11 cromatogramas se muestran en la Fig. 18B. La muestra que no genera señales a tiempos de elución específicos de O6 no fue O6, es decir muy probablemente un falso positivo de la prueba de aglutinación. Por lo tanto, el OPS O6 con una ramificación de Glc (Fig. 17B, parte superior) es la estructura más representativa entre los serotipos O6 aislados de la epidemiología descrita en el Ejemplo 1.

Para producir un bioconjugado que porta el polisacárido O6G1c, las cepas de *E. coli* W3110 se diseñaron genéticamente para expresar el OPS O6 reemplazando el grupo *rfb* W3110 con el grupo *rfb* de la cepa CCUG11309. Ver Tablas 7 y 13. Las cepas resultantes fueron W3110 $\Delta rfbO16::rfbCCUG11309 \Delta waaL$, que contiene el grupo *rfb* de una cepa de *E. coli* positiva a O6 con la ramificación de Glc reportada en la BRU (ver arriba). El OPS O6Glc que expresa la cepa huésped se construyó por recombinación homóloga. El grupo *rfb* se amplificó usando apareamiento de oligonucleótidos por PCR en el ADN que flanquea el grupo *rfb*. El ADN amplificado luego se utilizó para reemplazar el grupo de antígeno O endógeno de la cepa de laboratorio W3110 bien caracterizada por la recombinación homóloga descrita en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/EP2013/071328. Los plásmidos de expresión de las proteínas portadoras y de Pg1B se insertaron por transformación y expresión del OPS esperado y EPA se confirmó por manchado Western.

Ejemplo 5: O2 de *E. coli*

La estructura de unidad de repetición del polisacárido O2 se ha conocido desde 1987 (Jansson, et al., (1987) Carbohydrate research 161, 273-279). Se muestra en la Fig. 19B. Dos secuencias de grupo de genes de antígeno O O2 están disponibles de las bases de datos públicas (GenBank EU549863 y GU299792). Se ha realizado el análisis comparativo y se han sugerido las actividades de glicosiltransferasa (Tabla 5; Fratamico et al., 2010, Canadian Journal of microbiology 56, 308-316; y Li, et al., (2010) J Microbiol Methods 82, 71-

77).

Tabla 5. Las predicciones de genes de grupo de antígeno O O2 del grupo *rfb* como se publicó por Li, et al. y Fratamico, et al. se indican entre paréntesis.

Nombre del gen	Función putativa	Homología más significativa/proteína [organismo], acceso, identidad máx. (BLAST)
<i>rmlB</i>	dTDP-Glucosa 4,6-deshidratasa	dTDP-Glucosa 4,6-deshidratasa (<i>E. coli</i> IAI39), YP_002406996.1, 98%
<i>rmlD</i>	dTDP-6-Desoxi-D-glucosa 3,5-epimerasa	dTDP-6-Desoxi-L-manosadeshidrogenasa (<i>E. coli</i>)m ACA24825.1, 97%
<i>rmlA</i>	Glucosa1-fosfato timidililtransferasa	Glucosa-1-fosfato timidililtransferasa (<i>E. coli</i> IAI39), YP_002406998.1, 99%
<i>fdtA</i>	NDP-hexosa isomerasa	NDP-hexosa isomerasa (<i>Yersinia intermedia</i> ATCC 29909), ZP_04635116.1, 67%
<i>fdtC</i>	proteína tipo WxcM	Proteína hipotética PROVRETT_01740 (<i>Providencia rettgeri</i> DSM 1131), ZP_03638653.1, 71%
<i>fdtB</i>	Aminotransferasa	Proteína Wb1Q (<i>Photorhabdus luminescens</i> subespecie <i>laumondii</i> TTO1), NP_931971.1, 65%
<i>Wzx</i>	flipasa de antígeno O	Proteína de biosíntesis de polisacáridos (<i>Pectobacterium carotovorum</i> subespecie <i>carotovorum</i> PC1), YP_003016888.1, 50%
<i>wekP</i> (<i>wegQ</i>)	Glicosiltransferasa (GT)	Proteína hipotética FIC_01940 (<i>Flavobacteriaceae bacterium</i> 3519-10), YP_003096444.1, 29%
<i>rmlC</i>	dTDP-4-deshidro-ramnosa	RmlC (<i>E. coli</i>), ACA24796.1, 70%

	3,5-epimerasa	
Wzy	polimerasa de antígeno O	Proteína hipotética Gura_3055 (<i>Geobacter uraniireducens</i> Rf4), YP_001231799.1, 26%
wekQ (wegR)	Glicosiltransferasa	Glicosil transferasa, putativa, gt2D (<i>Cellvibrio japonicus</i> Ueda 107), ref. YP_001983904.1, 31%
wekR	Glicosiltransferasa	Glicosil transferasa, grupo 1 (<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400), YP_751504.1, 57%
wekS (wegW)	Sulfatasa	Proteína sulfatasa de transmembrana putativa (<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a), YP_001970541.1, 39%

La comparación de la estructura y homología de genes indicó que todas las funciones para la biosíntesis del polímero están presentes:

rmIBDAC codifican las enzimas requeridas para la biosíntesis de dTDP-L-Ramnosa, que es el sustrato para la adición de L-Rha al esqueleto por glicosiltransferasas *wekPOR*;

fdtABC proporcionan dTDP-D-Fuc3NAc para las glicosiltransferasas de ramificación;

los homólogos de *zwy* y *wzx* son responsables del volteo de la unidad de repetición unida a Und-PP desde el citoplasma al periplasma; y

wekPOR, son glicosiltransferasas predichas, y se predice que forman enlaces glicosídicos de la BRU de O2 (tres L-Rha y un L-FucNAc).

El gen *wekS* hallado en las secuencias de grupo *rfb* de O2 publicadas es una sulfatasa unida a la membrana predicha, y por lo tanto muy probablemente no está implicado en la formación de BRU. Esto significaría que - si se asume la regla de una enzima un enlace - una enzima entre el grupo de *wekPOR* debe ser bifuncional para proporcionar los cuatro enlaces glicosídicos.

Que la regla de una enzima – un enlace no es absoluta se mostró en múltiples ejemplos en los que se conocen menos glicosiltransferasas que enlaces, por ejemplo, en *Shigella flexneri* Y, *S. flexneri* 6, *C. jejuni*, y *E. coli* O1A. En estos ejemplos, las glicosiltransferasas multifuncionales son responsables de la formación de más de un enlace glicosídico, son ‘bi-’ o ‘multi-funcionales’. Siempre, es el mismo monosacárido que se añade varias veces. Los residuos de ramnosa

repetidos - como se hallan en el serotipo O2 - a menudo se asocian a tales enzimas multifuncionales.

Debido a la presencia de elementos de transposones truncados que flanquean la secuencia *wekS*, se ha especulado que el locus *wekS* se insertó en el grupo *rfb* por un evento de recombinación de ADN (ver Fratamico et al., 2010, Canadian journal of microbiology 56, 308-316). Una inserción mediada por transposón del locus *wekS* sugeriría que la biosíntesis de OPS O2 existía sin la presencia de *wekS* antes, y en consecuencia *wekS* no sería necesaria para la síntesis del polímero de OPS O2. Para confirmar esta hipótesis, la formación de OPS O2 se reconstituyó en un sistema de expresión recombinante un antecedente genómico “limpio”, que contiene un grupo *rfb* de O2 que carece del gen *wekS*. Para lograr esto, el grupo de antígeno O de la cepa W3110 se reemplazó por el grupo *rfb* de la cepa positiva a O2 upec116 que carece del ADN de *wekS*. El reemplazo cromosómico se realizó por recombinación homóloga como se describe en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/EP2013/071328. La cepa resultante fue W3110 Δ waaL Δ rfbW3110::*rfb*O2 Δ wekS. El OPS se preparó y analizó por marcado con 2AB y HPLC de fase normal y la detección de fluorescencia como se realizó para OPS O1A y O6 (ver más arriba) y se analizó por HPLC de fase normal (Fig. 21) y se comparó con las señales de la cepa tipo salvaje CCUG25. El análisis resultó en una serie de picos superpuestos entre el tiempo de elución de 40 y 140 minutos.

El análisis de MS de la serie de pico dependiente del grupo *rfb*O2 mostró masas principales con las mismas diferencias entre picos consecutivos (es decir, de una RU de O2 única).

Se realizó el análisis de MS de las moléculas recolectadas en los respectivos picos para analizar la estructura del OPS. Los picos obtenidos a 43.5, 73.1, 81.4 y 90' obtenidos de la cepa de tipo salvaje CCUG25 se recolectaron y analizaron por MS y MS/MS. Se hallaron las masas y series de iones de fragmento Y compatibles con las moléculas de OPS O2 de unidad de repetición 1, 2 y 3 esperadas (m/z = 989.4 (Fig. 23), 1817.8, 2646.1, todos aductos de Na^+).

Para confirmar el OPS O2 de aislados clínicos, se analizaron 12 clones para su estructura de OPS como se ha descrito anteriormente para el serotipo O1. En primer lugar, el LPS se preparó para ser analizado por tinción con plata y manchado Western. Los resultados se representan en la Fig. 20. Todas las muestras mostraron un patrón de bandas tipo escalera con dos diferentes longitudes de escalera medias aparentes. El antisuero anti-O2 detectó todas las muestras de LPS, lo que indica que la aglutinación identificó correctamente todos

los aislados como serotipos O2.

Para producir un bioconjugado que porta el polisacárido O2, se utilizó W3110 $\Delta waaL \Delta rfb$ W3110::*rfb*O2 $\Delta wekS$. Los plásmidos de expresión de las proteínas portadoras y de PglB se insertaron por transformación y la expresión del OPS esperado en EPA se confirmó por análisis Western. Ver las Tablas 7 y 13 y anteriores.

Ejemplo 6: Análisis inmunológico de los diferentes antígenos O

Para evaluar el potencial inmunológico de los bioconjugados que contienen los polisacáridos antigénicos seleccionados, se realizó un estudio preclínico. Los bioconjugados O1A-EPA, O2-EPA, O6Glc-EPA y O25B-EPA se produjeron, se purificaron, y se caracterizaron como se ha descrito anteriormente y en la sección de métodos.

Tabla 6. Descripción general del estudio preclínico de rata, incluyendo los números de grupos de vacuna, tamaño del grupo, vacunas usadas, e indicación de la calidad de la preparación de la vacuna.

Grupo	Ruta de inyección	Número de animales	Tratamiento [0.2 µg de PS]	Pureza / %	Relación S/P / %	Cepa de producción (Cepa/plásmido /Plásmido)
1	i.m.	8	O1-EPA ^{tetra-grupo} [0.2 µg de PS]	97	22	upec032 $\Delta waaL::kanR$ / pGVXN939/ pGVXN659
4	i.m.	8	O2-EPA ^{tetra-grupo} [0.2 µg de PS]	90	34	W3110 $\Delta rfb::rfb(upec116)$ ($\Delta wekS$) $\Delta waaL::clmR$ /pGVXN939/ pGVXN659
7	i.m.	8	O6-EPA ^{tetra-grupo} [0.2 µg de PS]	84	38	W3110 $\Delta wzze-wecG$ $\Delta waaL \Delta wbbIJK$ $\Delta gtrS$ $\Delta wzxO16$ /pGVXN 348/

Grupo	Ruta de inyección	Número de animales	Tratamiento [0.2 µg de PS]	Pureza / %	Relación S/P / %	Cepa de producción (Cepa/plásmido /Plásmido)
						pGVXN114/ pgVXN659
9	i.m.	8	O25B-EPA ^{tetra-grupo} [0.2 µg de PS]	85	21	upec163 ΔwaaL pGVXN112 /pgVXN659
10	i.m.	8	EPA ^{tetra}			W3110 ΔwaaL/pGVXN659
11	i.m.	8	TBS			
12	i.m.	8	O1+O2+O25B+ 06-EPA ^{tetra} [0.2 µg de PS/cada uno]	89*	29*	Mezcla de los lotes anteriores

* valores calculados

Se usaron bioconjugados purificados para inmunizar ratas Sprague Dawley hembra de 9 semanas de edad. Soluciones de 100 µl de la misma dosis se inyectaron por vía intramuscular (i.m.) en los días 1, 22 y 43 en las ratas que se desangraron terminalmente y se sacrificaron en el día 56.

Los diferentes grupos de ratas recibieron diferentes vacunas: siempre no formulada, que comprende bioconjugados solo o en combinación como se indica en la Tabla 6. Las placas de ELISA revestidas con el LPS afín producido en una cepa positiva a *waaL* se usaron para medir la inmunogenicidad en la forma de título de ELISA de los sueros de rata en el punto de tiempo de sangrado terminal de 56 días después de la primera inyección (Figs. 25-28). Tomadas en conjunto, se observó inmunogenicidad estadísticamente significativa para todos los grupos de vacunación medidos contra los controles (amortiguador de TBS o EPA no glicosilada). Por lo tanto, los bioconjugados seleccionados y producidos representan compuestos candidatos de vacunas útiles.

Para todos los conjugados O-antígeno-EPA analizados, se observó inmunogenicidad estadísticamente significativa para todos los grupos de vacunación medidos contra los controles (amortiguador de TBS o EPA no glicosilado). Por lo tanto, los bioconjugados seleccionados y producidos representan compuestos candidatos de vacuna útiles para la inducción de

anticuerpos específicos de antígeno O.

Ejemplo 7: Caracterización físico-química de los bioconjugados

Los cuatro bioconjugados descritos en los ejemplos anteriores (antígeno O de O25B, O1A, O2 y O6, respectivamente conjugado a la EPA como una proteína portadora) se prepararon como lotes monovalentes (ingredientes farmacéuticos activos, API) o se combinaron en una preparación única como una vacuna multivalente contra ExPEC. Se produjeron varios lotes: lotes preclínicos, lotes de estudio de toxicidad, y lotes clínicos. La Tabla 7 indica las cepas huésped usadas para la producción de conjugados.

Tabla 7: Cepas huésped para la producción de lotes preclínicos, de estudio de toxicología y clínicos

Producto	Cepa	Plásmido de expresión de EPA	Plásmido de expresión de PglB
EPA-O1A	W3110 $\Delta rfb::rfb(upec032) \Delta waaL$	pGVXN1076	pGVXN970
EPA-O2	W3110 $\Delta rfb::rfb(upec116) \Delta waaL$	pGVXN1076	pGVXN971
EPA-O6Glc	W3110 $\Delta rfb::rfb(CCUG11309) \Delta waaL$	pGVXN659	pGVXN114
EPA-O25B	W3110 $\Delta rfb::rfb(upec138) \Delta waaL \Delta gtrABS$	pGVXN1076	pGVXN970

Los cuatro lotes de pre-GMP monovalentes y un estándar de referencia de EPA no glicosilada, por lo tanto, se analizaron por cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz de multi-ángulo (SEC-MALS), para cuantificar el grado de mono- y di-glicosilación de los bioconjugados individuales, y determinar la masa molecular (MW) del portador de proteína y el O-PS unido a este. Las muestras se separaron en una columna de gel TSK G3000 SWx1 en amortiguador de fosfato (pH 7.0; NaCl 50 mM, fosfato de sodio 150 mM) y se monitorearon por UV (214 y 280 nm), índice de refracción (RI) y dispersión de luz de multi-ángulo (MALS).

Para la proteína portadora EPA no glicosilada, se determinó un MW de 63-67 kDa (MW teórico de 70.5 kDa, con base en la secuencia de aminoácidos). En los bioconjugados, sólo se detectó la EPA a 280 nm, lo que permite que su MW sea extraído del MW total medido por RI y MALS: en los bioconjugados, el MW medido de la porción de EPA fue 65-71 kDa.

El análisis de los estándares de producto de API de pre-GMP se muestra en la Tabla 8, indicando la presencia de conjugados mono- y di-

glicosilados, con un MW en el intervalo de 75-79 kDa y 87-91 kDa, respectivamente. Las partes de O-PS presentaron un MW de 16-24 kDa para las especies di-glicosiladas, y 8-14 kDa para las especies mono-glicosiladas, respectivamente. Teniendo en cuenta el MW de la RU de cada serotipo, se determinó un número promedio de 10-16 RU por cadena de polisacárido, en buena concordancia con los datos de hidrazinólisis y MS.

Tabla 8: Análisis SEC-MALS de los estándares de producto de API de pre-GMP monovalentes

Lote monovalente	Pico 1			Pico 2		
		MW total	MW de O-PS		MW total	MW de O-PS
EPA-O1A	15%	87 kDa	16 kDa	83%	75 kDa	8 kDa
EPA-O2	29%	88 kDa	19 kDa	70%	76 kDa	10 kDa
EPA-O6	47%	88 kDa	21 kDa	50%	78 kDa	12 kDa
EPA-O25B	56%	91 kDa	24 kDa	42%	79 kDa	14 kDa

Pico 1: forma di-glicosilada.

Pico 2: forma mono-glicosilada.

El análisis de dicroísmo circular (CD) de un lote de bioconjugado de O25B formulado en solución salina amortiguada con Tris (TBS), mostró que las formulaciones de pH 6.8 a 7.4 tenían espectros similares a los de la proteína portadora de EPA no glicosilada, con una mezcla de estructuras alfa helicoidales y hoja beta, como se esperaba con base en la estructura cristalina publicada de la EPA. Por lo tanto, con base en estos análisis de CD, la glicosilación con cadenas de O-PS O25B no parecía afectar la estructura secundaria de la proteína portadora EPA.

El análisis de calorimetría de barrido diferencial (DSC) de una formulación de lote de bioconjugado de O25B en TBS de pH 6.8 a 7.4, y en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) de pH 7.1 a 7.8, mostró curvas de fusión comparable con las de una EPA no glicosilada, con un punto de fusión de aproximadamente 52°C. Este resultado indicó que la característica biofísica de la proteína portadora EPA no cambió tras la modificación con cadenas de O-PS O25B.

Ejemplo 8: Estabilidad de volúmenes monovalentes y preparaciones de vacuna tetravalente

Antes de la producción a gran escala, la consistencia del proceso de manufactura se evaluó en una escala pequeña. Los lotes de consistencia se evaluaron en estudios de estabilidad extensos que incluían condiciones almacenamiento aceleradas y en estrés para identificar las vías de degradación. La estabilidad de los cuatro componentes de vacunas monovalentes (API) se analizó durante un período de 3 meses.

El análisis de los datos de estabilidad de API pre-clínicos indicó la estabilidad durante al menos 3 meses cuando se almacenaron a $-75 \pm 15^{\circ}\text{C}$ (condiciones de almacenamiento normales). Se observaron tendencias no estadísticamente significativas en la condición de almacenamiento propuesta por análisis de regresión lineal estadística. También en la condición de almacenamiento acelerada ($+5 \pm 3^{\circ}\text{C}$) y en estrés ($+25 \pm 5^{\circ}\text{C}$) el producto estuvo estable durante al menos 3 meses, como se evidencia por la baja variabilidad de los parámetros indicadores de estabilidad. Los datos del API preclínica de O1A se muestran en la Tabla 9. Los otros tres serotipos (O2, O6, O25B) demostraron datos de estabilidad similares.

Tabla 9: Datos de estabilidad del lote de API preclínico de O1A

	S/P t0	S/P 3 m.	Pureza t0	Pureza 3 m.
-75 ± 15°C	19.3	19.8	98.1%	97.6%
+5 ± 3°C		20.9		98.6%
+25 ± 5°C		21.3		98.3%

S/P: relación de azúcar a proteína como se determina por ensayos de antrona y BCA, respectivamente.

Pureza: como se determina por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC).

La estabilidad de la composición de la vacuna tetravalente (bioconjugados O25B, O1A, O2 y O6) se analizó durante un período de 3 meses. Los estudios incluyeron condiciones de almacenamiento aceleradas y en estrés para identificar las vías de degradación. Los datos resultantes se consideran relevantes para la justificación inicial de la vida en anaquel de IMP GMP (medicamento en investigación, la composición de la vacuna ExPEC tetravalente).

El análisis de los datos de estabilidad del lote preclínico de la vacuna ExPEC tetravalente indicó estabilidad durante al menos 3 meses cuando se

almacenó a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (condiciones de almacenamiento normales), como se muestra en la Tabla 10. Se observaron tendencias no estadísticamente significativas en la condición de almacenamiento propuesta por análisis de regresión lineal estadística. También en la condición de almacenamiento acelerado ($+25 \pm 5^{\circ}\text{C}$) el producto estuvo estable, como se evidencia por la baja variabilidad de los parámetros indicadores de estabilidad.

Tabla 10: Datos de estabilidad de lotes preclínicos de la vacuna tetravalente

	MW t0	MW 3 m.	Pureza t0	Pureza 3 m.
5 ± 3°C	302 y 192 kDa	294 y 188 kDa	98.3%	98.7%
25 ± 5°C		297 y 191 kDa		98.2%

MW (distribución de tamaño molecular): dos picos de producto principales (es decir, especies mono- y di- glicosiladas), como se determina por cromatografía líquida de alta resolución por exclusión de tamaño (SE-HPLC).

Pureza: como se determina por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC).

En conjunto, estos estudios demuestran que los API y la composición de vacuna de ExPEC tetravalente estuvieron estables durante al menos tres meses, y por lo tanto son composiciones de vacuna adecuadas con respecto a la estabilidad.

Ejemplo 9: Estudio de toxicidad en la preparación de la vacuna tetravalente

Se evaluó la toxicidad y tolerancia local de una preparación de vacuna tetravalente (bioconjugados O25B, O1A, O2 y O6) después de dos administraciones intramusculares (se utilizó el cuádriceps femoral para el tratamiento) en ratas Sprague Dawley en los días 1 y 14. La reversibilidad, persistencia o aparición tardía de cualquier cambio se evaluó después de un período de recuperación de 14 días en el día 28. La necropsia de los animales en los grupos principales (10 machos y 10 hembras, tanto para el grupo vacunado como de control) se produjo en el día 17, y para los grupos de recuperación (5 machos y 5 hembras, tanto para el grupo vacunado como de control) en el día 28 (después de un período de recuperación de 14 días). Esto no se asoció con algún

efecto considerado adverso como que podría atribuirse al tratamiento. La dosis administrada, es decir, una dosis humana completa equivalente de 4 µg por antígeno O (16 µg de antígeno O total para la vacuna tetravalente), como se administra en los días 1 y 14, se consideró como el nivel de efecto adverso no observado (NOAEL) para la vacuna de ExPEC tetravalente bajo las condiciones de este estudio. Además, la inmunogenicidad de la vacuna de ExPEC tetravalente se confirmó tanto en el día 17 como día 28, después de la evaluación de las muestras de suero. Los títulos mayores de anticuerpos de IgG anti-O1A, anti-O2, anti-O6 y anti-O25B IgG se indujeron en el grupo vacunado, en comparación con los controles que recibieron solamente amortiguador de formulación (Tris 25 mM, NaCl 130 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4).

Estos datos confirman que la vacuna de ExPEC tetravalente tiene un perfil de toxicidad adecuado para la administración como una vacuna, e induce anticuerpos para al menos todos los cuatro serotipos de *E. coli* de los antígenos O presentes en la vacuna (es decir, O25B, O1A, O2 y O6).

Ejemplo 10: Epidemiología de los serotipos O asociada con la bacteriemia

Para determinar la distribución de serotipo O entre *E. coli* extraintestinal que causa bacteriemia en los ancianos, se realizó un estudio epidemiológico en un panel de aislados de sangre de *E. coli* recolectados de pacientes mayores de 60 años de edad. En total, 860 aislados de sangre desde el período 2011-2013 se recolectaron de sujetos en los Estados Unidos, Reino Unido, Alemania, España y los Países Bajos, y se analizaron por O-aglutinación clásica. Como se muestra en la tabla 11, la distribución de serotipo O de los aislados de bacteriemia se pareció a la distribución de serotipo O hallada en pacientes que sufren de infección del tracto urinario (UTI, ver la Tabla 1A). El serotipo O25 fue más prevalente en la población de bacteriemia estudiada; la subtipificación de cincuenta y siete aislados por PCR mostró que los cincuenta y seis (98%) de los serotipos O25 fueron tipificables como O25B. En ambas poblaciones objetivo (UTI y bacteriemia), los serotipos O1, O2, O6, y O25 se identificaron como los cuatro serotipos más prevalentes. En general, estos datos confirman que la distribución de serotipos tanto entre los aislados de infección del tracto urinario como bacteriemia es muy similar e independiente de la ubicación geográfica, tiempo de aislamiento, e indicación.

Tabla 11: Distribución de los serotipos O de *E. coli* asociados con bacteriemia más comunes de una colección de 860 aislados de sangre en los Estados Unidos y UE en el periodo 2011-2013. Se indica la distribución de

serotipo O relativa de las muestras.

5

10

15

Serotipo O	Bacteremia en ≥ 60 años de edad EUA/UE en 2011-2013 (n = 860)
25	19.2
2	8.8
6	8.3
1	7.8
75	3.3
4	2.8
16	2.7
18	2.7
15	2.3
8	2.0
153	1.6
73	1.6

Ejemplo 11: Inducción de respuestas de anticuerpos funcionales

20

25

La funcionalidad de los anticuerpos producidos después de la vacunación con las formulaciones de vacuna monovalente y tetravalente descritas anteriormente se investigó con un ensayo de aniquilación opsonofagocítico in vitro (OPK). Este tipo de ensayo se ha aceptado como una correlación de protección de la vacuna conjugada contra *Streptococcus pneumoniae* (Prevenar®). El ensayo OPK mide la capacidad del suero para facilitar la opsonofagocitosis y aniquilación de diferentes serotipos de *E. coli*. En placas de 96 pocillos, se incubaron diluciones definidas de los sueros de muestra, en cada pocillo, con: bacterias de uno de los cuatro serotipos de *E. coli* específicos de la vacuna, una cantidad definida de células HL60, y complemento de conejo bebé. Después de la incubación, una proporción de la mezcla se manchó en agar de soya tríptico (TSA) y se contó el número de colonias bacterianas. La capacidad de los anticuerpos para unirse a las células bacterianas y activar la deposición del complemento y mediar la absorción y aniquilación de las bacterias por las células HL60 se expresó como título opsónico. El título opsónico o índice de opsonización (OI) corresponde a la dilución de los sueros que aniquilan 50% de las células bacterianas. Se proporcionan los índices opsónicos de pre y post-sueros inmunes.

Un aumento > de 4 veces de OI de pre- a post-inmune se considera significativo. Se establecieron ensayos de OPK de tres serotipos O2, O6Glc y O25B.

Funcionalidad de respuestas de anticuerpos inducidas por vacunas monovalentes

5 Para evaluar la actividad funcional de respuestas de anticuerpos inducidas por la vacuna de bioconjugados O25B, O1A, O2 y O6Glc, los sueros de ratas vacunadas se analizaron usando ensayos de aniquilación de opsonofagocítica (OPK), que miden la fagocitosis dependiente de anticuerpo y complemento in vitro y aniquilación de bacterias, por ejemplo, *E. coli*. *E. coli* se pre-opsonizó con diluciones de suero de ratas vacunadas, se incubaron con
10 complemento y fagocitos (células HL60 diferenciadas), y se determinaron las unidades formadoras de colonias (CFU). Posteriormente, se calcularon el % de aniquilación máxima e índices de opsonización (OI: aniquilación en dilución de suero de 50% de *E. coli*). El *E. coli* seleccionado para las pruebas de OPK fueron OC 24453 (serotipo O2), OC 24781 (serotipo O6Glc) y OC 24176 (serotipo O25B). Como se muestra en la Figura 29, se observó una respuesta inmune funcional
15 sólida a O2-EPA (Fig. 29A), O6Glc-EPA (Fig. 29B) y O25B-EPA (Fig. 29C).

Los datos demuestran que los componentes de la vacuna descritos en la presente inducen respuestas de anticuerpo contra serotipos de *E. coli* de los que los antígenos O se incluyen en la vacuna, y que tales respuestas de anticuerpo son funcionales en la aniquilación de *E. coli* de estos serotipos.

20 **Funcionalidad de respuestas de anticuerpo inducidas por una vacuna tetravalente**

La Tabla 12 muestra los títulos de OI totales de los antígenos O O2, O6Glc y O25B de los animales inmunizados con la vacuna tetravalente ya sea con 0.4 o 4 g por antígeno O. Los títulos se determinaron en dos experimentos separados. La dosis de 0.4 mg indujo IO significativos en todos los animales para los serotipos O2 y O6Glc. Para O25B, 3/8 animales mostraron un aumento
25 significativo en el OI después de la inmunización con la dosis de 0.4 µg. En comparación con la dosis de 0.4 µg, la dosis de 4 µg indujo aumentos menores de OI para O2 en todos los animales. 3/8 animales mostraron aumentos de OI cuando los sueros del grupo de dosis de 4 µg se analizaron en *E. coli* O25B. Los datos confirman que una vacuna tetravalente es capaz de provocar anticuerpos opsónicos específicos de antígeno O contra O2, O6Glc y O25B.

Los datos demuestran que los componentes de la vacuna descritos en la presente inducen respuestas de anticuerpo contra los serotipos de *E. coli* de

los que los antígenos O se incluyen en la vacuna, y que tales respuestas de anticuerpo son funcionales en la aniquilación de *E. coli* de estos serotipos.

Tabla 12: IO contra *E. coli* O2, O6 y O25. Los IO de sueros de pre-vacunación individuales y posterior a 3 vacunaciones de dos experimentos separados se muestran para todos los animales.

5

Índices de Opsonización (OI) de Suero de Rata											
O2 <i>E. coli</i>				O6 <i>E. coli</i>				O25 <i>E. coli</i>			
0.4 ug Dose		4 ug Dose		0.4 ug Dose		4 ug Dose		0.4 ug Dose		4 ug Dose	
Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
Pre-vac.	6	7	5	0	17	6	18	2'404	2'082	0	0
Post-vac.	>16384	1'476	293	32	202	226	2'045	2'821	1'578	9	0
Pre-vac.	21	11	11	20	11	90	0	0	0	0	0
Post-vac.	11'148	>16384	150	120	436	475	10'262	11'460	0	4	0
Pre-vac.	6	6	0	0	0	5	0	0	0	0	0
Post-vac.	11'073	>16384	46	19	98	37	7'959	8'597	6	355	197
Pre-vac.	5	5	5	6	23	17	0	0	0	0	0
Post-vac.	>16384	63	57	45	108	116	2'189	4'488	0	70	26
Pre-vac.	7	0	0	4	30	8	8	7	0	0	0
Post-vac.	10'413	7'050	105	108	>16,384	12'672	3'107	7'564	0	105	69
Pre-vac.	8	0	8	7	299	164	5	0	269	154	0
Post-vac.	89	34	24	17	1'725	1'475	540	896	0	0	0
Pre-vac.	9	9	6	6	18	21	22	5	0	0	0
Post-vac.	>16384	>16384	109	92	1'249	1'863	160	143	1'130	630	9
Pre-vac.	4	6	6	5	26	22	0	0	0	0	0
Post-vac.	5'058	4'201	39	25	6'590	3'826	288	656	3'336	1'986	0
Pre-vac.	8	5	5	6	53	42	5	3	334	280	0
Post-vacc Av	10'867	7'747	103	57	3'349	2'586	3'319	4'578	790	524	69

10

Se calcularon el % de aniquilación máximo e índices de opsonización (OI: aniquilación de dilución en suero de 50% de *E. coli*). Los *E. coli* seleccionados para las pruebas de OPK fueron OC 24453 (serotipo O2), OC 24781 (serotipo O6Glc) y OC 24176 (serotipo O25B). Se observó una respuesta inmune funcional sólida para O2-EPA, O6Glc-EPA y O25B-EPA.

15

Ejemplo 12: Evaluación de una vacuna candidata contra *Escherichia coli* Uropatogénico en mujeres con un historial clínico de infección del tracto urinario recurrente (RUTI)

Se utilizó una vacuna de bioconjugado de *E. coli* en un estudio clínico de fase I. La vacuna comprende cuatro bioconjugados en una solución amortiguadora de solución salina. Los cuatro bioconjugados son: (i) O1A de *E. coli* conjugado a proteína portadora EPA, (ii) O2 de *E. coli* conjugado a proteína portadora EPA, (iii) O6Glc de *E. coli* conjugado a proteína portadora EPA, y (iv) O25B de *E. coli* conjugado a proteína portadora EPA.

20

La población del estudio incluye 194 mujeres sanas, de edades ≥ 18 a 70 años de edad, con un historial de infección del tracto urinario recurrente (RUTI), definida como ≥ 3 episodios independientes en los 12 meses anteriores o ≥ 2 episodios en los últimos 6 meses. Al menos uno de los episodios de infección del tracto urinario (UTI) fue causado por *E. coli* (como único patógeno o parte de la infección polimicrobiana) y la causa se confirmó por cultivo y se documentó. Para los propósitos del estudio, la UTI se definió por la presencia de al menos un síntoma de UTI especificado (disuria, urgencia, frecuencia, dolor en el costado, sensibilidad de la vejiga, dolor suprapúbico, fiebre, náuseas, vómitos), junto con un

25

recuento de bacterias (CFU) de $\geq 10^3$ CFU/ml de uropatógeno en la orina de chorro medio.

El estudio incluye dos grupos: (i) vacuna candidata y (ii) placebo. El estudio es un estudio multicéntrico controlado con placebo, de ciego único, aleatorizado, escalonado en mujeres sanas con historial de RUTI.

5 El período de inscripción estimado para el estudio es de 4 meses, con un período de duración de seguimiento de nueve meses para cada sujeto.

El objetivo del estudio es evaluar la seguridad, inmunogenicidad y eficacia de la vacuna de bioconjugado de coli E.

Diseño del estudio

10 Los sujetos son seguidos durante 9 meses después de la inyección, y sólo los sujetos inyectados se siguieron a lo largo del período del estudio. Los sujetos asisten a un total de 5 visitas programadas: selección (primera visita), día 1 (segunda visita), día 7, día 30, y día 270. Los sujetos reciben 4 llamadas telefónicas de seguimiento, en el día 2, día 90, día 150 y en el día 210.

15 Cualquiera de las visitas no programadas debido a la aparición de UTI incluye estándar de cuidado con las opciones de tratamiento armonizadas. La orina y sangre (si es posible) se recolectan para fines de diagnóstico y serotipificación. Los eventos adversos (EA) no solicitados y eventos adversos graves (SAE) se registran a lo largo de la duración del estudio, mientras que los AE solicitados se registran durante 7 días después de la inyección.

En cada visita al sujeto se le da una nueva tarjeta de diario y la anterior se discute.

Dosificación y Administración

20 En la primera visita, los sujetos elegibles que han proporcionado consentimiento informado se seleccionan y el cumplimiento de los criterios de inclusión/exclusión se confirman. Se extrae sangre y se recolecta orina.

25 En la visita 2 (día 1), cada sujeto recibirá una inyección intramuscular de 0.5 ml de solución (vacuna candidata o placebo) en el músculo deltoides. La reducción de la dosis de la vacuna candidata contendrá 1 µg de cada polisacárido (4 µg de polisacárido total). La dosis objetivo de la vacuna candidata contendrá 4 µg de cada polisacárido (16 µg de polisacárido total).

Objetivos

El objetivo principal es evaluar la ocurrencia, intensidad, relación, y duración de los eventos adversos (EA) solicitados y no solicitados y los eventos adversos graves (SAE) post-inyección de la vacuna candidata en comparación con el grupo de placebo durante todo el período de estudio.

Los objetivos secundarios son (i) comparar el cambio en los criterios de valoración de seguridad hematológica y bioquímica antes de la inyección (en la selección inicial y día 1) y post-inyección (en el día 7 y día 30) de la vacuna candidata en comparación con el grupo de placebo; (ii) evaluar la respuesta inmune de la vacuna candidata entre el valor basal (día 1) y post-inyección (día 30 y día 270); (iii) comparar el número de episodios de infección sintomática del tracto urinario (UTI) causados por los serotipos de vacuna de *E. coli* entre los dos grupos, inyectados con la vacuna candidata o placebo durante el período de estudio completo como el criterio de valoración de eficacia relevante; (iv) evaluar la tasa de ocurrencia de UTI por *E. coli* específica de serotipo de vacuna en el grupo de vacuna en comparación con el grupo de placebo a lo largo de la duración del estudio; y (v) evaluar la intensidad y duración de los síntomas clínicos de la UTI por *E. coli* específica de serotipo de vacuna en el grupo de vacuna en comparación con el grupo de placebo a lo largo de la duración del estudio.

Los objetivos de exploración son (i) comparar la tasa de ocurrencia de UTI causada por cualquier serotipo de *E. coli* en el grupo de vacuna en comparación con el grupo de placebo durante todo el periodo de estudio; y (ii) comparar la tasa de ocurrencia de UTI causada por cualquier patógeno en el grupo de vacuna en comparación con el grupo de placebo durante todo el período de estudio.

Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión para el estudio son los siguientes: (i) sujetos de sexo femenino con un historial de UTI recurrente, que se define como: ≥ 3 episodios independientes de UTI en los 12 meses anteriores o ≥ 2 episodios de UTI en los últimos 6 meses; al menos una UTI durante los últimos 5 años fue causada por *E. coli* (como único patógeno o parte de infección polimicrobiana) y fue confirmada por cultivo y documentada; (ii) edad ≥ 18 y ≤ 70 años; (iii) sujetos en un estado saludable sin UTI sintomática en curso o que se sospecha en la visita de selección y en el día de la inyección (visita 2); (iv) buena salud en general, sin historial médica clínicamente significativa, hallazgos del examen físico o anomalías de laboratorio clínico por el juicio clínico del investigador; y (v) disposición a participar en el estudio después de que todos los aspectos del protocolo se han explicado y entendido por completo, y forma de consentimiento informado por escrito obtenida.

Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión para el estudio son los siguientes: (i) historial de más de 10 UTI recurrentes en el año anterior a la visita de selección;

(ii) uso de cualquier catéter urinario a corto plazo dentro de los 7 días anteriores a la selección; (iii) uso de cualquier catéter permanente dentro de los 30 días anteriores a la selección; (iv) historial de cualesquiera enfermedades/anomalías del tracto urinario sin resolver; (v) evidencia de deterioro de la función inmune; (vi) enfermedades y/o insuficiencias cardiovasculares, hepáticas, renales significativas; (vii) diabetes mellitus no controlada; (viii) anomalías significativas en los resultados de selección para hematología, química del suero o análisis de orina; (ix) prueba positiva para VIH, y/o evidencia de VHB o VHC; (X) BMI > 34; (xi) terapia de estimulación inmunológica previa para la prevención de UTI (tal como Urovaxom®, Strovac® o Urovac®) en los últimos 3 meses, o uso planeado durante el período del estudio; (xii) uso actual de cualquier medicamento que se sabe que afecta la función inmune (por ejemplo, corticosteroides ≥ 0.5 mg/kg de BW/día); (xiii) uso del tratamiento con estrógenos vaginales relacionados con UTI recién iniciado menos de 6 meses antes de la inyección y continúa durante el estudio o inicio planeado durante el período de estudio activo; (xiv) uso de cualquier terapia con antibióticos dentro de 1 semana de la inyección anterior; (xv) uso planeado de antibióticos post-coital para la prevención de UTI durante el periodo de estudio; (xvi) cualquier vacunación planeada dentro de 30 días antes y 30 días después de la inyección; (xvii) participación en otros ensayos clínicos en los 60 días anteriores a la inscripción y durante la duración del estudio; (xviii) tratamiento previo con inmunoglobulinas o hemoderivados en los 3 meses anteriores a la inyección; (xix) hipersensibilidad conocida a cualquier componente de la vacuna; (xx) presencia de una afección médica o psiquiátrica significativa que en la opinión del investigador impide la participación en el estudio; (xxi) enfermedad aguda en el momento de la inyección; (xxii) mujeres en edad fértil que tienen ya sea una prueba de embarazo positiva o se niegan a usar un método anticonceptivo eficaz; (xxiii) mujeres que están amamantando en cualquier momento durante el período del estudio; (xxiv) sujetos con una intervención quirúrgica electiva, planeada durante el período del estudio; y (xxv) cualquier otro hallazgo significativo que, en la opinión del investigador, aumentaría el riesgo de tener un resultado adverso de la participación en el estudio.

Métodos Estadísticos y Análisis

La estadística descriptiva (n, media, desviación estándar, mediana y rangos de variables continuas, frecuencias y porcentajes de las variables categóricas) se proporciona por grupo de tratamiento y/o visita, donde sea aplicable. Todos los datos se listan por sujeto, grupo de tratamiento y, donde sea aplicable, visita. Todos los sujetos del Grupo B que recibieron placebo se

combinaron para formar el grupo de tratamiento con placebo.

Ejemplo 13: Resultados del estudio clínico de Fase I

5 Este ejemplo presenta ciertos resultados del análisis intermedio del estudio clínico de fase I descrito en el Ejemplo 12.

12.1: Seguridad

Las apariciones de eventos adversos y eventos adversos severos fueron comparables entre los grupos de placebo y vacunados. Se reportaron diez eventos adversos, y ninguno fue relacionado con el fármaco de estudio

12.2: Inmunogenicidad

10 Para evaluar la inmunogenicidad de los componentes de la vacuna, se obtuvieron sueros de mujeres que participan en el estudio clínico y se analizaron por ELISA para cuantificar el IgG contra los cuatro antígenos-O diferentes incluidos en la vacuna tetravalente (O1 de *E. coli*, O2 de *E. coli*, O6 de *E. coli*, y O25B de *E. coli*).

15 Los sueros de mujeres vacunadas fueron incubados en placas recubiertas con O1A, O2, O6Glc y O25B-LPS y EPA. Subsecuentemente, las placas fueron incubadas con anticuerpo secundario etiquetado con HRP (IgG anti-humano). Los anticuerpos unidos se detectaron con sustrato TMB y se midió la absorbancia. Los valores EC₅₀ se calcularon por ajuste de 4PL.

20 Como se muestra en la Figura 30, una respuesta inmune fuerte a O1A-EPA, O2-EPA, O6Glc-EPA y O25B-EPA ocurre en la mayoría de las mujeres vacunadas.

Estos datos demuestran la inmunogenicidad de cada componente de la vacuna tetravalente.

12.3: Respuesta de Anticuerpo Funcional

25 Los ensayos de OPK, los cuales miden la fagocitosis dependiente del anticuerpo y complemento *in vitro*, y eliminación de la bacteria de *E. coli*, se usaron para evaluar la respuesta del anticuerpo funcional de mujeres que participan en el estudio clínico.

Se recolectó suero a partir de participantes del estudio. La *E. coli* se pre-opsonizó con diluciones de suero de la mujer vacunada, se incubó con complemento y fagocitos células HL60 diferenciadas), y se determinaron las unidades que forman colonias restantes (CFUs). Subsecuentemente, se calcularon los porcentajes máximo de eliminación y los índices de opsonización (OI: eliminación de dilución en suero de 50% de *E. coli*). Los *E. coli* seleccionados

para pruebas de OPK fueron OC 24452 (serotipo O1A), OC 24453 (serotipo O2), OC 24454 (serotipo O6Glc), y OC 24176 (serotipo O25B).

Como se muestra en la Figura 31, se observó una respuesta inmune funcional fuerte a O1A-EPA (Fig. 31A), O2-EPA (Fig. 31B), O6Glc-EPA (Fig. 31C), y O25B-EPA (Fig. 31D).

5 Estos datos demuestran que cada componente de la vacuna tetravalente induce una respuesta de anticuerpo específica del serotipo, y que tales respuestas de anticuerpo son funcionales en la eliminación de *E. coli* a partir de estos serotipos. De este modo, las composiciones de vacuna descritas en la presente, son funcionales en humanos.

10

12.4: La Inmunización con un Conjugado de Antígeno-O Tetravalente que Comprende Q25B-EPA Estimula Anticuerpos IgG de Reactividad Cruzada de O25A/O25B

15 Para determinar el nivel de la reactividad cruzada de los anticuerpos IgG del suero inducida por vacuna hacia los dos serosubtipos O2 de *E. coli* conocidos, O25A y O25B, diluciones seriales de suero derivado de sujetos vacunados se incubaron con O25A LPS, O25B LPS purificado, o células bacterianas intactas, y se probaron por ELISA.

20 Como se muestra en la Figura 32, valores EC₅₀ similares se observaron cuando se probó la reactividad hacia LPS de O25A (barras negras) y LPS de O25B (barras grises) treinta días posteriores a la vacunación. En total, los datos sugieren que el bioconjugado de O25B funciona bien para O25B y para O25A, pero en la mayoría de los casos/sujetos tratados con O25B se desempeñan ligeramente mejor en términos de respuesta de anticuerpo para O25B comparado con O25A. Este resultado demuestra que, con la aparición de alguna variación natural, la vacuna tetravalente induce anticuerpos que reconocen a LPS tanto O25A como O25B LPS. Para probar si lo mismo fue cierto para células bacterianas completas y cepas múltiples de O25A/O25B, la reactividad hacia una serie de aislados clínicos de O25A u O25B derivados de ya sea sangre u orina, también se probó. En este caso, una cepa de serotipo O75, un serotipo no representado en la vacuna tetravalente, se usó como un control negativo (línea gris punteada en la Figura 33). Como se demuestra en la Figura 33, los anticuerpos de IgG de suero inducidos con vacuna, mostraron una fuerte respuesta hacia cada una de las cepas O25 individuales. Aunque la variación de cepa-a-cepa fue aparente, se observó la reactividad hacia las cepas O25A (líneas

25

negras) y O25B (líneas grises). Estos datos demuestran que el componente de la vacuna O25B de la vacuna tetravalente estimula anticuerpos que reconocen cepas tanto O25A como O25B purificadas de LPS y O24A de *E. coli* y O25B.

Las Tablas 13 y 14 abajo, proporcionan detalles de ciertas cepas y plásmidos, respectivamente, usados en los ejemplos anteriores.

5

Tabla 13: Cepas

Nombre	Genotipo	Descripción
upec032	wt	O1A aislado clínico de estudio de epidemiología GVXN
upec436	wt	O25A aislado clínico de estudio de epidemiología GVXN
upec138	wt	O25B aislado clínico de

10

15

20

25

5

10

15

20

25

Nombre	Genotipo	Descripción
		estudio de epidemiología GVXN
upec116	wt	O2 aislado clínico de estudio de epidemiología GVXN
upec163	wt	O25B aislado clínico de estudio de epidemiología GVXN
upec177	wt	O25B aislado clínico de estudio de epidemiología GVXN
W3110	F ⁻ , λ ⁻ , <i>IN(rrnD-rrnE)1</i> , <i>rph-1</i>	K-12 cepa de laboratorio usada para síntesis de la cepa de producción, CGSC#:4474
CCUG25	wt	O2 aislado obtenido de la colección de cultivos, University of Göteborg (CCUG), Sweden (see Jansson, et al., (1987) Carbohydrate research 161, 273-27)
CCUG11309	wt	O6 aislado del CCUG, OPS con ramificaciones Glc (see Jann, et al., (1994) Carbohydrate research 263, 217-225)
CCUG11311	wt	O6 aislado del CCUG, OPS con ramificaciones GlcNAc (see Jann, et al., (1994) Carbohydrate research 263, 217-225)

Tabla 14: Plásmidos

	Nombre	Descripción	Observaciones
5	pGVXN150	plásmido de expresión a base de pBR322 de EPA-his6 genéticamente destoxificado que codifica 2 sitios de glicosilación	Véase Ihssen, et al., (2010) Microbial cell factories 9, 61
10	pGVXN659	plásmido de expresión a base de pBR322 de EPA genéticamente destoxificado que codifica 4 sitios de glicosilación	el pGVXN150 se modificó para codificar los sitios de glicosilación terminales N y C adicionales
	pGVXN1076	pGVXN659 $\Delta ampR::kanR$	
15	pGVXN579	vector a base de pMAL-p2X para expresión de MBP con un enlazador flexible C terminal seguido por secuencias de 3 sitios de glicosilación y un epítipo myc	Permite purificación rápida de bioconjugados evitando una etiqueta his
	pGVXN114	plásmido de expresión a base de pEXT21 para Pg1B con una etiqueta HA HA tag	Véase Ihssen, et al., (2010) Microbial cell factories 9, 61
20	pGVXN939	plásmido de expresión a base de pEXT21 para Pg1B con una etiqueta HA, codón optimizado	
	pGVXN970	plásmido de expresión a base de pEXT21 para Pg1B sin etiqueta, codón optimizado	
25	pGVXN539	plásmido de expresión a base de pACT3 para genéticamente destoxificado, empleo de codón	resistencia a cloranfenicol reemplazda por canamicina de pGVXN161 (oligos:

5

10

Nombre	Descripción	Observaciones
	optimizado, EPA de etiqueta his que codifica 2 sitios de glicosilación como pGVXN150	#1399/#1400)
pGVXN161	pKD4	Véase Datsenko and Wanner, (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97, 6640-6645
pGVXN112	plásmido de expresión a base de pACT3 para Pg1B con una etiqueta Tag	

Tabla 15: Secuencias

15

20

25

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO.
<i>rmlB</i> (upec138)	GTGAAGATACTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTG GTTCTGCTGTTGTTCTGTCACATAAATAAATAACGCAA GATAGTGTTGTTAATGTCGATAAATTAACATACGCCG GAAACCTGGAATCACTTGCAGATGTTTCTGATTCTGA ACGCTATTTCTTTGAACATGCGGATATTTGTGATGCA GCTGCAATGGCACGGATTTTTGCTCAGCATCAGCCG GATGCAGTGATGCACCTGGCAGCTGAAAGCCATGTT GACCGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAA CCAATATTGTGGGTACTTATGTCCTTTTAGAAGCGGC TCGGAATTATTGGTCTGGTCTGGATGATGAAAAGAAA AAAAACTTCCGTTTTTCATCATATTTCTACTGATGAGGT GTATGGTGACTTACCCCATCCGGATGAAGTAAATAGC AATGAAACGTTGCCGCTATTTACGGAAACGACAGCAT ACGCGCCAAGTAGTCCATATTCTGCTTCTAAAGCTTCC AGCGATCATTTGGTTCGCGCATGGAAACGTACTTATG GTTTACCGACCATTGTGACTAATTGCTCGAACAACAT GGTCCTTATCATTTCCCGGAAAAGCTTATTCCACTGG TTATTCTTAATTCACTGGAAGGTAAGGCATTACCTATT TATGGCAAAGGAGATCAGATCCGCGACTGGTTGTAT GTAGAGGATCATGCTCGAGCGTTATATAACGTCGTA ACCGAAGGTAAAGCGGGCGAAACTTATAACATTGGT GGACACAACGAAAAGAAAAACATCGACGTAGTGTTT ACTATTTGTGATTTGTTGGATGAGATAGTCCCGAAAG	1

5

10

15

20

25

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO.
	AGAAATCTTACCGCGAGCAAATTACTTATGTTACCGA TCGTCCGGGACACGATCGCCGTTATGCGATTGATGCT GAGAAGATTGGTCGCGAATTGGGATGGAAACCACAG GAAACGTTTGAGAGTGGGATTCGTAAAACGGTGGA ATGGTACCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAATG TGAAAAGTGGTGCCTATCAATCGTGGATTGAACAG AACTATGAGGGCCGCCAGTAA	
<i>rmlD</i> (upec138)	ATGAATATCCTCCTTTTTGGCAAAACAGGGCAGGTA GGTTGGGAACTACAGCGTGCTCTGGCACCTCTGGGT AATTTGATTGCTCTTGATGTTCACTCCACTGATTACTG TGGTGATTTTAGTAATCCTGAAGGTGTAGCTGAAACC GTAAGAAGCATTTCGGCCTGATATTATTGTCAACGCA GCCGCTCACACCGCAGTAGACAAAGCAGAATCAGA ACCGAAGTTTGCACAATTACTGAACGCGACGAGTGT CGAAGCGATCGCGAAAGCAGCCAATGAAGTCGGCG CCTGGGTTATTCACTACTCTACTGACTACGTATTTCC GGGGACCGGTGAAATACCATGGCAGGAGGAGGATG CAACCGCACCGCTAAATGTTTACGGTGAAACCAAGT TAGCGGGAGAAAAAGCATTACAAGAGCATTGTGCG AAGCACCTTATTTTCCGGACCAGCTGGGTCTATGCA GGTAAAGGAAATAACTTCGCCAAAACAATGTTGCG TCTGGCAAAAGAGCGTGAAGAATTAGCCGTTATTAA TGATCAGTTTGGTGCGCCAACTGGCGCAGAGTTACT GGCTGATTGTACGGCACATGCTATTCGTGTGGCACT GAATAAACCGGAAGTCGCAGGCTTGTACCATCTGGT AGCTAGTGGTACCACAACGTGGCACGATTATGCTG CGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGCATT CCCCTTGCACTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAAC AACAGCCTATCCTACACCAGCTCGTCGTCCACATA ACTCTCGCCTTAATACAGAAAAATTCAGCAGAA CTTTGCGCTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTTGGCG TGAAACGAATGCTTAACGAATTATTTACGACTACA GCAATTTAA	2
<i>rmlA</i> (upec138)	ATGAAAACGCGTAAAGGTATTATTTTGGCGGGTG TTCTGGTACTCGTCTTTATCCTGTGACGATGGCCGTC AGTAAACAGCTGTTACCGATTTATGATAAACCGAT GATCTATTACCCGCTCTCTACACTGATGTTAGCGGG TATTCGCGATATTCTGATTATCAGTACACCACAGGA TACTCCTCGTTTTCAACAACGCTGGGTGACGGGAG CCAGTGGGGCCTGAATCTTCAGTACAAAGTGCAAC CGAGTCCGGATGGTCTTGCGCAGGCGTTTATTATCG GTGAAGAGTTTATTGGTGGTGATGATTGTGCTTTGG	3

5

10

15

20

25

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO.
	TACTTGGTGATAATATCTTCTACGGCCACGACCTGC CGAAGTTAATGGACGTAGCTGTTAACAAAGAAAGT GGTGCAACGGTATTTGCCTATCACGTTAATGATCCT GAACGTTATGGTGTCGTGGAGTTTGATAATAACGG TACTGCAATTAGCCTGGAAGAAAAACCGCTGGAAC CAAAAAGTAACTATGCGGTTACTGGGCTTTATTTCTA TGACAATGACGTTGTGGAAATGGCGAAAAACCTTA AGCCTTCTGCCCGAGGTGAACTGGAAATTACCGATA TTAACCGTATTTATATGGAACAAGGACGTTTGTCTG TCGCTATGATGGGGCGTGGCTATGCATGGCTGGATA CAGGGACGCATCAAAGTCTTATTGAAGCAAGCAAC TTCATTGCCACCATTGAAGAGCGCCAGGGACTAAAG GTTTCCTGTCCGGAAGAAATTGCTTATCGTAAAGGG TTTATTGATGCTGAGCAGGTAAAAGTATTAGCCGAA CCGTTGAAGAAAAATGCTTATGGTCAGTATCTGCTC AAAATGATTAAAGGTTATTAA	
<i>rmlC</i> (upec138)	ATGAACGTAATTAAAACTGAAATTCCTGATGTGCTG ATTTTTGAACCAAAAGTTTTTGGGGATGAACGTGGCT TCTTTTTTGAGAGTTTTAATCAGAGGATTTTGAAGA AGCAGTAGGTCGTAAGGTTGAGTTTGTTTCAGGATAA CCATTCTAAGTCCAGTAAAGGTGTTTTACGTGGTCTT CATTATCAGTTAGAACCTTATGCTCAAGGAAAACCTGG TGCGCTGTGTTGTTGGCGAGGTTTTTGATGTTGCGGTT GATATTCGTAAATCGTCACCTACATTTGGGAAATGG GTTGGGGTGAATTTGTCTGCTGAGAATAAGCGTCAG TTGTGGATTCTTGAGGGATTTGCACATGGTTTTTTGG TGCTGAGTGATTTAGCAGAAGTTTTATATAAAACGA ATCAATATTATGCTCCATCACATGAAAAAAATATTAT ATGGAATGACCTCTTGCTTAATATTAAATGGCCGAGC ACAGCACTGATCACTCTGTCTGATAAGGATGCAAA TGGGGAAAGATTTGAACTAAGTGAGTTTTGA	4
<i>wzx</i> (upec138)	ATGTCTCTCTTAAACATAGTATATGGAATGTTGCGG GCTACTTTATACCAACATTAATTGCAATTCCCGCCTTT GGATTAATTGCGAGGAAAATTGGTGTAGAACTATTTG GTTTGTATACGTTAGCAATGATTTTTATAGGGTATGCA AGTATATTTGATGCTGGGTAAACAAGAGCTGTTGTGCG TGAAATAGCATTACTAAAAAACAGAGTGGACGATTGT AATACGATAATAGTAACTTCTATTATCGCTGTGATATT TTTAGGGTTTATCGGAGGCGGGGAGTGTCTGCTTA AAGGCGATATTATTGAACTGTAAATATCTCACCAATA TATTACGCCGATTTCGATAAAGTCTCTAGTATTATTATCA TCTCTGATACCTGTATTCTTAGTCACGCAAATACTATTA	5

5

10

15

20

25

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO.
	GCAGAGCTTGAGGGTCGGAATATTTTGGGATTCTAAA TATACAAAAAAGTGTAGGGAATTCTTTAATTGCAGGGT TACCTGCATTATTTGTTTTAATTAATCAAACGCTTTTTTC TGCAATTATTGGTGTAGCGATTGCAAGAGTTATATGCTT GTGGTTAAGCTACATTATGAGCAGGGAAAGAATAACTA TCGATATCTCATTTTTTTCAATAACTGTTTTAAAGCGGTT ATTTAGATATGGCGGGTGGGTAACTATAAGTAACATAA TATCTCCTATATTAGCGAGTATGGATAGATTTATTCTATC CCATATCCAGGGAGCATCAAAAATATCATTCTATACAGT CCCTAATGAGCTGGTAACTAGGCTTGGGAATAGTTCAGG CTCTCTTGGGAAAGCTGTTTTTCCAAAATTAAGT CATGCAAGGAATTTTACAGCGTCATATGCAGAGCAAAA AAAAGCTTATATATTAATGACTGTCATTGTAATGCCTTT GGTTTTATTTGTATATTATTACGCAAAGTTTATTTTAACA TTGTGGATGGGGGCTGAGTATGCAGGGATTTCGGTCTGA AATATTACGGATTATGCTTATAGGGTATATTTTAACTGT TATTCACAAATCTCTTTTGCCAACATACAGGCCTTTGGA AAAGCAAAATACACTGCATACATCCATATGATGGAATT TATTCCTTATTTGATAATGTTATATATAATTTCAAAGGAA TATGGGGTTATTGGTGTGCGTGGTTATGGACAATTCGA GTAATAATTGATTTTTTTGATGCTTTTATATATGAGTTATC GTTGTAATAATCTTATGAAAAAAGGGTAG	
<i>wekA</i> (upec138)	ATGATATATATTGTGGTATTAAATTGGAATGGGGCTA TAGATACCATTAATTGTGTAAAGTTTAATGGATTT AAATGTTAGCGATTATAAAATTATCATTGTTGATAAC TGTTCTATGGATAACTCATATGATACTATAAAAGAAA ATCTTAATTCATTATATATTGCTGATAAAAGTATCATT GAGGTGAAGTATGAGGATAGAAATAAATATAAAACC TTAGAAAACGATAAAATCATATTAATACAATCTCCGC AAAATAATGGGTACGCAAGTGGTAATAATATTGGCAT AGAGTTCGCTCTTAATCAGGAGAATATGAAATACGTC TGGGTTCTGAATAATGATACTGAAGTGGATAAAGAGG CTTTAACTCATTTAATTAGTAAATGTGATTTCAGATAAA AGTATAGGGATTTGCGGTTCTCGTTTAGTCTATTTTGCC GACAGAGAGATGCAGCAAGGACTAGGTGGGGTGCATA ACAAATGGTTATGCACTACAAAAAATTATGAAATGGG AAGATTAGTTTCCAAAAAATATGATGATGAAGTCATTA GTAATGATATAGATTATATAATTGGCGCATCGATGTTTT TCTCTAGAGAATGTTTGGAAACAGTTGGATTGATGAAT GAAGAATATTTTTTATACTATGAAGAGTTAGATATTTGC CTCAGAGCAAAAGCAAAGAACTTTAAATTAGGTATTTG CTCAGAAAGTTTGGTTTATCATAAAAATAGGTGCAAGTA	6

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO.
	CTGATGGGGGAAAGAGCATGATGGCTGATCTTTGCTCA ATAAAAAATAGGCTGGTCATTACAGAAAGGTTTTATCC CCAATATTATTGGACGGTATGGTTGTCACTTTTTGTTGTA GCATTTAACCGTGCTAGAAGAGGTGAGTTTAATAAGAT GAAAAGATGTTTGAATGTTATGTTTAACTTCAAACGAAA CAAAGGTAGCAAATGCCATTAG	
<i>wekB</i> (upec138)	ATGAAAGTGGCTTTTTTATCTGCTTATGATCCACTATCTA CATCCAGTTGGTCTGGCACACCTTATTATATGCTAAAGG CATTATCGAAGAGAAATATTTCCATTGAAATATTAGGAC CGGTAAATAGCTATATGATATACATGTTAAAAGTATATA AATTAATATTAAGGTGTTTCGGAAAAGAATATGATTATA GTCATTCGAAGTTGCTTTCCAGGTATTACGGTAGAATATT CGGTAGGAAATTAATAAAAAAATTGATGGTTTGGATTTTATT ATCGCACCTGCAGGTTCCCTCACAAATTGCTTTTTTAAAAA CAACCATACCAATAATATATCTATCGGATACAACATATGA TCAATTA AAAAGCTATTATCCGAATTTAAATAAAAAAAC AATTATAAATGATGAGGATGCAAGTTTAATCGAACGCAA GGCTATTGAAAAAGCAACAGTAGTATCTTCCCATCTAAA TGGGCAATGGATTTTTGCAGGAATTATTACAGATTAGATT TTGATAAATTAGTTGAAATACCATGGGGGGCTAATTT ATTTGATGATATTCACTTTGCTAATAAAAAATATAATTC AAAAGAATAGTTATACTTGTCTTTTCTTGGGAGTTGAT TGGGAAAGAAAAGGTGGGAAAACAGCCTTGAAAGCA ATTGAATATGTAAGGCAGTTATATGGGATCGATGTTAG ACTAAAAATTTGTGGATGTACTCCGAATCAAAGATTT TACCTACTTGGGTTGAATTAATTGATAAAGTAGATAAA AATAACGTTGACGAATATCAGAAATTCATCGATGTGTT ATCTAACGCTGATATACTTCTTTTACCAACCATTGCTGA ATGTTATGGAATGGTATTTTGTGAAGCTGCTGCTTTTGG ATTGCCTGTTGTCGCTACAGATACAGGTGGAGTCAGTT CTATAGTTATCAACGAAAGGACGGGGATATTAATTTAA GACCCGTTAGACTATAAGCACTTTGGAAATGCAATTCA TAAAATAATTAGTTCCGTAGAGACTTATCAAACTACTC CCAAAACGCAAGAATTAGATATAATAATATATTGCATTG GGACAATTGGGCTAAAAAGATAATTGAGATTATGTATG AGCATAAGAATAGAAGAATCAAATAG	7
<i>wzy</i> (upec138)	ATGAGCATAAGAATAGAAGAATCAAATAGCACAAAAAG AATTATATGTTTATTTATACTTTTTCTTGTTTTCCCTGATTT TTTGTTTTTATACATTAGGGGTTGATAATTTTAGCATTTCAA CGATAATCTCAATTACATTGCTTTTTTGTTTTTTAAGAGCT AAAAATATTTGCAAAGATAATTTTCTAATAATAGTAGCG TTATTCATATTGTTGTGTTTTAACTGTTTGTTAAGTATGCTA	8

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO.
	TTTAATATTGAACAGGCTTTAACATTTAAAGTTGTACTTTC AATATATAGCATCTTAATAATGGCATACGTCTCCTCTTGTT ATGCACAGACGTTGTGGTTATGTTCTGAAGAAATACTTAA GAGATCCGTCCTTTATTTGTTTCGCATTTCTTTGCCTTATTGG CATTATAAGTATTCTTTTACAGAAGACTGAGATTATACATG ATAAAAGTATGATTCTTTTTCTGAACCATCAGCATTTGCA TTGGTTTTTATACCTATCTTTTCATTTTGTTTATACTATACAA GAGGGGGGGGGGCTACTATTGCTCTATATATTATCTTTGGGT ATTGCGTTAGGTATCCAGAATTTAACAATGTTGGTAGGCAT TGTGATTAGTGTGTTTTGTGATGAAAAAATAACTATAAGGC AAACTATTGTTATACTTTTGGGGGCATGGATTTTTTCCATGA TATTAAGTGATTTAGACATTTCTTACTATACATCGCGGCTTG ATTTTAAAAATACTACGAACCTATCAGTGCTTGTATATCTTT CAGGAATTGAAAGAGCTTTCTTGAATTTTATTACAAGTTATG GTCTTGGTATTGGTTTTCAACAAATGGGAGTGAATGGGGAG ATAGGAATATATCAACAAATTTTAGCTGAACTTGATGCCCC TATGTTAAATATATACGATGGCTCATTTATTTCTTCTAAGTT AATATCTGAGTTTGGGGTTATTGGTGCATTAATGTGTATT TTCTATTTTTTTTTATTTTTCCCGATTTTATCTGCGTTTCAA AAAAAGTAAGAGATATTCACCGCAGTATATTTTAGCAT ATAGCTTCTACATGTGTTTCTTCATCCCTCTTTTTATACG TGGTGCTGGTTATATAAACCCCTATGTGTTTATGTTATTT TCATCAATATTTTTGTGCAAAATATCACGCTAAAAATATCT TGATGAAATCTAATGTCCAGATAGCTATATAA	
<i>wbbJ</i> (upec138)	ATGTGCATTAAAAAAAACCTTAAGTTAATTAACGATA TGGCCTTTATGGTGGTCTTAGGCTTCTTAAAGATATATTC TTAACAAAAATTTTTATTTTGTTCAAATGTTAGGATTATTA GATTTCATGTTATATTAGAAAAGATGGAAGTGTTAGTTT TGGAAGAGGTTTTACATCAGGTGTAGGATTACGAGTTGA TGCATTTATGGATGCCGTAGTTTCCATTGGAGAAAATGTT CAAATTAATGACTATGTTTACATCGCGGCTATTAATAATG TCATTATTGGTAGAGATACATTAATAGCAAGTAAAGTATT TATTAGTGATCATAATCATGGTATTTTTTCTAAATCCGATA TCCATAGTTCACCAACTATTATTCCTTCGTCTAGGCCCTT GAATCTGCACCTGTGTATATTGGAGAGCGTGTGTGGATTG GCGAAAATGTGACAATATTACCAGGTGCGTGTATAGGTAA TGGTGTAGTTATTGGCGCAAACAGTGTTGTTTCGTGGTGAG ATTCCTAATAATGTGATCATTGCTGGTGTTCAGCTAAAA TTGTAAAAAATATAACTATGAGCGTATGCAATGGGAAA GAATATAG	9
<i>wbbK</i>	ATGGGAAAGAATATAGTTGTAATATCGGCTGTTAATTTT ACAACCGGAGGCCCTTTACCGTACTAAAAAATGTGCT	10

5

10

15

20

25

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO.
(upec138)	TACAGCAACTAAAGATAGAGCCGAATGTAAATTTATTG CACTGGTTCATAGCTCTGCTGAACTAATGGAATTATTTTC CGTGGGTGAATTTATAGAGTATCCAGAAGTCAAGTCTT CGTGGGTAAAAGATTATATTTCGAATATATAACTTGCAA TAGATTATCTAAGGTGATTAAGGCAACTCATTGGGTATG CTTACATGATATTACAGCAAATGTTAGTGTACCCTATAG ATTTGTTTATTGCCACAATCCTGCACCGTTCTATAAATAT TTAAGCTATCGAGATATTATAGGAGAACCTAAATTTTAT CTTTTTTATCTTTTTTATGGGCTTTTATACAATATCAATAT AAAAAAGAACACAGCAGTTTTTGTTCAGCAGCAGTGGCT AAAAAAGAATTCGAAAAAAAATATAAGTTAAAGAATG TTGTTGTTAGTCGCCCTGAAGATATTTGCCCTTTTGAAAG TGATGGTTTGGTAAGAAATAATAAAAAAGGATGTGAG GATATTTTACCCAGCAGTGCCCCGTATTTTAAAAACTTT GAAGTTATCATACGTGCTGCACAAATATTACAAGATAAA AATATTCATTTTTATCTTACTTTTGATGGTACTGAAAA TAAGTATGCAAAAAGAATATATAAATTAGCTTCCGA ACTGAAAAATGTACATTTCTCGGTTACCTTAATGCA ACCGAGATGGTTAACTTTTATCAAGATTCAGATATTA TTTGTTTCCCATCGAACTAGAAACGTGGGGATTACC ATTATCAGAAGCTAAACATACAAAAAATGGATATTT GCGGCAGACTTACCTTATGCTCATGAAGTTTATATAA CTATTCAAAAAGTAGATATTTTCCATTTGACGATGAG AAAATACTTGTTTCGCTACATATTAGAGTACACAAGTA AAAATATGCATGAAGATATAAAAAATAGTAGGGTGA ATTTTAATAATGATGCATTGACTGGTTTTGAACAGTTTA TTGAATATATCCTCAAGGGGAACTGA	
wbbL (upec138)	ATGATTATGAATAATGATTATTTTCTCTTTCTTAACCCC GATGTATTCATAACCAGTGAAAGTTTGATTAAATTATGT TGATTATATAATTAGTAATGATTATAAGTTTAGCACAT TATGTCCTTATCGAGATTTTACTAAAAGCAAACATGAT TATTCAATACGGAGTTTTCCAACCTTATATGATTTTCTTT GTTCTTTTTTATTGGGGGTGAATAAAAGTAAATTAAG AAGGAAAATATACTTTCTGATACTGTAGTTGATTGGTG TGCTGGCTCATTTATGCTTATTCATGCTTTAAGTTTCTTA AATGTGAATGGTTTTGATCAAAAATATTTTATGTATTGT GAAGATATTGACCTTTGTATGCGTTTAAAATTAAGTGG AGTAGATCTTTACTATACTCCCCATTTTGATGCTATTCA TTATGCGCAGCATGAAAATAGAAGAATATTTACTAAAG CATTTTCGATGGCATATAAGGAGTATTACGCGCTACATA TTACGGAAACCAATTCTTTCTTATAAAAACTATAGAAA AATTACATCCGAAGTGGTAAAGTGA	11

5

10

15

20

25

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO.
grupo de gen <i>rfb</i> (upec138) <i>E. coli</i>	GTGAAGATACTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTGGTTCT GCTGTTGTTTCGTCACATAATAAATAATACGCAAGATAGTGT TGTTAATGTCGATAAAATTAACATACGCCGAAACCTGGAAT CACTTGCAGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATTTCTTTGAAC ATGCGGATATTTGTGATGCAGCTGCAATGGCACGGATTTTT GCTCAGCATCAGCCGGATGCAGTGATGCACCTGGCAGCTGA AAGCCATGTTGACCGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTA TTGAAACCAATATTGTGGGTACTTATGTCCTTTTAGAAGCGG CTCGGAATTATTGGTCTGGTCTGGATGATGAAAAGAAAAAA AACTTCCGTTTTTCATCATATTTCTACTGATGAGGTGTATGGT GACTTACCCCATCCGGATGAAGTAAATAGCAATGAAACGTT GCCGCTATTTACGGAAACGACAGCATACGCGCCAAGTAGTC CATATTCTGCTTCTAAAGCTTCCAGCGATCATTTGGTTTCGCG CATGGAAACGTACTIONTATGGTTTACCGACCATTGTGACTAATT GCTCGAACAACATATGGTCCTTATCATTTCCCGGAAAAAGCTT ATTCCACTGGTTATTCTTAATTCACTGGAAGGTAAGGCATTA CCTATTTATGGCAAAGGAGATCAGATCCGCGACTGGTTGTA TGTAAGAGGATCATGCTCGAGCGTTATATACCGTCGTAACCG AAGGTAAAGCGGGCGAAACTTATAACATTGGTGGACACAA CGAAAAGAAAAACATCGACGTAGTGTTCACTATTTGTGATT TGTTGGATGAGATAGTCCCGAAAGAGAAATCTTACCGCGAG CAAATTACTTATGTTACCGATCGTCCGGGACACGATCGCCG TTATGCGATTGATGCTGAGAAGATTGGTCGCGAATTGGGAT GGAAACCACAGGAAACGTTTGAGAGTGGGATTCGTAAAAC GGTGAATGGTACCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAATG TGAAAAGTGGTGCCTATCAATCGTGGATTGAACAGAACTAT GAGGGCCGCCAGTAATGAATATCCTCCTTTTTTGCCAAAACA GGGCAGGTAGGTTGGGAACTACAGCGTGCTCTGGCACCTCT GGGTAATTTGATTGCTCTTGATGTTCACTCCACTGATTACTG TGGTGATTTTAGTAATCCTGAAGGTGTAGCTGAAACCGTAA GAAGCATTTCGGCCTGATATTATTGTCAACGCAGCCGCTCAC ACCGCAGTAGACAAAGCAGAATCAGAACCGAAGTTTGCAC AATTACTGAACGCGACGAGTGTCTGAAGCGATCGCGAAAGC AGCCAATGAAGTCGGCGCCTGGGTATTCACTACTCTACTG ACTACGTATTTCCGGGGACCGGTGAAATACCATGGCAGGAG GAGGATGCAACCGCACCGCTAAATGTTTACGGTGAAACCAA GTTAGCGGGAGAAAAAGCATTACAAGAGCATTGTGCGAAG CACCTTATTTTCCGGACCAGCTGGGTCTATGCAGGTAAAGG AAATAACTTCGCCAAAACAATGTTGCGTCTGGCAAAAGAGC GTGAAGAATTAGCCGTTATTAATGATCAGTTTGGTGCGCCA ACTGGCGCAGAGTTACTGGCTGATTGTACGGCACATGCTAT TCGTGTGGCACTGAATAAACCGGAAGTCGCAGGCTTGTACC	12

5

10

15

20

25

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO.
	ATCTGGTAGCTAGTGGTACCACAACGTGGCACGATTATGCT GCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGCATTCCCCT TGCACTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAACAACAGCCTATC CTACACCAGCTCGTCGTCCACATAACTCTCGCCTTAATACAG AAAAATTTTCAGCAGAACTTTGCGCTTGTCTTGCCTGACTGGC AGGTTGGCGTGAAACGAATGCTTAACGAATTATTTACGACT ACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCTGTAATGGTGGA GCAAGATGTATTAAGGAATGATGAAATGAAACGCGTA AAGGTATTATTTGGCGGGTGGTTCTGGTACTCGTCTTTATC CTGTGACGATGGCCGTCAGTAAACAGCTGTTACCGATTAT GATAAACCGATGATCTATTACCCGCTCTCTACACTGATGTTA GCGGGTATTCGCGATATTCTGATTATCAGTACACCACAGGA TACTCCTCGTTTTCAACAACCTGCTGGGTGACGGGAGCCAGT GGGGCCTGAATCTTCAGTACAAAGTGCAACCGAGTCCGGAT GGTCTTGCGCAGGCGTTTATTATCGGTGAAGAGTTTATTGGT GGTGATGATTGTGCTTTGGTACTTGGTGATAATATCTTCTAC GGCCACGACCTGCCGAAGTTAATGGACGTAGCTGTTAACAA AGAAAGTGGTGCAACGGTATTTGCCTATCACGTTAATGATC CTGAACGTTATGGTGTCGTGGAGTTTGATAATAACGGTACT GCAATTAGCCTGGAAGAAAAACCGCTGGAACCAAAAAGTA ACTATGCGGTTACTGGGCTTTATTTCTATGACAATGACGTTG TGGAATGGCGAAAAACCTTAAGCCTTCTGCCCAGGTGAA CTGGAATTACCGATATTAACCGTATTTATATGGAACAAGG ACGTTTGTCTGTCGCTATGATGGGGCGTGGCTATGCATGGCT GGATACAGGGACGCATCAAAGTCTTATTGAAGCAAGCAACT TCATTGCCACCATTGAAGAGCGCCAGGGACTAAAGGTTTCC TGTCCGGAAGAAATTGCTTATCGTAAAGGGTTTATTGATGC TGAGCAGGTAAAAGTATTAGCCGAACCGTTGAAGAAAAAT GCTTATGGTCAGTATCTGCTCAAAATGATTAAAGGTTATTA ATAAGATGAACGTAATTAAGAACTGAAATTCCTGATGTGCTG ATTTTTGAACCAAAAGTTTTTGGGGATGAACGTGGCTTCTTT TTTGAGAGTTTAAATCAGAGGATTTTTGAAGAAGCAGTAGG TCGTAAGGTTGAGTTTGTTCAGGATAACCAATTCTAAGTCCA GTAAAGGTGTTTTACGTGGTCTTCATTATCAGTTAGAACCTT ATGCTCAAGGAAAACCTGGTGCGCTGTGTTGTTGGCGAGGTT TTTGATGTTGCGGTTGATATTCGTAAATCGTCACCTACATTT GGGAAATGGGTGGGGTGAATTTGTCTGCTGAGAATAAGCG TCAGTTGTGGATTCTGAGGGATTTGCACATGGTTTTTTGGT GCTGAGTGATTTAGCAGAAGTTTTATATAAAACGAATCAAT ATTATGCTCCATCACATGAAAAAATATTATATGGAATGAC CTCTTGCTTAATATTAATGGCCGAGCACAGCACTGATCAC TCTGTCTGATAAGGATGCAATGGGGAAAGATTTGAACTAA	

5

10

15

20

25

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO.
	GTGAGTTTTGAAATGTCTCTCTTAAAACATAGTATATGGAAT GTTGCGGGCTACTTTATACCAACATTAATTGCAATTCCCGCC TTTGGATTAATTGCGAGGAAAATTGGTGTAGAACTATTTGG TTTGTATACGTTAGCAATGATTTTTATAGGGTATGCAAGTAT ATTTGATGCTGGGTAAACAAGAGCTGTTGTGCGTGAAATAG CATTACTAAAAACAGAGTGGACGATTGTAATACGATAATA GTAAC TTCTATTATCGCTGTGATATTTTTAGGGTTTATCGGA GGCGGGGGAGTGTTTCTGCTTAAAGGCGATATTATTGAACT GTAAATATCTCACCAATATATTACGCCGATTTCGATAAAGT CTCTAGTATTATTATCATCTCTGATACCTGTATTCTTAGTCA CGCAAATACTATTAGCAGAGCTTGAGGGTCGGAATATTTT GGGATTCTAAATATACAAAAAAGTGTAGGGAATTCTTTAAT TGCAGGGTTACCTGCATTATTTGTTTTAATTAATCAAACGCT TTTTTCTGCAATTATTGGTGTAGCGATTGCAAGAGTTATATG CTTGTGGTTAAGCTACATTATGAGCAGGGAAAGAATAACTA TCGATATCTCATTTTTTTCAATAACTGTTTTAAAGCGGTTAT TTAGATATGGCGGGTGGGTAAC TATAAGTAACATAATATCT CCTATATTAGCGAGTATGGATAGATTTATTCTATCCCATATC CAGGGAGCATCAAAAATATCATTCTATACAGTCCCTAATGA GCTGGTAACTAGGCTTGGAATAGTTCAGGCTCTCTTGGA AAGCTGTTTTTCCAAAATTAAGTCATGCAAGGAATTTTACA GCGTCATATGCAGAGCAAAAAAAGCTTATATATTAATGAC TGTCATTGTAATGCCTTTGGTTTTATTTGTATATTATTACGCA AAGTTTATTTTAACATTGTGGATGGGGGCTGAGTATGCAGG GATTTTCGGTCGAAATATTACGGATTATGCTTATAGGGTATAT TTTTAACTGTTATTCACAAATCTCTTTTGCCAACATACAGGC CTTTGGAAAAGCAAAATACACTGCATACATCCATATGATGG AATTTATTCCTTATTTGATAATGTTATATATAATTTCAAAGG AATATGGGGTTATTGGTGTGCGTGGTTATGGACAATTCGA GTAATAATTGATTTTTTTGATGCTTTTATATATGAGTTATCGT TGTAATAATCTTATGAAAAAAGGGTAGCCTGATGATATATA TTGTGGTATTAAATTGGAATGGGGCTATAGATACCATTAAT TGTGTTAAAAGTTTAATGGATTTAAATGTTAGCGATTATAA AATTATCATTGTTGATAACTGTTCTATGGATAACTCATATGA TACTATAAAAAGAAAATCTTAATTCATTATATATTGCTGATAA AAGTATCATTGAGGTGAAGTATGAGGATAGAAATAAATATA AAACCTTAGAAAACGATAAAATCATATTAATACAATCTCCG CAAAATAATGGGTACGCAAGTGGTAATAATATTGGCATAGA GTTTCGCTCTTAATCAGGAGAATATGAAATACGCTCTGGGTTC TGAATAATGATACTGAAGTGGATAAAGAGGCTTTAACTCAT TTAATTAGTAAATGTGATTCAGATAAAAGTATAGGGATTTG CGGTTCTCGTTTAGTCTATTTTGCCGACAGAGAGATGCAGC	

5	Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO.
10		AAGGACTAGGTGGGGTGCATAACAAATGGTTATGCACTACA AAAAATTATGAAATGGGAAGATTAGTTTCCAAAAAATATGA TGATGAAGTCATTAGTAATGATATAGATTATATAATTGGCG CATCGATGTTTTCTCTAGAGAATGTTTGGAACAGTTGGAT TGATGAATGAAGAATATTTTTTATACTATGAAGAGTTAGAT ATTTGCCTCAGAGCAAAAGCAAAGAACTTTAAATTAGGTAT TTGCTCAGAAAGTTTGGTTTATCATAAAATAGGTGCAAGTA CTGATGGGGGAAAGAGCATGATGGCTGATCTTTGCTCAATA AAAAATAGGCTGGTCATTACAGAAAGGTTTTATCCCAATA TTATTGGACGGTATGGTTGTCACTTTTTGTTGTAGCATTAA CCGTGCTAGAAGAGGTGAGTTTAATAAGATGAAAAGATGTT TGAATGTTATGTTTAACTTCAAACGAAACAAAGGTAGCAAA TGCCATTAGAATATGCACTTAATCATGGTGTTAATAAATCTA TAGTTTGATATGTTATTAAAGGGTATTTAATGAAAGTGGCTT TTTTATCTGCTTATGATCCACTATCTACATCCAGTTGGTCTG GCACACCTTATTATATGCTAAAGGCATTATCGAAGAGAAAT ATTTCCATTGAAATATTAGGACCGGTAAATAGCTATATGAT ATACATGTTAAAAGTATATAAATTAATATTAAGGTGTTTCG 15GAAAAGAATATGATTATAGTCATTCTGAAGTTGCTTTCAGG TATTACGGTAGAATATTCGGTAGGAAATTAAAAAAATTGA TGGTTTGGATTTTATTATCGCACCTGCAGGTTCCCTCACAAAT TGCTTTTTTAAAAACAACCATACCAATAATATATCTATCGGA TACAACATATGATCAATTA AAAAGCTATTATCCGAATTTAA ATAAAAAACAATTATAAATGATGAGGATGCAAGTTTAATC GAACGCAAGGCTATTGAAAAAGCAACAGTAGTATCTTTCCC ATCTAAATGGGCAATGGATTTTTGCAGGAATTATTACAGAT TAGATTTTGATAAATTAGTTGAAATACCATGGGGGGCTAAT TTATTTGATGATATTCACTTTGCTAATAAAAATATAATTCAA 20AAGAATAGTTATACTTGTCTTTTCTTGGGAGTTGATTGGGAA AGAAAAGGTGGGAAAACAGCCTTGAAAGCAATTGAATATG TAAGGCAGTTATATGGGATCGATGTTAGACTAAAAATTTGT GGATGTACTCCGAATCAAAAGATTTTACCTACTTGGGTTGA ATTAATTGATAAAGTAGATAAAAATAACGTTGACGAATATC AGAAATTCATCGATGTGTTATCTAACGCTGATATACTTCTTT TACCAACCATTGCTGAATGTTATGGAATGGTATTTTGTGAA GCTGCTGCTTTTGGATTGCCTGTTGTCGCTACAGATACAGGT GGAGTCAGTTCTATAGTTATCAACGAAAGGACGGGGATATT AATTAAAGACCCGTTAGACTATAAGCACTTTGGAAATGCAA 25TTCATAAAATAATTAGTTCCGTAGAGACTTATCAAACTAC TCCCAAAACGCAAGAATTAGATATAATAATATATTGCATTG GGACAATTGGGCTAAAAAGATAATTGAGATTATGTATGAGC ATAAGAATAGAAGAATCAAATAGCACAAAAAGAATTATAT	

5

10

15

20

25

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO.
	GTTTATTTATACTTTTTCTTGTTTTCCCTGATTTTTTGTTTTAT ACATTAGGGGTTGATAATTTTAGCATTTC AACGATAATCTCA ATTACATTGCTTTTTGTTTTTTTAAGAGCTAAAAATATTTGC AAAGATAATTTTCTAATAATAGTAGCGTTATTCATATTGTTG TGTTTTAACTGTTTGTTAAGTATGCTATTTAATATTGAACAG GCTTTAACATTTAAAGTTGTACTTTCAATATATAGCATCTTA ATAATGGCATAACGTCTCCTCTTGTTATGCACAGACGTTGTGG TTATGTTCTGAAGAAATACTTAAGAGATCCGTCTTTTATTTG TTCGCATTTCTTTCCTTATTGGCATTATAAGTATTCTTTTAC AGAAGACTGAGATTATACATGATAAAAGTATGATTCTTTTT CCTGAACCATCAGCATTTCGATTGGTTTTTATACCTATCTTT TCATTTTGTTTATACTATAACAAGAGGGGGGGGGCTACTATT GCTCTATATATTATCTTTGGGTATTGCGTTAGGTATCCAGAA TTTAACAATGTTGGTAGGCATTGTGATTAGTGTTTTTGTGAT GAAAAAAATAACTATAAGGCCAACTATTGTTATACTTTTGG GGGCATGGATTTTTTCCATGATATTAAGTGATTTAGACATTT CTTACTATACATCGCGGCTTGATTTTAAAAATACTACGAACC TATCAGTGCTTGTATATCTTTCAGGAATTGAAAGAGCTTTCT TGAATTTTATTACAAGTTATGGTCTTGGTATTGGTTTTCAAC AAATGGGAGTGAATGGGGAGATAGGAATATATCAACAAAT TTTAGCTGAACCTGATGCCCCCTATGTTAAATATATACGATGG CTCATTTATTTCTTCTAAGTTAATATCTGAGTTTGGGGTTATT GGTGCATTAATGTGTATTTTCTATTTTTTTTTATTTTCCCGAT TTTATCTGCGTTTCAAAAAAAGTAAGAGATATTCACCGCAG TATATTTTAGCATATAGCTTCTACATGTGTTTCTTCATCCCTC TTTTTATACGTGGTGCTGGTTATATAAACCCCTATGTGTTTA TGTTATTTTCATCAATATTTTGTGCAAATATCACGCTAAAA ATATCTTGATGAAATCTAATGTCCAGATAGCTATATAATAG TAGATTATATTATCATTATCACGTAAATTACATATTAATAGC ATATATGATAACTAGGACATAAATAATGTGCATTAAAAAAA AACTTAAGTTAATTAAACGATATGGCCTTTATGGTGGTCTTA GGCTTCTTAAAGATATATTCTTAACAAAATTTTTATTTTGTT CAAATGTTAGGATTATTAGATTTCCATGTTATATTAGAAAA GATGGAAGTGTTAGTTTTGGAAAAGGTTTTACATCAGGTGT AGGATTACGAGTTGATGCATTTATGGATGCCGTAGTTTCCAT TGGAGAAAAATGTTCAAATTAATGACTATGTTCACATCGCGG CTATTAATAATGTCATTATTGGTAGAGATACATTAATAGCA AGTAAAGTATTTATTAGTGATCATAATCATGGTATTTTTTCT AAATCCGATATCCATAGTTCACCAACTATTATTCCTTCGTCT AGGCCCCCTGAATCTGCACCTGTGTATATTGGAGAGCGTGT GTGGATTGGCGAAAATGTGACAATATTACCAGGTGCGTGTA TAGGTAATGGTGTAGTTATTGGCGCAAACAGTGTTGTTTCGT	

5

10

15

20

25

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO.
	GGTGAGATTCCCTAATAATGTGATCATTGCTGGTGTTCAGCT AAAATTGTTAAAAAATATAACTATGAGCGTATGCAATGGGA AAGAATATAGTTGTAATATCGGCTGTTAATTTTACAACCGG AGGCCCCCTTACCGTACTAAAAAATGTGCTTACAGCAACTA AAGATAGAGCCGAATGTAAATTTATTGCACTGGTTCATAGC TCTGCTGAACTAATGGAATTATTTCCGTGGGTGAATTATA GAGTATCCAGAAGTCAAGTCTTCGTGGGTAAAAAGATTATA TTTCGAATATATAACTTGCAATAGATTATCTAAGGTGATTAA GGCAACTCATTGGGTATGCTTACATGATATTACAGCAAATG TTAGTGTACCCTATAGATTTGTTTATTGCCACAATCCTGCAC CGTTCTATAAATATTTAAGCTATCGAGATATTATAGGAGAA CCTAAATTTTATCTTTTTTATCTTTTTTATGGGCTTTTATACA ATATCAATATAAAAAAAGAACACAGCAGTTTTTGTTCAGCAG CAGTGGCTAAAAAAGAATTCGAAAAAAATATAAGTTAA AGAATGTTGTTGTTAGTCGCCCTGAAGATATTTGCCCTTTTG AAAGTGATGGTTGGTAAGAAATAATAATAAAAAGGATGT GAGGATATTTTACCCAGCAGTGCCCCGTATATTTAAAAACT TTGAAGTTATCATACGTGCTGCACAAATATTACAAGATAAA AATATTCATTTTTATCTTACTTTTGATGGTACTGAAAATAAG TATGCAAAAAGAATATATAAATTAGCTTCCGAACTGAAAAA TGTACATTTCCCTCGGTTACCTTAATGCAACCGAGATGGTTAA CTTTTATCAAGATTCAGATATTATTTGTTTCCCATCGAAACT AGAAACGTGGGGATTACCATTATCAGAAGCTAAAACATACA AAAAATGGATATTTGCGGCAGACTTACCTTATGCTCATGAA GTTTTATATAACTATTCAAAAAGTAGATATTTTCCATTTGAC GATGAGAAAATACTTGTTGCTACATATTAGAGTACACAAG TAAAAATATGCATGAAGATATAAAAAATAGTAGGGTGAATT TTAATAATGATGCATTGACTGGTTTTGAACAGTTTATTGAAT ATATCCTCAAGGGGAACTGACGTGGTTTATATTATAATCGTT TCACATGGCCATGATGACTATATAGAAAATCTTTTATTAAAT TTAAAGTTGCCCTCTGGAAGATTTAAAATAATAGTTCGTGA TAACAAAAGTTCAATGGTTTTAAAAAAAACATGCGAAAAA AATTGCGTAACCTATTTGCATGGAGGGCAATATGGATTTGG ACATAATAATAACATAGCAGTGTCATATATAATTAATAACT TCATGATTATGAATAATGATTATTTTCTCTTTCTTAACCCCG ATGTATTCATAACCAGTGAAAGTTTGATTAATTATGTTGATT ATATAATTAGTAATGATTATAAGTTTAGCACATTATGTCTTT ATCGAGATTTTACTAAAAGCAAACATGATTATTCAATACGG AGTTTTCCAACCTTTATATGATTTTCTTTGTTCTTTTTTATTGG GGGTGAATAAAAGTAAATTAAGAAGGAAAATATACTTTCT GATACTGTAGTTGATTGGTGTGCTGGCTCATTTATGCTTATT CATGCTTTAAGTTTCTTAAATGTGAATGGTTTTGATCAAAAA	

5

10

15

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO.
	TATTTTATGTATTGTGAAGATATTGACCTTTGTATGCGTTTA AAATTAAGTGGAGTAGATCTTTACTATACTCCCCATTTTGAT GCTATTCATTATGCGCAGCATGAAAATAGAAGAATATTTAC TAAAGCATTTTCGATGGCATATAAGGAGTATTACGCGCTACA TATTACGGAAACCAATTCTTTCTTATAAAAACTATAGAAAA ATTACATCCGAACTGGTAAAGTGA	
Proteína EPA destoxificada que comprende 4 secuencias de N-glicosilación optimizadas	GSGGGDQNATGSGGGKLAEEAFDLWNECAKACVLDLKDGV SSRMSVDPAIADTNGQGVLHYSMVLEGGNDALKLAIDNALSIT SDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSWSLNWLVP IGHEKP SNIKVFIHELNAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVR AHESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKV LCLLDPLDGVYNYLAQQRCLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHD LDIKDNNNSTPTVISHRLHFPEGGSLAALTAHQACHLPLEAFTR HRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNA LASPGSGGDLGEAIREQPEQARLALTAAAESERFVRQGTGND EAGAASADVVS LTCPVAKDQNR TKGECAGPADSGDALLERN YPTGAEFLGDGGDV SFSTRGTQNWTV ERLLQ AHRQLEERGYV FVG YHGT FLEAAQSIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALA YGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRWSLPGFYRTGLTLAA PEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRVTILGWPLAERTV VIPS APTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPRE DLKL GSGGGDQNAT	13
Secuencia consenso de N- glicosilación	Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro	14
Secuencia consenso de N- glicosilación	Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro	15

20

Las modalidades descritas en la presente están propuestas para ser solamente ejemplares, y aquellos expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de comprobar usando no más que experimentación de rutina, numerosos equivalentes a los procedimientos específicos descritos en la presente. Todas de tales equivalentes están consideradas por estar dentro del alcance de la presente invención y son cubiertas por las siguientes reivindicaciones.

25

Todas las referencias (que incluyen solicitudes de patente, patentes, y publicaciones) citadas en la presente, son incorporadas en la presente por referencia en su totalidad y para todos los propósitos en la misma extensión como si cada publicación individual o patente o solicitud de patente fuera específicamente e individualmente indicada para ser incorporada por referencia en su totalidad para todos los propósitos.

7. MODALIDADES

Modalidades 1:

1. Una célula hospedera procariótica que comprende:

a. grupo de gen *rfb*(upec138) (SEQ ID NO: 12), grupo de gen *rfb*(upec163), o grupo de gen *rfb*(upec177);

5b. una secuencia de nucleótido que codifica una oligosacaril transferasa; y

c. una secuencia de nucleótido que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO: 14).
2. Una célula hospedera procariótica que comprende:

a. *rmlB*, *rmlD*, *rmlA*, *rmlC*, *wzx*, *wekA*, *wekB*, *wzy*, *wbbJ*, *wbbK*, y *wbbL*;

10b. una secuencia de nucleótido que codifica una oligosacaril transferasa;

c. una secuencia de nucleótido que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO: 14).
3. Una célula hospedera procariótica que comprende:

a. una secuencia de nucleótido que codifica:

i. dTDP-Glucosa 4,6-deshidratasa;

ii. dTDP-6-Desoxi-D-glucosa 3,5-epimerasa;

iii. Glucosa-1-fosfato timidililtransferasa;

iv. dTDP-4-deshidroramnosa 3,5-epimerasa;

20v. Flipasa del antígeno O;

vi. dTDP-Rha:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP α -1,3-ramnosiltransferasa;

vii. UDP-Glc:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP β -1,6- glucosiltransferasa;

viii. Polimerasa de antígeno O;

ix. O-acetil transferasa;

x. UDP-Glc:Rha-GlcNAc-UPP α -1,3- glucosiltransferasa y

25xi. dTDP-Rha: GlcNAc-UPP α -1,3-ramnosiltransferasa;

b. una secuencia de nucleótido que codifica una oligosacaril transferasa;

c. una secuencia de nucleótido que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO: 14).
4. La célula hospedera de la reivindicación 3, en donde:

a. la dTDP-Glucosa 4,6-deshidratasa comprende una secuencia de aminoácido que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una dTDP-Glucosa 4,6-deshidratasa codificada por la SEQ ID NO: 1;

5 b. la dTDP-6-Desoxi-D-glucosa 3,5-epimerasa comprende una secuencia de aminoácido que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una dTDP-6-Desoxi-D-glucosa 3,5-epimerasa codificada por la SEQ ID NO:2;

10 c. la Glucosa-1-fosfato timidililtransferasa comprende una secuencia de aminoácido que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una Glucosa-1-fosfato timidililtransferasa codificada por la SEQ ID NO:3;

15 d. la dTDP-4-deshidroramnosa 3,5-epimerasa comprende una secuencia de aminoácido que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una dTDP-4-deshidroramnosa 3,5-epimerasa codificada por la SEQ ID NO:4;

e. la flipasa del antígeno O comprende una secuencia de aminoácido que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una Flipasa del antígeno O codificada por la SEQ ID NO:5;

20 f. la ramnosil transferasa de (xi) comprende una secuencia de aminoácido que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una ramnosil transferasa codificada por la SEQ ID NO: 6;

25 g. la glucosiltransferasa de (xii) comprende una secuencia de aminoácido que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una glucosiltransferasa codificada por la SEQ ID NO:7;

h. la Polimerasa de antígeno O comprende una secuencia de aminoácido que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una Polimerasa de antígeno O codificada por la SEQ ID NO:8;

i. la O-acetil transferasa comprende una secuencia de aminoácido que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una O-acetil

transferasa codificada por la SEQ ID NO: 9;

j. la glucosiltransferasa de (x) comprende una secuencia de aminoácido que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una glucosiltransferasa codificada por la SEQ ID NO: 10: y

5 k. la ramnosiltransferasa de (xi) comprende una secuencia de aminoácido que es al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una ramnosiltransferasa codificada por la SEQ ID NO: 11.

5. La célula hospedera de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la célula hospedera es *Escherichia coli*.

10 6. La célula hospedera de la reivindicación 5, en donde al menos uno del gen *waaL*, gen *gtrA*, gen *gtrB*, gen *gtrS*, y grupo *rfb* es suprimido o funcionalmente inactivado a partir del genoma de la célula hospedera.

7. La célula hospedera de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la proteína portadora se selecciona a partir del grupo que consiste de Exotoxina A destoxificada de *P. aeruginosa* (EPA), CRM197, proteína de unión a maltosa (MBP), Difteria toxoide, Tétanos toxoide, hemolisina A destoxificada de *S. aureus*, factor aglutinante A, factor aglutinante B, FimH de *E. coli*, FimHC de *E. coli*, enterotoxina lábil al calor de *E. coli*, variantes destoxificadas de enterotoxina lábil al calor de *E. coli*, subunidad B de toxina del cólera (CTB), toxina del cólera, variantes destoxificadas de toxina del cólera, proteína Sat de *E. coli*, el dominio pasajero de la proteína Sat de *E. coli*, neumolisina de *Streptococcus pneumoniae* y variantes destoxificadas de los mismos, AcrA de *C. jejuni* y glicoproteínas naturales de *C. jejuni*.

15 20

8. La célula hospedera de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la proteína portadora comprende una secuencia consenso de N-glicosilación optimizada, Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID NO: 15).

25

9. La célula hospedera de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la proteína portadora comprende una o más secuencias consenso recombinantemente introducidas.

10. La célula hospedera de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la proteína portadora comprende una secuencia señal para dirigir la proteína portadora en el espacio periplásmico de la célula hospedera.

11. La célula hospedera de la reivindicación 10, en donde la

secuencia señal se selecciona a partir del grupo que consiste de la secuencia
señal de DsbA de *E. coli*, porina A de membrana externa de *E. coli* (OmpA),
proteína de unión a maltosa de *E. coli* (MalE), pectato liasa de *Erwinia*
*carotovora*s (PelB), endoxilansa de Flgl, NikA, o Bacillus sp. (XynA), enterotoxina
de *E. coli* lábil al calor LTIIb, endoxilansa de bacillus XynA, o flagelina de *E. coli*
(Flgl).

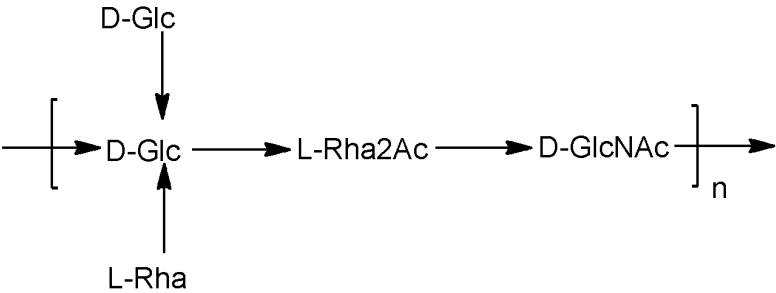
12. Un método para hacer una proteína portadora N-glicosilada, tal
método comprende:

a. cultivar la célula hospedera de cualquiera de las reivindicaciones 1
a 11; y

b. purificar la proteína portadora N-glicosilada.

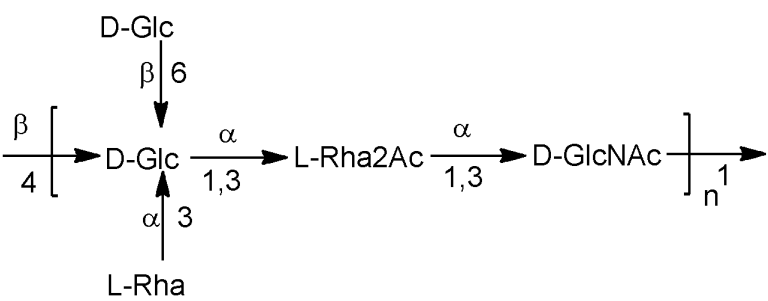
13. Una proteína portadora N-glicosilada producida por el método de
la reivindicación 12.

14. La proteína portadora N-glicosilada de la reivindicación 13 que
comprende un compuesto de Fórmula O25B:



en donde n es un número entero entre 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10,
1 a 5, 10 a 30, 15 a 30, 20 a 30, 25 a 30, 5 a 25, 10 a 25, 15 a 25, 20 a 25, 10 a
20, o 15 a 20.

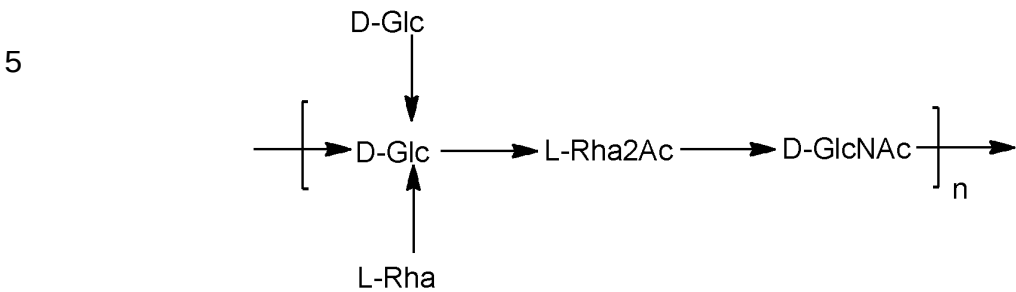
15. La proteína portadora N-glicosilada de la reivindicación 13 que
comprende un compuesto de Fórmula O25B':



en donde n es un número entero entre 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10,
1 a 5, 10 a 30, 15 a 30, 20 a 30, 25 a 30, 5 a 25, 10 a 25, 15 a 25, 20 a 25, 10 a
20, o 15 a 20.

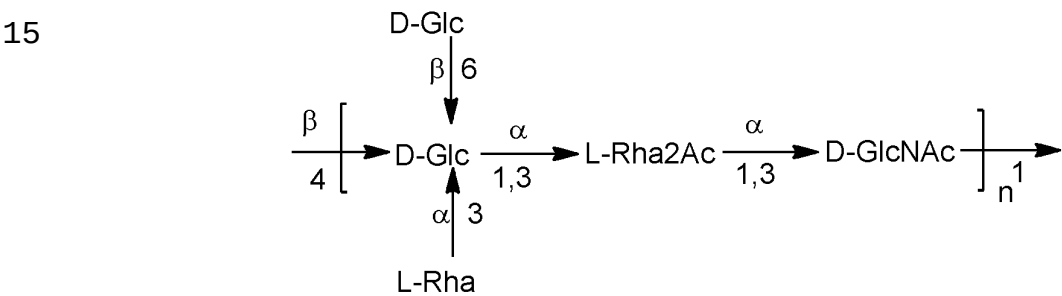
16. Un antígeno O aislado de una cepa de O25B tal como upec138,
upec163, o upec177.

17. Una proteína portadora N-ligada al antígeno O de la reivindicación 15.
18. Una población de macromoléculas aisladas que comprende una estructura de Fórmula O25B:



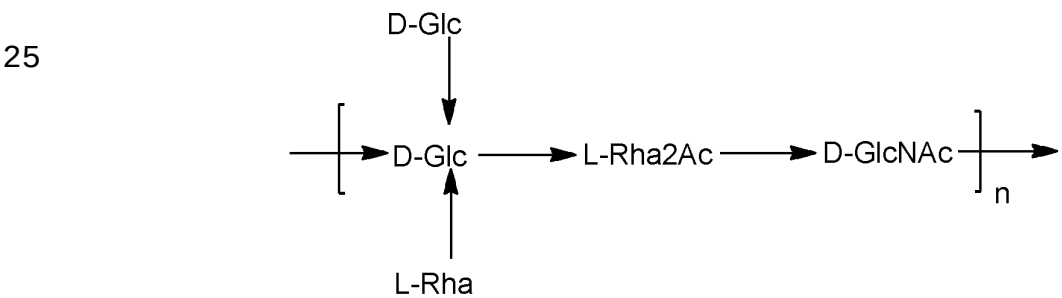
10 en donde n es un número entero entre 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 10 a 30, 15 a 30, 20 a 30, 25 a 30, 5 a 25, 10 a 25, 15 a 25, 20 a 25, 10 a 20, o 15 a 20.

19. Una población de macromoléculas aisladas que comprende una estructura de Fórmula O25B':



20 en donde n es un número entero entre 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 10 a 30, 15 a 30, 20 a 30, 25 a 30, 5 a 25, 10 a 25, 15 a 25, 20 a 25, 10 a 20, o 15 a 20.

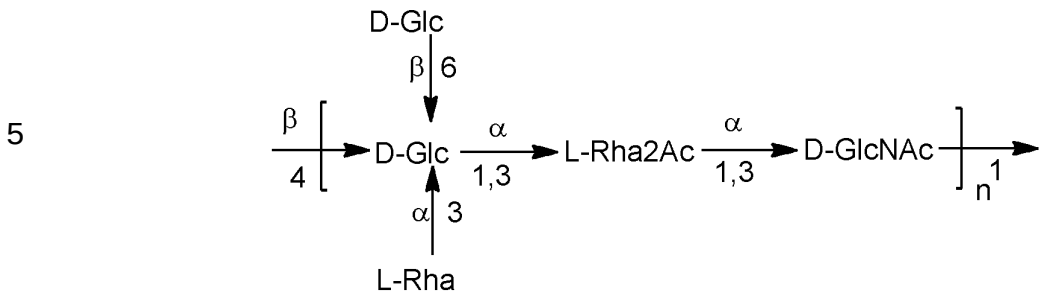
20. Una composición farmacéutica que comprende una macromolécula que comprende una estructura de Fórmula O25B:



en donde n es un número entero entre 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 10 a 30, 15 a 30, 20 a 30, 25 a 30, 5 a 25, 10 a 25, 15 a 25, 20 a 25, 10 a

20, o 15 a 20.

21. Una composición farmacéutica que comprende una macromolécula que comprende una estructura de Fórmula O25B':



10 en donde n es un número entero entre 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 10 a 30, 15 a 30, 20 a 30, 25 a 30, 5 a 25, 10 a 25, 15 a 25, 20 a 25, 10 a 20, o 15 a 20.

22. La composición farmacéutica de la reivindicación 20, en donde la estructura de Fórmula O25B está covalentemente unida a un residuo Asn en una proteína portadora.

15 23. La composición farmacéutica de la reivindicación 21, en donde la estructura de Fórmula O25B' está covalentemente unida a un residuo Asn en una proteína portadora.

24. La composición farmacéutica de la reivindicación 20 o 21, en donde el residuo Asn está posicionado en una secuencia consenso Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (SEQ ID NO: 14).

20 25. La célula hospedera procariótica de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde tal oligosacaril transferasa es heteróloga a la célula hospedera.

26. La célula hospedera procariótica de 1-11, en donde tal oligosacaril transferasa es la oligosacaril transferasa de *C. jejuni*, *pglB*.

25 27. La célula hospedera procariótica de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde tal proteína portadora es heteróloga a la célula hospedera.

28. La célula hospedera procariótica de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, 25, 26, o 27, en donde tal proteína portadora no es una proteína de *E. coli*.

29. Un método para generar un oligosacárido que comprende un L-Rha(2Ac), que comprende incubar un sacárido u oligosacárido con una ramnosil transferasa que comprende la SEQ ID NO: 11, en donde el sacárido u oligosacárido comprende un D-GlcNAc terminal.

30. El método de la reivindicación 29, en donde el L-Rha(2Ac) y D-GlcNAc están ligados mediante un enlace alfa-1,3.

31. El método de la reivindicación 29, en donde tal incubación ocurre *in vitro*.

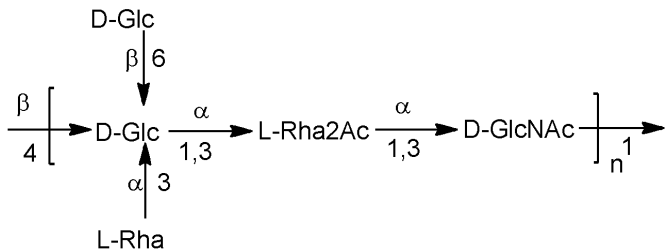
32. El método de la reivindicación 29, en donde tal oligosacárido es generado en una célula hospedera que expresa recombinantemente una ramnosil transferasa que comprende la SEQ ID NO: 11.

Modalidades 2:

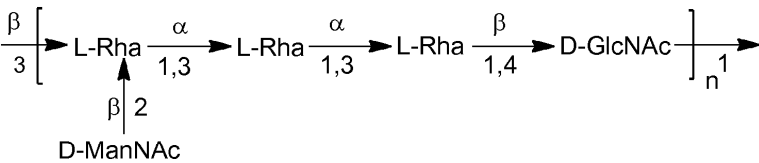
1. Una composición que comprende (i) un bioconjugado de O25B, que comprende un antígeno de O25B de *e. coli* covalentemente unido a un residuo Asn de una proteína portadora, (ii) un bioconjugado de O1, que comprende un antígeno O1A de *E. coli* covalentemente unido a un residuo Asn de una proteína portadora, (iii) un bioconjugado de O2, que comprende un antígeno de O2 de *E. coli* covalentemente unido a un residuo Asn de una proteína portadora, y (iv) un bioconjugado de O6, que comprende un antígeno O6 de *E. coli* covalentemente unido a un residuo Asn de una proteína portadora.

2. La composición de la reivindicación 1, en donde el antígeno O25B, antígeno O1A, antígeno O6, y antígeno O2 comprenden las siguientes fórmulas, respectivamente:

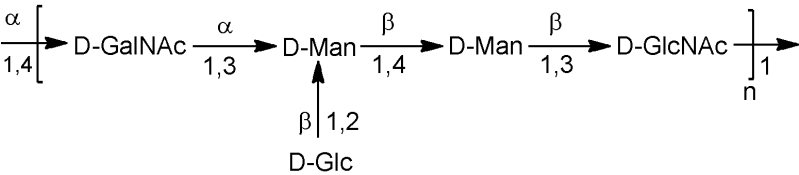
a. Fórmula O25B'



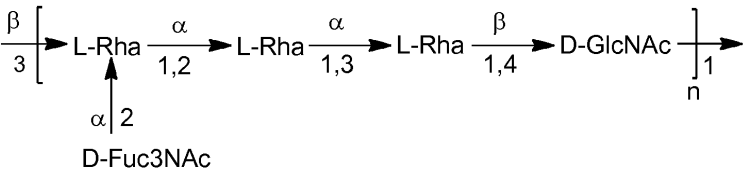
b. Fórmula O1A'



c. Fórmula O6Glc'



d. Fórmula O2'



3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en donde la proteína portadora se selecciona a partir del grupo que consiste de Exotoxina A destoxificada de *P. aeruginosa* (EPA), CRM197, proteína de unión a maltosa (MBP), Difteria toxoide, Tétanos toxoide, hemolisina A destoxificada de *S. aureus*, factor aglutinante A, factor aglutinante B, FimH de *E. coli*, FimHC de *E. coli*,
5 enterotoxina lábil al calor de *E. coli*, variantes destoxificadas de enterotoxina lábil al calor de *E. coli*, subunidad B de toxina del cólera (CTB), toxina del cólera, variantes destoxificadas de toxina del cólera, proteína Sat de *E. coli*, el dominio pasajero de la proteína Sat de *E. coli*, neumolisina de *Streptococcus pneumoniae* y variantes destoxificadas de los mismos, AcrA de *C. jejuni* y glicoproteínas naturales de *C. jejuni*.
- 10 4. La composición de la reivindicación 3, en donde la proteína portadora es EPA, CRM197, o MBP destoxificada.
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el residuo Asn de la proteína portadora está posicionado en la secuencia consenso Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z son seleccionados independientemente a partir de cualquier aminoácido natural excepto Pro (SEQ ID
15 NO: 15).
6. Un método para tratar una infección de un sujeto con *Escherichia coli* patogénica extra-intestinal, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
7. Un método para prevenir una infección de un sujeto con
20 *Escherichia coli* patogénica extra-intestinal, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
8. Un método para inducir una respuesta inmune en un sujeto contra *Escherichia coli* patogénica extra-intestinal, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de la composición de cualquiera de las
25 reivindicaciones 1-5.
9. Un método para inducir la producción de anticuerpos opsonofagocíticos en un sujeto, que son específicos para *Escherichia coli* patogénica extra-intestinal, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
10. El método de la reivindicación 6, 8, o 9, en donde el sujeto ha sido diagnosticado con una infección del tracto urinario.
11. El método de la reivindicación 7, 8, o 9, en donde el sujeto está

en riesgo de desarrollar una infección del tracto urinario.

12. El método de la reivindicación 6, 8, o 9, en donde el sujeto ha sido diagnosticado con bacteremia.

13. El método de la reivindicación 7, 8, o 9, en donde el sujeto está en riesgo de desarrollar bacteremia.

5 14. El método de la reivindicación 6, 8, o 9, en donde el sujeto ha sido diagnosticado con sepsis.

15. El método de la reivindicación 7, 8, o 9, en donde el sujeto está en riesgo de desarrollar sepsis.

16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6-16, en donde el sujeto es un humano.

10

15

20

25