

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 000**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/52** (2006.01)

**C12N 15/70** (2006.01)

**C12N 1/21** (2006.01)

**C07K 14/21** (2006.01)

**A61K 39/104** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.10.2014 PCT/EP2014/071898**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2015 WO15158403**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2014 E 14784210 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020 EP 3131577**

54 Título: **Células huésped modificadas y usos de las mismas**

30 Prioridad:

**17.04.2014 US 201461980988 P**

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

**10.02.2021**

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)  
Rue de l'Institut 89  
1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

**KOWARIK, MICHAEL;  
KEMMLER, STEFAN J.;  
QUÉBATTE, JULIEN L. y  
FERON, CHRISTIANE MARIE-PAULE SIMONE  
JEANNE**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 805 000 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Células huéspedes modificadas y usos de las mismas

**1. Introducción**

5 Se describen aquí células huéspedes modificadas útiles en la producción de bioconjugados que se pueden usar para vacunar sujetos contra la infección con *Pseudomonas*. Los genomas de las células huéspedes modificadas descritas en la presente comprenden genes que codifican proteínas implicadas en la glicosilación de proteínas y también genes específicos para la producción de antígenos específicos de *Pseudomonas*.

**2. Antecedentes**

10 La enfermedad causada por infección con cepas de *Pseudomonas* (p. ej., *P. aeruginosa*) representa una seria amenaza mundial. Aunque está en marcha el desarrollo de vacunas contra tal infección, persiste una gran necesidad de vacunas eficaces contra la infección de *Pseudomonas* que puedan ser producidas con seguridad en altas cantidades. Las referencias relevantes incluyen los documentos WO 09/104074, WO 06/119987, WO 11/062615, WO 13/034664, WO 14/037585, WO 11/138361, Ihssen y col., Production of glycoprotein vaccines in Escherichia coli Microbial Cell Factories Vol 9 página 61 (2010), Raymond y col., J. Bacteriology 184, 3614-3622 (2002), Belanger y col., Microbiology, 1 de diciembre de 1999, páginas 3505-3521, Dean et al J. Bacteriology 15 de julio de 1999 página 15 4275-4284, Knirel Yuriy A y col., J. Endotoxin Research vol 12, páginas 324-336 (2006), Wacker M y col., J. Infect. Dis. 209; 1551-1561 (2014), WO 14/072405 y WO 14/057109, Munir Al-Zeer y col., World Journal of Microbiology and Biotechnology 23; 1541-1549 (2007) y Coin D y col., FEMS Microbiology Letters 76; 185-192 (1991).

**3. Breve descripción de la invención**

20 La invención proporciona una célula huésped que comprende:

(i) un ácido nucleico que codifica una glicosiltransferasa derivada de un racimo *rfb* de *Pseudomonas*;

(ii) un ácido nucleico que codifica una enzima formiltransferasa, en donde dicho ácido nucleico codifica una proteína que tiene aproximadamente, o por lo menos, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad u homología con la SEQ ID NO: 2, o en donde dicho ácido nucleico codifica la SEQ ID NO: 2;

25 (ii) un ácido nucleico que codifica una oligosacaryltransferasa; y

(iii) un ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso de N-glicosilación D/E-X-N-X-S/T, en donde X es cualquier aminoácido excepto prolina.

30 En un aspecto, se provee aquí una célula huésped procariota modificada que comprende ácidos nucleicos que codifican enzimas capaces de producir un bioconjugado que comprende un antígeno de *Pseudomonas*. Tales células huéspedes pueden expresar naturalmente ácidos nucleicos específicos para la producción de un antígeno de *Pseudomonas*, o se puede hacer que las células huéspedes expresen tales ácidos nucleicos, esto es, en ciertas realizaciones, dichos ácidos nucleicos son heterólogos para las células huéspedes. En ciertas realizaciones, uno o más de dichos ácidos nucleicos específicos para la producción de un antígeno de *Pseudomonas* son heterólogos para la célula huésped y se integran en el genoma de la célula huésped. En ciertas realizaciones, las células huéspedes provistas en la presente comprenden ácidos nucleicos que codifican enzimas adicionales activas en la N-glicosilación de proteínas; por ejemplo, las células huéspedes aquí provistas también comprenden un ácido nucleico que codifica una oligosacaryltransferasa y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican otras glicosiltransferasas. En ciertas realizaciones, las células huéspedes aquí provistas comprenden un ácido nucleico que codifica una proteína portadora, por ejemplo una proteína a la que se le pueden añadir oligosacáridos y/o polisacáridos para formar un bioconjugado. 40 En una realización específica, la célula huésped es *E. coli*.

45 En una realización específica, se provee aquí una célula huésped procariota modificada que comprende ácidos nucleicos que codifican enzimas capaces de producir un bioconjugado que comprende un antígeno de *Pseudomonas*, en donde dicha célula huésped comprende un racimo *rfb* de *Pseudomonas* o una glicosiltransferasa derivada de un racimo *rfb* de *Pseudomonas*. En una realización específica, dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas* o glicosiltransferasa derivada de un racimo *rfb* de *Pseudomonas* se integra en el genoma de dicha célula huésped. En otra realización específica, dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas* o glicosiltransferasa derivada de un racimo *rfb* de *Pseudomonas* es un racimo *rfb* o glicosiltransferasa de *Pseudomonas aeruginosa*; véase Raymond *et al.*, *J Bacteriol.*, 2002 184 (13): 3614-22. En una realización específica, dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* es el racimo *rfb* de uno cualquiera de los serotipos O1-O20. En otra realización específica, dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* es el racimo *rfb* de uno cualquiera de los serotipos descritos por Knirel y col., 2006, *Journal of Endotoxin Research* 12 (6): 324-336. 50 En una realización específica, dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* es el racimo *rfb* del serotipo O2, O5, O6, O11, O15, O16. En una realización específica, dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* es el racimo *rfb* del serotipo O6. En una realización específica, dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* es el racimo *rfb* del serotipo O11. En otra realización específica, dicha célula huésped comprende un ácido nucleico que codifica una oligosacaryltransferasa (p. ej., *pglB* de *Campylobacter jejuni*). En otra realización específica, dicho ácido nucleico que 55

codifica una oligosacriltransferasa (p. ej., *pglB* de *Campylobacter jejuni*) se integra en el genoma de la célula huésped. En una realización específica, dicha célula huésped comprende un ácido nucleico que codifica una proteína portadora. En otra realización específica, la célula huésped es *E. coli*.

5 En ciertas realizaciones de la divulgación, dicha célula huésped procariota modificada que comprende ácidos nucleicos que codifican enzimas capaces de producir un bioconjugado- que comprende un antígeno de *Pseudomonas*, comprende además una o más enzimas accesorias que incluyen enzimas de ramificación, modificación, amidación, regulación de la longitud de cadena, acetilación, formilación, polimerización. En una realización específica, dichas enzimas accesorias son heterólogas para la célula huésped. En una realización específica, dichas una o más enzimas accesorias se insertan en el genoma de la célula huésped procariota modificada además del racimo *rfb*. En una  
10 realización específica, dichas una o más enzimas accesorias derivan de *Pseudomonas*, por ejemplo *P. aeruginosa*.

En una realización específica de la divulgación, la célula huésped procariota modificada aquí provista comprende un ácido nucleico que codifica una formiltransferasa. En otra realización específica, dicha formiltransferasa es la formiltransferasa presentada en la SEQ ID NO: 2, o un homólogo de la misma. En otra realización específica, dicha formiltransferasa se incorpora (p. ej., se inserta en el genoma de, o el plásmido expresado por) en dicha célula huésped como parte de un racimo *rfb* de *Pseudomonas*, en donde dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas* ha sido modificado para comprender la formiltransferasa. En otra realización específica, dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas* es un racimo *rfb* de  
15 *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6.

En otra realización específica de la divulgación, la célula huésped procariota modificada aquí provista comprende un ácido nucleico que codifica una polimerasa *wzy*. En otra realización específica, dicha polimerasa *wzy* es la polimerasa *wzy* presentada en la SEQ ID NO: 3, o un homólogo de la misma. En otra realización específica, dicha polimerasa *wzy* se incorpora (p. ej., se inserta en el genoma de, o el plásmido expresado por) en dicha célula huésped como parte de un racimo *rfb* de *Pseudomonas*, en donde dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas* ha sido modificado para comprender la polimerasa *wzy*. En otra realización específica, dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas* es un racimo *rfb* de *Pseudomonas*  
20 *aeruginosa* del serotipo O6.

En otra realización específica de la divulgación, la célula huésped procariota modificada aquí provista comprende: (i) un ácido nucleico que codifica una formiltransferasa, y (ii) un ácido nucleico que codifica una polimerasa *wzy*. En una realización específica, dicha formiltransferasa es la formiltransferasa presentada en la SEQ ID NO: 2, o un homólogo de la misma. En otra realización específica, dicha polimerasa *wzy* es la polimerasa *wzy* presentada en la SEQ ID NO: 3, o un homólogo de la misma. En una realización específica, dicha formiltransferasa y dicha polimerasa *wzy* se incorporan (p. ej., se insertan en el genoma de, o el plásmido expresado por) en dicha célula huésped como parte de un racimo *rfb* de *Pseudomonas*, en donde dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas* ha sido modificado para comprender la formiltransferasa y polimerasa *wzy*. En otra realización específica, dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas* es un racimo *rfb* de *Pseudomonas*  
25 *aeruginosa* del serotipo O6.

En otro aspecto de la divulgación, se provee aquí una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica un racimo *rfb* de *Pseudomonas* modificado, por ejemplo, el racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6, en donde dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas* modificado comprende: (i) un gen que codifica una formiltransferasa (p. ej., un gen que codifica la SEQ ID NO: 2 o un homólogo de la misma), (ii) un gen que codifica una polimerasa *wzy* (p. ej., un gen que codifica la SEQ ID NO: 3 o un homólogo de la misma); o (iii) un gen que codifica una formiltransferasa (p. ej., un gen que codifica la SEQ ID NO: 2 o un homólogo de la misma) y un gen que codifica una polimerasa *wzy* (p. ej., un gen que codifica la SEQ ID NO: 3 o un homólogo de la misma).  
30

Los ácidos nucleicos que codifican formiltransferasas y los ácidos nucleicos que codifican polimerasas *wzy*, que se usan para generar racimos *rfb* de *Pseudomonas* modificados, por ejemplo, racimos *rfb* modificados de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6, se pueden insertar en el racimo *rfb* en muchas posiciones y en muchas orientaciones.

En una realización específica de la divulgación, el gen que codifica dicha formiltransferasa y/o el gen que codifica dicha polimerasa *wzy* se insertan secuencia abajo de los genes del racimo *rfb* de *Pseudomonas*, por ejemplo del racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6. En una realización específica, el gen que codifica dicha formiltransferasa y/o el gen que codifica dicha polimerasa *wzy* se insertan secuencia abajo del gen *wbpM* del racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6.  
35

En una realización específica de la divulgación, el gen que codifica dicha formiltransferasa y/o el gen que codifica dicha polimerasa *wzy* se insertan secuencia arriba de los genes del racimo *rfb* de *Pseudomonas*, por ejemplo del racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6. En una realización específica de la divulgación, el gen que codifica dicha formiltransferasa y/o el gen que codifica dicha polimerasa *wzy* se insertan secuencia abajo del gen *wzz* del racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6.  
40

En una realización específica de la divulgación, el gen que codifica dicha formiltransferasa y/o el gen que codifica dicha polimerasa *wzy* se insertan en una orientación en el sentido de las manecillas del reloj con respecto a los genes del racimo *rfb* de *Pseudomonas*, por ejemplo del racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6.  
45

En una realización específica de la divulgación, el gen que codifica dicha formiltransferasa y/o el gen que codifica dicha polimerasa *wzy* se insertan en una orientación en el sentido contrario a las manecillas del reloj con respecto a

los genes del racimo *rfb* de *Pseudomonas*, por ejemplo del racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6.

Otro aspecto de la invención es un método de producción de un bioconjugado que comprende un antígeno de *Pseudomonas* enlazado con una proteína portadora, comprendiendo dicho método cultivar una célula huésped que comprende:

- 5 (iii) un ácido nucleico que codifica una glicosiltransferasa derivada de un racimo *rfb* de *Pseudomonas*;
- (ii) un ácido nucleico que codifica una enzima formiltransferasa, en donde dicho ácido nucleico codifica una proteína que tiene aproximadamente, o por lo menos, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad u homología con la SEQ ID NO: 2, o en donde dicho ácido nucleico codifica la SEQ ID NO: 2;
- 10 (iv) un ácido nucleico que codifica una oligosacariltransferasa; y
- (v) un ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso de N-glicosilación D/E-X-N-X-S/T, en donde X es cualquier aminoácido excepto prolina

bajo condiciones adecuadas para la producción de proteínas, y opcionalmente purificar la proteína portadora N-glicosilada. Los métodos para producir proteínas usando células huéspedes, por ejemplo *E. coli*, y aislar las proteínas producidas por las células huéspedes, son muy conocidos en la técnica.

- 15 En otro aspecto se proveen aquí bioconjugados producidos por las células huéspedes aquí provistas.

En una realización específica, se provee aquí un bioconjugado que comprende un antígeno de *Pseudomonas aeruginosa* de serotipo O6 conjugado con una proteína portadora a través del resto N de al menos una secuencia consenso de N-glicosilación D/E-X-N-X-S/T, en donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, en donde el antígeno O6 está formilado.

- 20 En otro aspecto de la divulgación, se proveen aquí composiciones, por ejemplo composiciones farmacéuticas, que comprenden uno o más de los bioconjugados aquí provistos.

En una realización específica de la divulgación, se provee aquí una composición, por ejemplo composición farmacéutica, que comprende un bioconjugado que comprende una proteína portadora enlazada con un antígeno de *Pseudomonas*. En una realización específica, dicho antígeno de *Pseudomonas* es un antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa*.

- 25 En otro aspecto de la divulgación, se proveen aquí métodos de prevención de una infección en un sujeto, por ejemplo un sujeto humano, por *Pseudomonas* (p. ej., *Pseudomonas aeruginosa*), que comprenden administrarle al sujeto una cantidad eficaz de una composición descrita en la presente.

- 30 En otro aspecto de la divulgación, se proveen aquí métodos de tratamiento de un sujeto, por ejemplo un sujeto humano, que ha sido infectado por *Pseudomonas* (p. ej., *Pseudomonas aeruginosa*), que comprenden administrarle al sujeto una cantidad eficaz de una composición descrita en la presente.

En otro aspecto de la divulgación, se proveen aquí métodos de inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto, por ejemplo un sujeto humano, contra *Pseudomonas* (p. ej., *Pseudomonas aeruginosa*), que comprenden administrarle al sujeto una cantidad eficaz de una composición descrita en la presente.

### 35 **3.1 Terminología**

OPS: polisacárido O; el antígeno O de las bacterias Gram negativas. OPS también es referido aquí como antígeno O.

LPS: lipopolisacárido.

Racimo *rfb*: un racimo de genes que codifican maquinaria enzimática capaz de sintetizar la estructura básica de un antígeno O.

- 40 *waaL*: el gen de 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 del lípido A, formando el lipopolisacárido.

RU: unidad de repetición. Como se usa aquí, la RU es igual que la unidad de repetición biológica, BRU. La BRU describe la RU de un antígeno O como es sintetizado éste *in vivo*.

- 45 Und-PP: undecaprenil pirofosfato.

LLO: oligosacárido enlazado a lípido.

Como se usa aquí, el término "bioconjugado" se refiere al conjugado entre una proteína (p. ej., una proteína portadora) y un antígeno, por ejemplo un antígeno de *Pseudomonas*, preparado en el fondo genético de una célula huésped, en donde la maquinaria de la célula huésped enlaza el antígeno a la proteína (p. ej., enlaces de N-).

- 50 El término "aproximadamente" usado en conjunto con un número, se refiere a cualquier número dentro de  $\pm 1$ ,  $\pm 5$  o

±10% del número referido.

Como se usa aquí, el término “cantidad eficaz”, en el contexto de la administración de una terapia (p. ej., una composición descrita en la presente) a un sujeto, se refiere a la cantidad de una terapia que tiene uno o más efectos profilácticos y/o terapéuticos. En ciertas realizaciones, una “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad de una terapia que es suficiente para obtener uno, dos, tres, cuatro o más de los efectos siguientes: (i) reducir o mitigar la severidad de una infección por *Pseudomonas* o un síntoma asociado con la misma; (ii) reducir la duración de una infección por *Pseudomonas* o síntoma asociado con la misma; (iii) prevenir la progresión de una infección por *Pseudomonas* o síntoma asociado con la misma; (iv) causar la regresión de una infección por *Pseudomonas* o síntoma asociado con la misma; (v) prevenir el desarrollo o inicio de una infección por *Pseudomonas*, o síntoma asociado con la misma; (vi) prevenir la recurrencia de una infección por *Pseudomonas* o síntoma asociado con la misma; (vii) reducir la falla de órganos asociada con una infección por *Pseudomonas*; (viii) reducir la hospitalización de un sujeto que tiene una infección por *Pseudomonas*; (ix) reducir el tiempo de hospitalización de un sujeto que tiene una infección por *Pseudomonas*; (x) aumentar la supervivencia de un sujeto con una infección por *Pseudomonas*; (xi) eliminar una infección por *Pseudomonas* en un sujeto; (xii) inhibir o reducir la replicación de *Pseudomonas* en un sujeto; o (xiii) incrementar o mejorar el efecto profiláctico o terapéutico de otra terapia.

Como se usa aquí, 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 “combinación” no restringe el orden en el cual se le administran las terapias al sujeto. Por ejemplo, una primera terapia (p. ej., una composición descrita en la presente) se puede administrar antes de (p. ej., 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 subsiguientemente a (p. ej., 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 al sujeto.

Como se usa en la presente, el término “sujeto” se refiere a un animal (p. ej., aves, reptiles y mamíferos). En otra realización, el sujeto es un mamífero que incluye no primates (p. ej., un camello, asno, cebra, vaca, cerdo, caballo, cabra, oveja, gato, perro, rata y ratón) y primates (p. ej., un mono, chimpancé y un ser humano). En ciertas realizaciones, el sujeto es un animal no humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un animal de granja o mascota (p. ej., un perro, gato, caballo, cabra, oveja, cerdo, asno o pollo). En una realización específica, el sujeto es un ser humano. Los términos “sujeto” y “paciente” se pueden usar aquí intercambiamente.

#### 4. Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa un Western blot de extractos periplásmicos de células huéspedes modificadas que producen bioconjugados. Se indican las cepas que se describen en los ejemplos. “Int” se refiere a un componente integrado. “\*” se refiere a la integración usando una estrategia mediada por transposón.

La figura 2 representa la estructura de la unidad de repetición del antígeno O O6 de *Pseudomonas aeruginosa*. \* indica las posiciones que pueden variar en su composición química de acuerdo con la identidad del subserotipo. Se introduce variabilidad por la actividad de amidasas que convierten las funciones ácidas de los restos GalNAcA en C6 en amida, dando como resultado GalNAcAN (o GalNFMa a GalNFMAN; un grupo acetilo sustituye el C3 del resto GalNAcAN\* en algunos subserotipos). Los genes para la polimerización de la unidad de repetición (wzy), acetilación, formilación y amidación de uno de los restos GalNX son desconocidos. L-Rha, L-ramnosa; D-GalNAcAN, ácido 6-amido-2-N-acetil-D-galactosaminurónico; D-GalNFMAN, 2-N-formil-D-galactosaminurónico; D-QuiNAc, N-acetil-D-quinosa.

Figura 3. Análisis funcional de formiltransferasa de O6 de *Pseudomonas aeruginosa*. 3A: Detección por Western blot de la unidad de repetición O6 simple formilada unida al núcleo del lípido A. La *E. coli* W3110  $\Delta$ wec se transformó con un cósmido que codifica el racimo rfbO6 (incompleto) y un plásmido de expresión que codifica la formiltransferasa de O6 (*fmtO6*; SEQ NO: 2). Los extractos celulares se cosecharon después de inducción nocturna durante crecimiento a 37° C en medio LB, se sometieron a digestión con proteinasa K, se separaron por SDS-PAGE y se electrotransfirieron sobre membranas de nitrocelulosa. La inmunodetección con un antisuero específico de O6 indujo una señal en presencia de *fmtO6*, pero no en el vector de control vacío. Este resultado indica enfáticamente que la formilación es un antígeno relevante sobre las células de *P. aeruginosa* y un prerrequisito para la detección usando este antisuero. 3B: Confirmación de la formilación en una unidad de repetición O6 simple liberada del undecaprenilpirofosfato. La *E. coli* W3110  $\Delta$ wec  $\Delta$ waaL se transformó con los mismos plásmidos anteriores y se desarrolló en matraces agitados para producir unidades de repetición simples del antígeno O, O6 (la polimerasa wzy está ausente en estas cepas) y se analizaron los glicolípidos. En resumen, las unidades de repetición se extrajeron como glicolípidos de las células desecadas, se purificaron por afinidad en cartuchos C18, se hidrolizaron (para eliminar el undecaprenilpirofosfato de las unidades de repetición del antígeno O, O6), se marcaron con 2-aminobenzamida usando aminación reductiva y se analizaron por HPLC de fase normal. La coexpresión de *fmtO6* produjo una señal adicional en el tiempo de elución 61 min, que contiene oligosacáridos que corresponden a la unidad de repetición O6 formilada marcada, mientras que en ausencia del gen, la señal principal se encontró a 58 min y contenía la unidad de repetición O6 N-acetilada marcada.

Figura 4. Análisis funcional de la polimerasa *wzy* candidata de O6 de *P. aeruginosa*. Células de *E. coli* W3110  $\Delta$ wec que contenían un cósmido que codifica el racimo *rfb* (incompleto) (que carece de los genes *fmtO6* y *wzy*) se transformó con plásmidos que codifican el gen candidato de *fmtO6* y *wzy* PAK\_01823 (SEQ ID NO: 3) o vectores vacíos correspondientes. Los extractos celulares se trataron con proteinasa K y los LPS se analizaron por inmunodetección después de SDS-PAGE y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa.

Figura 5. Clonación del racimo de expresión del antígeno O artificial O6 de *Pseudomonas aeruginosa*. En primer lugar, el racimo *rfb* de la cepa stGVXN4017 de *P. aeruginosa* O6 (cepa "PAK" de *Pseudomonas aeruginosa* O6) se clonó en un vector cosmídico por medio de clonación de PCR usando las técnicas estándar. Búsquedas de homología apoyadas por bioinformática identificaron la formiltransferasa (FT) y polimerasa del antígeno O (*wzy*), que subsecuentemente se insertaron secuencia abajo del racimo *rfb* paso por paso. Los racimos de genes resultantes son capaces de efectuar la biosíntesis completa de la unidad de repetición del antígeno O de *P. aeruginosa* O6 (*rfbO6+*, sin polímero) y biosíntesis de polisacárido (*rfbO6++*, en el que está incluido *wzy*) en los derivados de *E. coli* W3110.

La figura 6 representa un Western blot de extractos periplásmicos de células huésped modificadas que producen bioconjugados. Se indican las cepas descritas en los ejemplos. 6A: Resultados para la cepa de *E. coli* "St7343" modificada para comprender *pglB* integrado y racimo *rfb* integrado de O6 de *P. aeruginosa*. 6B: Resultados para la cepa de *E. coli* "St7209" modificada para comprender *pglB* llevado por plásmido y racimo *rfb* integrado de O6 de *P. aeruginosa*. 6C: Resultados para la cepa de *E. coli* "St2182" modificada para comprender *pglB* llevado por plásmido y racimo *rfb* llevado por plásmido de O6 de *P. aeruginosa*.

Figura 7. Glicoconjugado EPA-O6 purificado. El EPA-O6 se purificó del extracto periplásmico de células huésped modificadas usando cromatografía de afinidad de quelato de metal, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de exclusión de tamaño (SEC). El eluato de la SEC final se caracterizó por SDS-PAGE seguido por tinción con azul de Coomassie o Western blot usando los anticuerpos indicados.

Figura 8. Retención de plásmido (PR) de los sistemas de plásmido 1 y 3 en presencia y ausencia de presión de selección de antibiótico. La PR se expresa en % de células que contienen el plásmido respectivo. Las figuras A y B muestran la PR del EPA-plásmido (kanamicina, negro) en células huésped modificadas con el racimo *rfb* integrado y *pglB* en presencia (figura 8A) y ausencia (figura 8B) de kanamicina. Las figuras C y D muestran la PR del EPA-plásmido (kanamicina, negro), *pglB*-Plásmido (espectinomomicina, blanco) y plásmido del racimo *rfb* (tetraciclina, en puntos) en células huésped modificadas en presencia (C) y ausencia (D) de los tres antibióticos. El porcentaje de células en las que son retenidos los tres plásmidos se muestra en color gris. I = Inóculo; U = células no inducidas; I4 = células 6 horas después de inducción; I6 = células después de inducción nocturna.

Figura 9. Actividad biológica de antisuero anti-O6 inducido por vacuna. 9A: Títulos de punto medio de ELISA de suero reunido de ratones de diferentes grupos de vacunación después de la tercera inyección. Sin ady = sin adyuvante, O/W: indica el adyuvante usado, un adyuvante de emulsión aceite en agua. O/W solo es un grupo de control que no contiene glicoconjugado. B: Se indican títulos de punto medio de destrucción opsonofagocítica (que inducen un 50% de reducción en UFC en comparación con el control). Los grupos pII y pIII son el suero reunido cosechado después de la segunda y tercera inyección.

## 5. Descripción detallada

### 5.1 Células huésped

Se proveen aquí células huésped, por ejemplo células huésped procariontas capaces de producir bioconjugados que comprenden un antígeno de *Pseudomonas* enlazado a una proteína portadora. Las células huésped aquí descritas comprenden un genoma en el cual se han insertado una o más secuencias de ADN, en donde dichas secuencias de ADN codifican una proteína o comprenden un operón implicado en la glicosilación de proteínas, por ejemplo N-glicosilación de proteínas. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, una célula huésped descrita en la presente comprende un genoma en el cual se ha insertado uno o más de lo siguiente: ADN que codifica una oligosacaryltransferasa, ADN que codifica una glicosiltransferasa, ADN que codifica una proteína portadora, ADN que comprende un racimo de genes *rfb*, ADN que comprende un racimo de genes de polisacárido capsular, ADN que codifica una flipasa, ADN que codifica una epimerasa, ADN que codifica una proteína asociada con un racimo de genes de polisacárido capsular, ADN que codifica una proteína implicada en el ensamble de polisacárido capsular, ADN que codifica una proteína implicada en el ensamble del antígeno O, ADN que codifica una proteína implicada en el ensamble de lipopolisacárido, o ADN que codifica una proteína implicada en el ensamble de lipooligosacárido. En una realización específica, la célula huésped es *E. coli*.

#### Células huésped que producen bioconjugados de *Pseudomonas*

En otro aspecto, se provee aquí una célula huésped procarionta modificada que comprende ácidos nucleicos que codifican enzimas capaces de producir un bioconjugado que comprende un antígeno de *Pseudomonas*. Tales células huésped pueden expresar naturalmente ácidos nucleicos específicos para la producción de un antígeno de *Pseudomonas*, o se puede hacer que las células huésped expresen tales ácidos nucleicos, es decir, en ciertas realizaciones dichos ácidos nucleicos son heterólogos para las células huésped. En ciertas realizaciones, uno o

más de dichos ácidos nucleicos específicos para la producción de un antígeno de *Pseudomonas* son heterólogos para la célula huésped y se integran en el genoma de la célula huésped. En ciertas realizaciones, las células huéspedes aquí provistas comprenden ácidos nucleicos que codifican enzimas adicionales activas en la N-glicosilación de proteínas; por ejemplo, las células huéspedes aquí provistas comprenden, además, un ácido nucleico que codifica una oligosacaryltransferasa y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican otras glicosiltransferasas. En ciertas realizaciones, las células huéspedes aquí provistas comprenden un ácido nucleico que codifica una proteína portadora, por ejemplo, una proteína a la que se le pueden pegar oligosacáridos o polisacáridos para formar un bioconjugado. En una realización específica, la célula huésped es *E. coli*.

En una realización específica, se provee aquí una célula huésped procariota modificada que comprende ácidos nucleicos que codifican enzimas capaces de producir un bioconjugado que comprende un antígeno de *Pseudomonas*, en donde dicha célula huésped comprende un racimo *rfb* de *Pseudomonas* o una glicosiltransferasa derivada de un racimo *rfb* de *Pseudomonas*. En una realización específica, dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas* o glicosiltransferasa derivada de un racimo *rfb* de *Pseudomonas* se integra en el genoma de dicha célula huésped. En otra realización específica, dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas* o glicosiltransferasa derivada de un racimo *rfb* de *Pseudomonas* es un racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa*. En otra realización específica, dicha célula huésped comprende un ácido nucleico que codifica una oligosacaryltransferasa (p. ej., *pglB* de *Campylobacter jejuni*). En otra realización específica, dicho ácido nucleico que codifica una oligosacaryltransferasa (p. ej., *pglB* de *Campylobacter jejuni*) se integra en el genoma de la célula huésped. En una realización específica, dicha célula huésped comprende un ácido nucleico que codifica una proteína portadora. En otra realización específica, la célula huésped es *E. coli*.

En otra realización específica, se provee aquí una célula huésped procariota modificada que comprende: (i) un racimo *rfb* de *Pseudomonas*, en donde dicho racimo *rfb* se integra en el genoma de dicha célula huésped; (ii) un ácido nucleico que codifica una oligosacaryltransferasa (p. ej., *pglB* de *Campylobacter jejuni*), en donde dicho ácido nucleico que codifica una oligosacaryltransferasa se integra en el genoma de la célula huésped; y (iii) una proteína portadora, en donde dicha proteína portadora es llevada por plásmido o se integra en el genoma de la célula huésped. En otra realización específica, dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas* es un racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa*. En otra realización específica, la célula huésped es *E. coli*.

En otra realización específica, se provee aquí una célula huésped procariota modificada que comprende: (i) una glicosiltransferasa derivada de un racimo *rfb* de *Pseudomonas*, en donde dicha glicosiltransferasa se integra en el genoma de dicha célula huésped; (ii) un ácido nucleico que codifica una oligosacaryltransferasa (p. ej., *pglB* de *Campylobacter jejuni*), en donde dicho ácido nucleico que codifica una oligosacaryltransferasa se integra en el genoma de la célula huésped; y (iii) una proteína portadora, en donde dicha proteína portadora es llevada por plásmido o se integra en el genoma de la célula huésped. En otra realización específica, dicha glicosiltransferasa derivada de un racimo *rfb* de *Pseudomonas* es un racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa*. En otra realización específica, la célula huésped es *E. coli*.

En una realización específica, el racimo *rfb* de *Pseudomonas* o glicosiltransferasa derivada de un racimo *rfb* de *Pseudomonas* es un racimo *rfb* o glicosiltransferasa de *Pseudomonas aeruginosa*. En otra realización específica, dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas* o glicosiltransferasa derivada de un racimo *rfb* de *Pseudomonas* es un racimo *rfb* o glicosiltransferasa de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O1, O2, O3, O4, O5, O6, O7, O8, O9, O10, O11, O12, O13, O14, O15, O16, O17, O18, O19 u O20. En otra realización específica, dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* es el racimo *rfb* de cualquiera de los serotipos descritos por Knirel y col., 2006, *Journal of Endotoxin Research* 12(6):324-336. En una realización específica, dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas* o glicosiltransferasa derivada de un racimo *rfb* de *Pseudomonas* es un racimo *rfb* o glicosiltransferasa de la cepa PAK de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6. En una realización específica, dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas* o glicosiltransferasa derivada de un racimo *rfb* de *Pseudomonas* es un racimo *rfb* o glicosiltransferasa de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O11, por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* cepa PA103 (véase, por ejemplo, N.º Acceso Genbank KF364633.1). En una realización específica, además de dicho racimo *rfb* de la cepa PAK de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6, se introducen (p. ej., por medio de plásmido o integración) genes que codifican una enzima formiltransferasa (GenBank: EOT23134.1; ID proteína NCBI: PAK\_01412; SEQ ID NO: 2) y una polimerasa wzy (GenBank: EOT19368.1; ID proteína NCBI: PAK\_01823; SEQ ID NO: 3), para extenderlo funcionalmente.

En una realización específica, la célula huésped procariota modificada aquí provista comprende un ácido nucleico que codifica una formiltransferasa. En otra realización específica, dicha formiltransferasa es la formiltransferasa presentada en la SEQ ID NO: 2, o un homólogo de la misma. En otra realización específica, dicha formiltransferasa se incorpora (p. ej., se inserta en el genoma de, o el plásmido expresado por) en dicha célula huésped como parte de un racimo *rfb* de *Pseudomonas*, en donde dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas* ha sido modificado para comprender la formiltransferasa. En otra realización específica, dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas* es un racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6.

En otra realización específica, la célula huésped procariota modificada aquí provista comprende un ácido nucleico que codifica una polimerasa wzy. En otra realización específica, dicha polimerasa wzy es la polimerasa wzy presentada en la SEQ ID NO: 3, o un homólogo de la misma. En otra realización específica, dicha polimerasa wzy se incorpora (p. ej., se inserta en el genoma de, o el plásmido expresado por) en dicha célula huésped como parte de un racimo *rfb* de *Pseudomonas*, en donde dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas* ha sido modificado para comprender la polimerasa

wzy. En otra realización específica, dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas* es un racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6.

5 En otra realización específica, la célula huésped procariota modificada aquí provista comprende: (i) un ácido nucleico que codifica una formiltransferasa, y (ii) un ácido nucleico que codifica una polimerasa wzy. En una realización específica, dicha formiltransferasa es la formiltransferasa presentada en la SEQ ID NO: 2, o un homólogo de la misma. En otra realización específica, dicha polimerasa wzy es la polimerasa wzy presentada en la SEQ ID NO: 3, o un homólogo de la misma. En una realización específica, dicha formiltransferasa y dicha polimerasa wzy se incorporan (p. ej., se insertan en el genoma de, o el plásmido expresado por) en dicha célula huésped como parte de un racimo *rfb* de *Pseudomonas*, en donde dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas* ha sido modificado para comprender la formiltransferasa y la polimerasa wzy. En otra realización específica, dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas* es un racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6.

Los ácidos nucleicos que codifican formiltransferasas y los ácidos nucleicos que codifican las polimerasas wzy que se usan para generar racimos *rfb* de *Pseudomonas* modificados, por ejemplo racimos *rfb* modificados de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6, se pueden insertar en el racimo *rfb* en muchas posiciones y en muchas orientaciones.

15 En una realización específica, el gen que codifica dicha formiltransferasa o el gen que codifica dicha polimerasa wzy se insertan secuencia abajo de los genes del racimo *rfb* de *Pseudomonas*, por ejemplo, el racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6. En una realización específica, el gen que codifica dicha formiltransferasa y/o el gen que codifica dicha polimerasa wzy se insertan secuencia abajo del gen *wbpM* del racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6.

20 En una realización específica, el gen que codifica dicha formiltransferasa y/o el gen que codifica dicha polimerasa wzy se insertan secuencia arriba de los genes del racimo *rfb* de *Pseudomonas*, por ejemplo el racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6. En una realización específica, el gen que codifica dicha formiltransferasa y/o el gen que codifica dicha polimerasa wzy se insertan secuencia abajo del gen *wzz* del racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6.

25 En una realización específica, el gen que codifica dicha formiltransferasa y/o el gen que codifica dicha polimerasa wzy se insertan en una orientación en el sentido de las manecillas del reloj con respecto a los genes del racimo *rfb* de *Pseudomonas*, por ejemplo el racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6.

30 En una realización específica, el gen que codifica dicha formiltransferasa y/o el gen que codifica dicha polimerasa wzy se insertan en una orientación en el sentido contrario de las manecillas del reloj con respecto a los genes del racimo *rfb* de *Pseudomonas*, por ejemplo el racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6.

35 En una realización específica, se provee aquí una célula huésped procariota modificada que comprende ácidos nucleicos que codifican enzimas capaces de producir un bioconjugado que comprende un antígeno O6 de *Pseudomonas*. En una realización específica, dicha célula huésped comprende el racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6, un ácido nucleico que codifica una polimerasa wzy y una formiltransferasa. En una realización específica, la polimerasa wzy es la polimerasa wzy de O6 de *P. aeruginosa* (SEQ ID NO: 3), o un homólogo de la misma (p. ej., la polimerasa wzy de la cepa PAK o LESB58 de *Pseudomonas aeruginosa*). En otra realización específica, la formiltransferasa es la formiltransferasa de O6 de *P. aeruginosa* (SEQ ID NO: 2), o un homólogo de la misma (p. ej., la formiltransferasa de la cepa PAK o LESB58 de *Pseudomonas aeruginosa*). En ciertas realizaciones, uno o más de los ácidos nucleicos que codifican el racimo *rfb*, la polimerasa wzy y/o la formiltransferasa, se insertan en el genoma de la célula huésped, por ejemplo, usando un método descrito en la presente. En una realización específica, cada uno de los ácidos nucleicos que codifica el racimo *rfb*, la polimerasa wzy y la formiltransferasa, se insertan en el genoma de la célula huésped, por ejemplo, usando un método descrito en la presente. En ciertas realizaciones, la célula huésped comprende, además, un ácido nucleico que codifica una oligosacaryltransferasa (p. ej., *pglB* de *Campylobacter jejuni*), en donde dicho ácido nucleico que codifica una oligosacaryltransferasa es llevado por plásmido o se integra en el genoma de la célula huésped; y un ácido nucleico que codifica una proteína portadora, en donde dicho ácido nucleico que codifica dicha proteína portadora es llevado por plásmido o se integra en el genoma de la célula huésped. En una realización específica, dicho ácido nucleico que codifica dicha oligosacaryltransferasa se integra en el genoma de la célula huésped.

#### Fondo genético

50 Las células huéspedes ejemplares que se pueden usar para generar las células huéspedes modificadas aquí descritas 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 realización específica, la célula huésped usada en la presente es *E. coli*.

En ciertas realizaciones, el fondo genético de la célula huésped se modifica, por ejemplo, por supresión de uno o más genes. Los genes ejemplares que pueden ser suprimidos en las células huéspedes (y en algunos casos, reemplazados con otras secuencias deseadas de ácido nucleico), incluyen los genes de las células huéspedes implicados en la

biosíntesis de glicolípido, tales como *waaL* (véase, por ejemplo, Feldman y col., 2005, *PNAS USA* 102: 3016-3021), el racimo del antígeno O (*rfb* o *wb*), el racimo del antígeno enterobacteriano común (*wec*), el racimo de la biosíntesis del núcleo del lípido A (*waa*), y racimos de modificación del antígeno O de profago como el racimo *gtrABS*. En una realización específica, las células huéspedes descritas en la presente se modifican de tal manera que no producen antígenos O aparte del antígeno O deseado, por ejemplo un antígeno O de *Pseudomonas*. En una realización específica, uno o más de: el gen *waaL*, gen *gtrA*, gen *gtrB*, gen *gtrS*, o uno o más genes del racimo *wec*, o uno o más genes del racimo de genes *rfb*, son suprimidos o desactivados funcionalmente del genoma de la célula huésped procarionota provista en la presente. En una realización, la célula huésped usada en la presente es *E. coli*, en donde el gen *waaL*, el gen *gtrA*, el gen *gtrB*, el gen *gtrS* están suprimidos o desactivados funcionalmente del genoma de la célula huésped. En otra realización, la célula huésped usada en la presente es *E. coli*, en donde el gen *waaL* y el gen *gtrS* están suprimidos o desactivados funcionalmente del genoma de la célula huésped. En otra realización, una célula huésped usada en la presente es *E. coli*, en donde el gen *waaL* y los genes del racimo *wec* están suprimidos o desactivados funcionalmente del genoma de la célula huésped.

### Proteínas portadoras

Cualquier proteína portadora adecuada para usarse en la producción de vacunas conjugadas (p. ej., bioconjugados para usarse en vacunas) puede usarse aquí, por ejemplo se pueden introducir ácidos nucleicos que codifican la proteína portadora en el huésped provisto en la presente para la producción de un bioconjugado que comprende una proteína portadora enlazada a un antígeno de *Pseudomonas*. Las proteínas portadoras ejemplares incluyen, sin limitación, exotoxina A detoxificada de *P. aeruginosa* (EPA; véase, por ejemplo, Ihssen, y col., (2010) *Microbial Cell Factories* 9, 61), CRM197, proteína de unión de maltosa (MBP), toxoide diftérico, toxoide tetánico, hemolisina A detoxificada de *S. aureus*, factor de agregación A, factor de agregación B, FimH de *E. coli*, FimHC de *E. coli*, enterotoxina termolábil de *E. coli*, variantes detoxificadas de enterotoxina termolábil de *E. coli*, subunidad B de la toxina colérica (CTB), toxina colérica, variantes detoxificadas de la toxina colérica, proteína Sat de *E. coli*, el dominio de pasajero de la proteína Sat de *E. coli*, pneumolisina de *Streptococcus pneumoniae* y variantes detoxificadas de la misma, AcrA de *C. jejuni*, proteína PcrV de *Pseudomonas* y glicoproteínas naturales de *C. jejuni*.

En realizaciones específicas, las proteínas portadoras expresadas por las células huéspedes modificadas provistas en la presente son expresadas a partir de un ácido nucleico que ha sido integrado en el genoma de la célula huésped modificada. Esto es, un ácido nucleico que codifica la proteína portadora ha sido integrado en el genoma de la célula huésped. En ciertas realizaciones, las proteínas portadoras expresadas por las células huéspedes modificadas aquí provistas son expresadas desde un plásmido que ha sido introducido en la célula huésped modificada.

En ciertas realizaciones, las proteínas portadoras usadas en la generación de los bioconjugados aquí descritos se modifican, por ejemplo, se modifican de tal manera que la proteína es menos tóxica y/o menos susceptible de glicosilación. En una realización específica, las proteínas portadoras usadas en la generación de los bioconjugados aquí descritos se modifican de tal manera que se maximiza el número de sitios de glicosilación de las proteínas portadoras, de tal manera que se pueden administrar concentraciones más bajas de la proteína, por ejemplo en una composición inmunogénica, en su forma bioconjugada.

En ciertas realizaciones, las proteínas portadoras aquí descritas se modifican para incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sitios de glicosilación de los que normalmente estarían asociados con la proteína portadora (p. ej., con respecto al número de sitios de glicosilación asociados con la proteína portadora en su estado nativo/natural, por ejemplo “de tipo silvestre”). En realizaciones específicas, la introducción de sitios de glicosilación se realiza por inserción de secuencias consenso de glicosilación (p. ej., Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro; o Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido natural, excepto Pro (véase el documento WO 2006/119987)) en cualquier parte de la estructura primaria de la proteína. La introducción de tales sitios de glicosilación se puede realizar, por ejemplo, añadiendo aminoácidos nuevos a la estructura primaria de la proteína (esto es, los sitios de glicosilación se añaden todos o por partes), o mutando los aminoácidos existentes en la proteína para generar los sitios de glicosilación (esto es, los aminoácidos no se añaden a la proteína, sino que aminoácidos seleccionados de la proteína son mutados a fin de formar sitios de glicosilación). Los expertos en la materia reconocerán que la secuencia de aminoácidos de una proteína se puede modificar fácilmente usando las estrategias conocidas en la técnica, por ejemplo estrategias recombinantes que incluyen la modificación de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína. En realizaciones específicas, se introducen secuencias consenso de glicosilación en regiones específicas de la proteína portadora, por ejemplo estructuras de superficie de la proteína, en los extremos N o C de la proteína, o en bucles que son estabilizados por puentes disulfuro en la base de la proteína. En ciertas realizaciones, la secuencia consenso clásica de glicosilación de 5 aminoácidos puede ser extendida por restos de lisina para una glicosilación más eficiente y, por lo tanto, la secuencia consenso insertada puede codificar 5, 6 o 7 aminoácidos que serían insertados o que reemplazarían a los aminoácidos de la proteína aceptora.

En ciertas realizaciones, las proteínas portadoras usadas en la generación de los bioconjugados aquí descritas comprenden una “etiqueta”, esto es, una secuencia de aminoácidos que permite el aislamiento o identificación de la proteína portadora. Por ejemplo, la adición de una etiqueta a una proteína portadora aquí descrita puede ser útil en la purificación de esa proteína y por lo tanto en la purificación de vacunas conjugadas que comprenden la proteína portadora etiquetada. Etiquetas ejemplares que se pueden usar aquí incluyen, sin limitación, etiquetas de histidina

(HIS) (p. ej., etiqueta de hexa-histidina o etiqueta de 6XHis), FLAG-TAG y etiquetas de HA. En ciertas realizaciones, las etiquetas usadas en la presente son amovibles, por ejemplo por remoción con agentes químicos o medios enzimáticos, una vez que ya no se necesitan, por ejemplo después de que se ha purificado la proteína.

5 En ciertas realizaciones, las proteínas portadoras aquí descritas comprenden una secuencia señal que dirige la proteína portadora al espacio periplásmico de la célula huésped que expresa la proteína portadora. En una realización específica, la secuencia señal es de DsbA de *E. coli*, porina A de membrana externa (OmpA) de *E. coli*, proteína de unión de maltosa (MalE) de *E. coli*, pectato-liasa (PelB) de *Erwinia carotovora*s, Flgl, NikA, o endoxilanasas (XynA) de *Bacillus sp.*, enterotoxina termolábil LTIIb de *E. coli*, endoxilanasas XynA de *Bacillus*, o flagelina (FlgI) de *E. coli*.

### Maquinaria de glicosilación

#### 10 **Oligosacaryltransferasas**

Las oligosacaryltransferasas transfieren oligosacáridos enlazados con lípido a restos de asparagina de cadenas de polipéptido nacientes que comprenden un motivo de consenso de N-glicosilación, por ejemplo Asn-X-Ser(Thr), en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro; o Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido natural excepto Pro (véase el documento WO 2006/119987). Véanse, por ejemplo, los documentos WO 2003/074687 y WO 2006/119987.

En ciertas realizaciones, las células huéspedes aquí provistas comprenden un ácido nucleico que codifica una oligosacaryltransferasa. El ácido nucleico que codifica una oligosacaryltransferasa puede ser nativo para la célula huésped, o se puede introducir en la célula huésped usando estrategias genéticas como se describe arriba. La oligosacaryltransferasa puede ser de cualquier fuente conocida en la técnica. En una realización específica, la oligosacaryltransferasa es una oligosacaryltransferasa de *Campylobacter*. En otra realización específica, la oligosacaryltransferasa es una oligosacaryltransferasa de *Campylobacter jejuni* (esto es *pglB*; véase por ejemplo Wacker y col., 2002, *Science* 298: 1790-1793; véase también por ejemplo la ID gen NCBI: 3231775, Registro UniProt N.º O86154). En otra realización específica, la oligosacaryltransferasa es una oligosacaryltransferasa de *Campylobacter lari* (véase, por ejemplo, la ID gen NCBI: 7410986).

25 En una realización específica, las células huéspedes modificadas aquí provistas comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaryltransferasa, en donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica una oligosacaryltransferasa se integra en el genoma de la célula huésped.

### **Enzimas accesorias**

En ciertas realizaciones se introducen ácidos nucleicos que codifican una o más enzimas accesorias en las células huéspedes modificadas aquí descritas. Tales ácidos nucleicos que codifican una o más enzimas accesorias pueden ser llevados por plásmido o integrados en el genoma de las células huéspedes aquí descritas. Las enzimas accesorias ejemplares incluyen, sin limitación, epimerasas, enzimas de ramificación, modificación, amidación, regulación de la longitud de cadena, acetilación, formilación, polimerización.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican epimerasas que pueden insertarse en las células huéspedes aquí descritas son conocidas en la técnica. En ciertas realizaciones, la epimerasa insertada en una célula huésped aquí descrita es una epimerasa descrita en la publicación de la solicitud de patente internacional N.º WO 2011/062615. En una realización específica, la epimerasa es la epimerasa codificada por el gen Z3206 de *E. coli* cepa O157. Véase, por ejemplo, el documento WO 2011/062615 y Rush *et al.*, 2009, *The Journal of Biological Chemistry* 285: 1671-1680. En una realización específica, las células huéspedes modificadas aquí provistas comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una epimerasa, en donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica una epimerasa está integrada en el genoma de la célula huésped.

En ciertas realizaciones, una secuencia de ácido nucleico que codifica una formiltransferasa se inserta en, o es expresada por, la célula huésped aquí descrita. Las formiltransferasas son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo formilo a una molécula aceptora. En una realización específica, una secuencia de ácido nucleico que codifica la formiltransferasa *fmtO6* de *O6* de *Pseudomonas aeruginosa* (SEQ ID NO: 2), o un homólogo de la misma (p. ej., la polimerasa *wzy* de la cepa PAK o LESB58 de *Pseudomonas aeruginosa*), se inserta en, o es expresada por, las células huéspedes aquí descritas. En otra realización específica, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene aproximadamente, o por lo menos, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad u homología con la SEQ ID NO: 2, es insertada en, o expresada por, las células huéspedes aquí descritas.

Se conocen ciertas formiltransferasas implicadas en la biosíntesis de polisacárido y se pueden insertar en las células huéspedes aquí descritas o pueden ser expresadas por las mismas. Por ejemplo, *vioF* es una enzima de *P. alcalifaciens* del serotipo O30, que es 48% idéntica a la formiltransferasa de *Francisella tularensis* (Nagaraja y col., 2005). Convierte dTDP-D-Qui4N en dTDP-D-Qui4NFo, y está implicada en la biosíntesis del antígeno O (Liu y col., 2012, *Glycobiology* 22 (9): 1236-1244). Otra formiltransferasa implicada en la biosíntesis de polisacárido es *arnA* (p. ej., de *E. coli*), una enzima bifuncional en la cual el dominio N-terminal convierte UDP-Ara4N en UDP-AraNFo, mientras que el dominio C-terminal está implicado en la descarboxilación oxidativa de UDP-ácido glucurónico. Ambas actividades enzimáticas son requeridas para la modificación de L-Ara4N del lípido A y la resistencia a polimixina

(Breazeale y col., 2005, *The Journal of Biological Chemistry* 280 (14): 14154-14167). Otra formiltransferasa implicada en la biosíntesis de polisacárido es *wekD*, una enzima de *E. coli* del serotipo O119, implicada en la biosíntesis de TDP-DRhaNac3NFo (Anderson y col., 1992, *Carbohydr Res.* 237: 249-62).

Además, han sido caracterizados dominios que están relacionados con la actividad de formiltransferasa. El denominado dominio FMT\_núcleo está presente en la mayoría de formiltransferasas. Los ejemplos incluyen la metionil-tRNA-formiltransferasa, fosforribosilglicinamida-formiltransferasa 1, UDP-ácido glucurónico-descarboxilasa/UDP-4-amino-4-desoxi-L-arabinosa-formiltransferasa, *vioF* de *Providencia alcalifaciens* O30 y *arnA* de *E. coli*. Las formiltransferasas anteriormente mencionadas utilizan FTHF (N-10-formiltetrahidrofolato) como donador de formilo. También, las enzimas productoras de formiato que utilizan FTHF (10-formiltetrahidrofolato) como sustrato contienen este dominio. Además, AICARFT está presente en la fosforribosilaminoimidazolcarboxamida-formiltransferasa/IMP-ciclohidrolasa, y FDH\_GDH está presente en la fosforribosilglicinamida-formiltransferasa 2.

En ciertas realizaciones, una secuencia de ácido nucleico que codifica una polimerasa del antígeno O (gen *wzy*) se inserta en, o es expresada por, las células huéspedes aquí descritas. Las polimerasas del antígeno O son proteínas de múltiples dominios transmembrana. Utilizan como sustrato unidades de repetición del antígeno O unidas a undecaprenilpirofosfato para generar un polímero lineal que consiste en las unidades de repetición. Las polimerasas del antígeno O (*wzy*) están presentes en bacterias Gram negativas que sintetizan polímeros del antígeno O mediante un mecanismo dependiente de *wzy*.

En una realización específica, una secuencia de ácido nucleico que codifica la polimerasa *wzy* de *Pseudomonas aeruginosa* (SEQ ID NO: 3), o un homólogo de la misma (p. ej., la polimerasa *wzy* de la cepa PAK o LESB58 de *Pseudomonas aeruginosa*) se inserta en, o es expresada por, las células huéspedes aquí descritas. Los ejemplos de bacteria conocidas que comprenden polimerasas *wzy*, incluyen *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri* y *Salmonella typhimurium*. En otra realización específica, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene aproximadamente, o por lo menos, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad u homología con la SEQ ID NO: 3, se inserta en, o es expresada por, las células huéspedes aquí descritas.

#### 25 **Número de copias del gen**

En ciertas realizaciones, el número de copias del gen o genes integrados en la célula huésped modificada aquí provista es de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10. En una realización específica, el número de copias del gen o genes integrados en la célula huésped modificada provista aquí, es 1 o 2.

#### **Beneficios**

Las células huéspedes modificadas aquí descritas son de particular importancia y relevancia comercial, ya que permiten una fermentación a gran escala de bioconjugados que comprenden antígenos de *Pseudomonas* que pueden ser usados como agentes terapéuticos (p. ej., en composiciones inmunogénicas, vacunas) con un menor riesgo, debido a la mayor estabilidad del ADN insertado cromosómicamente y por tanto de la expresión del ADN de interés durante la fermentación. Las células huéspedes modificadas aquí descritas son ventajosas sobre las células huéspedes que se basan en la expresión llevada por plásmido de ácidos nucleicos requerida para la generación de los bioconjugados aquí descritos porque, entre otras cosas, no se requiere selección por antibiótico durante la fermentación una vez que el ADN heterólogo se inserta en el genoma de la célula huésped. Esto es, cuando el ADN de inserto se inserta en el cromosoma, no es necesario que sea seleccionado porque se propaga junto con la replicación del genoma del huésped. Además, una desventaja conocida de los sistemas llevados por plásmido es que con cada generación (esto es, ciclo de replicación de la célula huésped) aumenta el riesgo de perder el plásmido. Esta pérdida de plásmido se debe a la distribución, algunas veces inapropiada, de los plásmidos a las células hijas en la etapa de separación celular durante la división celular. A gran escala, los cultivos de células bacterianas se duplican más frecuentemente que a escalas de fermentación más pequeñas para alcanzar altas densidades celulares. De esta manera, una estabilidad celular y una expresión del ADN de inserto superiores producen rendimientos de producto más altos, suministrando una ventaja distinta. Además, la estabilidad celular es un criterio de aceptación de proceso para la aprobación por parte de las autoridades regulatorias, mientras que generalmente la selección por antibiótico no es deseable durante la fermentación por varias razones; por ejemplo, los antibióticos se presentan como impurezas en los productos medicinales finales y llevan el riesgo de causar reacciones alérgicas, y los antibióticos pueden promover resistencia al antibiótico (p. ej., por transferencia de genes o selección de patógenos resistentes).

La presente solicitud provee células huéspedes modificadas para usarse en la producción de bioconjugados que comprenden antígenos de *Pseudomonas* que se pueden usar como agentes terapéuticos (p. ej., en composiciones inmunogénicas, vacunas), en donde ciertos elementos genéticos requeridos para manejar la producción de los bioconjugados se integran establemente en el genoma de la célula huésped. Consecuentemente, la célula huésped puede contener un número reducido de plásmidos, sólo un plásmido o ningún plásmido en absoluto. En algunas realizaciones, la presencia de un solo plásmido puede dar como resultado mayor flexibilidad de la cepa de producción y la capacidad para cambiar la naturaleza de la conjugación (en cuanto a su contenido de sacárido o proteína portadora), llevando fácilmente a una mayor flexibilidad de la cepa de producción.

En general, una reducción en el uso de plásmidos da como resultado una cepa de producción que es más adecuada

para usarse en la producción de productos medicinales. Una desventaja de que el material genético esencial se encuentre presente en los plásmidos, es el requerimiento de presión de selección para mantener los elementos episómicos en la célula huésped. La presión de selección requiere el uso de antibióticos, lo que es indeseable para la producción de productos medicinales debido, por ejemplo, al peligro de reacciones alérgicas contra los antibióticos y el costo adicional de fabricación. Además, frecuentemente la presión de selección es incompleta y da como resultado cultivos bacterianos no homogéneos en los cuales algunos clones han perdido el plásmido y por lo tanto no producen el bioconjugado. Por lo tanto, las células huéspedes aquí descritas son capaces de producir un producto más seguro, que se puede obtener con altos rendimientos.

## 5.2 Métodos de integración/introducción de ácidos nucleicos en células huéspedes

10 Cualquier método conocido en la técnica se puede usar para integrar un ácido nucleico (p. ej., un gen o un operón, por ejemplo, un racimo *rfb*) en el genoma de una célula huésped.

En una realización específica, los ácidos nucleicos heterólogos se introducen en las células huéspedes aquí descritas usando el método de inserción descrito en la solicitud de patente internacional N.º PCT/EP2013/071328. De acuerdo con este método se pueden insertar establemente secuencias de ADN contiguas grandes directamente en el genoma de una célula huésped. En resumen, el método comprende algunos o todos los pasos siguientes:

15 Paso 1: Se hace un plásmido donador. Una secuencia de ADN de inserto heterólogo (esto es, una secuencia de ADN de inserto heterólogo que comprende uno o más genes de interés) se clona en un sitio de clonación (p. ej., un sitio de clonación múltiple, abreviado como MCS) de un plásmido adecuado para usarse como un plásmido donador. También se clonan en el plásmido donador secuencias de ADN adecuadas para usarse como regiones de homología (esto es, secuencias de ADN homólogas para la localización de inserción en el genoma de la célula huésped), de tal manera que las regiones de homología flanquean el ADN de inserto heterólogo. Estos métodos de clonación y ensamblado del plásmido donador se pueden hacer de acuerdo con cualquier tecnología establecida y muy conocida para modificar y sintetizar ADN, tal como por ejemplo, sin limitación, clonación molecular usando enzimas de restricción y ligasas, transposasas, síntesis química, etc., siendo conocidas dichas tecnologías para los expertos en la materia.

20 En ciertas realizaciones, se coloca entre los brazos de homología un casete de selección que comprende un marco de lectura abierto que codifica una proteína que confiere resistencia a antibiótico. Las células huéspedes que comprenden el ADN de inserto heterólogo insertado en su genoma pueden ser identificadas cultivándolas en un medio que comprende el antibiótico al cual provee resistencia el gen de resistencia a antibiótico del casete de selección. En ciertas realizaciones, el casete de selección puede ser flanqueado por sitios FRT, que permiten una eliminación posterior del casete por medio de recombinación dirigida al sitio. La incorporación de sitios FRT de esta manera en el plásmido donador asegura así que el casete de selección no permanezca integrado en el genoma de la célula huésped. En otra realización, el casete de selección puede ser eliminado después de la integración por medio de recombinación homóloga dirigida al sitio mediada por el sitio dif, o mediante otras tecnologías de mutagénesis cromosómica dirigida al sitio.

25 Los plásmidos donadores se pueden manipular más para que comprendan un marco de lectura abierto que codifique una proteína de contraselección. En los plásmidos donadores aquí descritos se puede incorporar cualquier gen que codifique una proteína conocida para los expertos en la materia como adecuada para usarse en las estrategias de contraselección. En una realización específica se usa el gen *sacB* para la contraselección.

30 Los plásmidos donadores se pueden manipular más para que comprendan un origen de replicación. Los expertos en la materia apreciarán fácilmente que el origen de replicación incorporado en el plásmido donador debe ser adecuado para usarse en la célula huésped que se está sometiendo a una modificación del genoma. Por ejemplo, cuando se realiza clonación en *E. coli* debe estar presente un origen de replicación de *E. coli*. En una realización específica, el origen de replicación es *oriT*. Los expertos en la materia apreciarán fácilmente que, usando los métodos conocidos en la técnica, se pueden generar plásmidos promiscuos (esto es, plásmidos capaces de replicarse en múltiples células huéspedes, por ejemplo múltiples especies bacterianas) y estos plásmidos se pueden usar para su inserción en muchos tipos de células huéspedes, por ejemplo células procariontas, células arqueas, células eubacterianas o células eucariotas. Estos plásmidos promiscuos pueden comprender elementos de control de expresión y orígenes de replicación específicos de organismo.

35 Paso 2: Se hace un plásmido auxiliar. El plásmido auxiliar se manipula para que codifique todas las actividades necesarias para mediar la inserción de ADN en las células huéspedes y para el mantenimiento del plásmido auxiliar dentro de las células huéspedes que se someten a recombinación. En ciertas realizaciones, los plásmidos auxiliares comprenden: (i) un casete de selección para el mantenimiento del plásmido en la célula huésped, (ii) un regulón para la expresión de una recombinasa, esto es, una enzima o enzimas que sostienen e incrementan la eficiencia de entrecruzamiento entre tramos de ADN homólogos, (iii) un regulón para la expresión de una función que linealiza el inserto de ADN produciendo secuencias homólogas terminales que pueden experimentar recombinación homóloga, (iv) un regulón que expresa un homólogo de *RecA* para las células huéspedes que no tengan una copia de *recA* propia, y (v) un origen de replicación condicional.

En ciertas realizaciones, los plásmidos auxiliares comprenden elementos similares al plásmido auxiliar pTKRED

(Genebank GU327533.1). En una realización específica se usa en el método el plásmido auxiliar pTKRED (Genebank GU327533.1).

5 Paso 3: El plásmido donador y el plásmido auxiliar se introducen en la misma célula huésped. La inserción de plásmidos donadores y auxiliares se puede hacer por medio de muchas técnicas diferentes conocidas para los expertos en la materia, que incluyen, sin limitación, electroporación, uso de células químicamente competentes, choque de calor y transducción de fago. Después, las células huéspedes se pueden cultivar bajo condiciones selectivas para el enriquecimiento de las células que llevan los plásmidos introducidos.

10 Paso 4: Se inicia el procedimiento de inserción. Un procedimiento de inserción ejemplar comprende los siguientes pasos: los cultivos nocturnos de los clones positivos (esto es, las células huéspedes que comprenden tanto el plásmido auxiliar como donador) se pueden desarrollar, por ejemplo, a 30° C en un medio que comprende el antibiótico apropiado para la selección (tales antibióticos pueden ser seleccionados fácilmente por los expertos en la materia basándose en los casetes de selección presentes en el plásmido donador/auxiliar). Después, los cultivos se pueden diluir y desarrollar, por ejemplo, a 30° C hasta la fase exponencial, en presencia de los antibióticos apropiados. Bajo estas condiciones, el plásmido auxiliar y donador se mantienen, pero silenciosos. Posteriormente, el medio se reemplaza por medio que contiene los antibióticos de selección, así como también cualquier inductor de elementos condicionales (p. ej., promotores inducibles u orígenes de replicación condicionales) presente en los plásmidos, seguido por incubación adicional de las células. Durante este tiempo, se expresa la endonucleasa de restricción (p. ej., *SceI*) en el plásmido auxiliar y la recombinasa (p. ej., recombinasa lambda Red) en el plásmido auxiliar, produciendo una escisión del plásmido donador en los brazos de homología y recombinación homóloga del ADN de homología en los sitios homólogos del genoma de la célula huésped. Posteriormente, las células se siembran en placa en un medio que contiene el componente al que corresponde el marcador de contraselección del plásmido donador (p. ej., sacarosa, si el marcador de contraselección es sacB). Este paso ocasiona la contraselección de las células que comprenden el plásmido donador, esto es, las células en las que el plásmido donador existe en un estado no insertado. Tal medio también comprende el marcador de resistencia presente en el casete de inserción del plásmido donador (esto es, el casete de resistencia a antibiótico que está presente entre el HR del plásmido donador), para seleccionar las células que contienen el ADN de inserto heterólogo. Después de la incubación nocturna, las células se criban para seleccionar los clones recombinados que muestran un fenotipo de resistencia a antibiótico consistente con (i) pérdida de los plásmidos auxiliar y donador, y (ii) presencia del inserto de ADN heterólogo.

30 Además de los métodos de inserción anteriormente descritos, el ADN se puede insertar en el genoma de una célula huésped usando otras estrategias. En ciertas realizaciones, el ADN se inserta en el genoma de una célula huésped usando cualquier método de inserción específico de sitio conocido en la técnica. En ciertas realizaciones, el ADN se inserta en el genoma de una célula huésped utilizando cualquier método de integración aleatoria conocido en la técnica. Estos métodos se describen más abajo en mayor detalle.

35 En ciertas realizaciones, el ADN se inserta en el genoma de una célula huésped (p. ej., *E. coli*) usando un método que comprende inserción mediada por transposón. Tal inserción aleatoria permite la inserción del ADN de interés en múltiples sitios del genoma de la célula huésped y, de esta manera, permite la identificación de sitios de inserción óptimos en las células huéspedes en las que se ha insertado el ADN; por ejemplo, las células huéspedes que llevan el ADN insertado se pueden comparar entre sí con respecto a la eficiencia de producción del ADN insertado, y las células huéspedes con la eficiencia más alta se pueden seleccionar para uso futuro. Los métodos de inserción de secuencias de ácido nucleico mediada por transposón en genomas de células huéspedes son conocidos en la técnica. Por ejemplo, en ciertas realizaciones se usa el sistema de suministro pUTminiTn5 (Biomedical; Sevilla, España) para insertar establemente genes en los genomas de células huéspedes (tales como células huéspedes bacterianas). Entonces se pueden identificar y aislar las cepas en las que se ha insertado el ADN. Véase Herrero y col., 1990, *J. Bacteriology* 172 (11): 6557-6567 y DeLorenzo y col., 1990, *J. Bacteriology* 172 (11): 6568-6572. Además, en ciertas realizaciones, la inserción de ADN mediada por transposón en el genoma de una célula huésped se realiza usando un método de inserción de ADN basado en Tn-7. Véase McKenzie y col., 2006, *BMC Microbiology* 6: 39; y Sibley y col., 2012, *Nucleic Acids Res.* 40: e19.

50 En ciertas realizaciones, el ADN se inserta en el genoma de una célula huésped (p. ej., *E. coli*) usando el kit StabyCloning™ o el kit StabyCodon T7 (Delphi Genetics, Charleroi, Bélgica), que permite la clonación de ADN específica de sitio.

En ciertas realizaciones, el ADN se inserta en el genoma de una célula huésped (p. ej., *E. coli*) usando el método de "clonointegración" de clonación e integración cromosómica de ADN. Véase St. Pierre y col., 2013, *ACS Synthetic Biology* 2:537-541.

55 En ciertas realizaciones, el ADN se inserta en el genoma de una célula huésped (p. ej., *E. coli*) usando un método que implica plásmidos de replicación condicional, integración y modular (CRIM), como se describe en Haldimann y Wanner, 2001, *J. Bacteriology* 183:6384-6393.

En ciertas realizaciones, el ADN se inserta en el genoma de una célula huésped (p. ej., *E. coli*) usando ingeniería de recombinación, un método descrito, por ejemplo, por Sharan y col., 2009, *Nat. Protoc.* 4: 206-223; Yu y col., 2000, *PNAS USA* 97: 5978-5983; Kuhlman y col., 2010, *Nucleic Acids Res.* 38: e92; y Zhang y col., 1998, *Nat. Genet.* 20:

123-128.

5 En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos heterólogos se introducen en las células huéspedes modificadas descritas en la presente por electroporación, transformación química o choque de calor, transformación natural, transducción de fago y/o conjugación. En realizaciones específicas, los ácidos nucleicos heterólogos se introducen en las células huéspedes aquí descritas usando un plásmido, por ejemplo los ácidos nucleicos heterólogos se expresan en la célula huésped por medio de un plásmido (p. ej., un vector de expresión), y el plásmido se introduce en las células huéspedes modificadas por electroporación, transformación química por choque de calor, transformación natural, transducción de fago o conjugación.

10 En una realización específica, una secuencia de ácido nucleico aislado se integra en una célula huésped (p. ej., *E. coli*), en donde dicho ácido nucleico codifica un racimo *rfb* de *Pseudomonas* modificado, por ejemplo el racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6, en donde dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas* modificado comprende: (i) un gen que codifica una formiltransferasa (p. ej., un gen que codifica la SEQ ID NO: 2 o un homólogo de la misma), (ii) un gen que codifica una polimerasa *wzy* (p. ej., un gen que codifica la SEQ ID NO: 3 o un homólogo de la misma); o (iii) un gen que codifica una formiltransferasa (p. ej., un gen que codifica la SEQ ID NO: 2 o un homólogo de la misma) y un gen que codifica una polimerasa *wzy* (p. ej., un gen que codifica la SEQ ID NO: 3 o un homólogo de la misma).

### 5.3 Bioconjugados

20 Las células huéspedes modificadas aquí descritas se pueden usar para producir bioconjugados que comprenden un antígeno de *Pseudomonas* enlazado a una proteína portadora. Los métodos de producción de bioconjugados usando células huéspedes son conocidos en la técnica. Véanse por ejemplo los documentos WO 2003/074687 y WO 2006/119987. Los bioconjugados, como se describe en la presente, tienen propiedades ventajosas sobre los conjugados químicos de antígeno-proteína portadora, ya que requieren menos sustancias químicas en su fabricación y son más consistentes en cuanto al producto final generado.

25 En una realización específica, se provee aquí un bioconjugado que comprende una proteína portadora enlazada a un antígeno de *Pseudomonas*. En una realización específica, dicho antígeno de *Pseudomonas* es un antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa*. En una realización específica, se provee aquí un bioconjugado que comprende un antígeno O de *P. aeruginosa* y una proteína portadora, en donde dicha proteína portadora es EPA, PcrV (conocida también como LcrV, EspA, SseB), PopB (YopB, YopD, FliC), u OprF, OprI.

30 En una realización específica, se provee aquí un bioconjugado que comprende una proteína portadora enlazada a un antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa*, en donde dicho antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa* es un antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O1, O2, O3, O4, O5, O6, O7, O8, O9, O10, O11, O12, O13, O14, O15, O16, O17, O18, O19 u O20.

En una realización específica, se provee aquí un bioconjugado que comprende una proteína portadora enlazada a un antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa*, en donde dicho antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa* es uno de los serotipos descritos por Knirel y col., 2006, *Journal of Endotoxin Research* 12 (6): 324-336.

35 En una realización específica, se provee aquí un bioconjugado que comprende una proteína portadora enlazada a un antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa*, en donde dicho antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa* es un antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6.

40 En una realización específica, se provee aquí un bioconjugado que comprende una proteína portadora enlazada a un antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa*, en donde dicho antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa* es un antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O11. En una realización específica, dicho antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O11 es de *Pseudomonas aeruginosa* de la cepa PA103 (véase, por ejemplo, N.º Acceso Genbank KF364633.1).

45 Los bioconjugados aquí descritos se pueden purificar mediante cualquier método conocido en la técnica de purificación de una proteína, por ejemplo por cromatografía (p. ej., cromatografía de intercambio iónico, de intercambio aniónico, de afinidad y de tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica estándar de purificación de proteínas. Véase por ejemplo Saraswat y col., 2013, *Biomed. Res. Int.* ID #312709 (p. 1-18); véanse también los métodos descritos en el documento WO 2009/104074. Además, los bioconjugados se pueden fusionar con secuencias de polipéptido heterólogas descritas en la presente o conocidas de otra manera en la técnica para facilitar la purificación. Las condiciones reales usadas para purificar un bioconjugado particular dependerán, en parte, de la estrategia de síntesis y de factores tales como la carga neta, hidrofobicidad o hidrofiliidad del bioconjugado, y serán evidentes para los expertos en la materia.

### 5.4 Métodos analíticos

Se pueden usar varios métodos para analizar las composiciones estructurales y longitudes de la cadena de azúcar de los bioconjugados aquí descritos.

55 En una realización se puede usar hidrazinólisis para analizar los glicanos. En primer lugar, los polisacáridos se liberan

de sus portadores de proteína por incubación con hidrazina de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit Ludger Liberate Hydrazinolysis Glycan Release, Oxfordshire, Reino Unido). El nucleófilo hidrazina ataca el enlace glicosídico entre el polisacárido y la proteína portadora y permite la liberación de los glicanos unidos. Los grupos N-acetilo se pierden durante este tratamiento y se tienen que reconstituir por medio de re-N-acetilación. Los glicanos libres se purifican en columnas de carbono y subsiguientemente se marcan en el extremo reductor con el fluoróforo 2-amino-benzamida. Véase Bigge JC, Patel TP, Bruce JA, Goulding PN, Charles SM, Parekh RB: "Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid". *Anal Biochem* 1995, 230 (2): 229-238. Los polisacáridos marcados se separan en una columna de GlycoSep-N (GL Sciences) de acuerdo con el protocolo de HPLC de Royle y col., véase Royle L, Mattu TS, Hart E, Langridge JI, Merry AH, Murphy N, Harvey DJ, Dwek RA, Rudd PM: "An analytical and structural database provides a strategy for sequencing O-glycans from microgram quantities of glycoproteins". *Anal Biochem* 2002, 304(1):70-90. El cromatograma de fluorescencia resultante indica la longitud del polisacárido y el número de unidades de repetición. La información estructural se puede recopilar recolectando los picos individuales y realizando subsiguientemente un análisis de MS/MS. Con ello, la composición del monosacárido y la secuencia de la unidad de repetición se pueden confirmar, y adicionalmente se puede identificar la homogeneidad de la composición de polisacárido.

En otra realización se puede usar SDS-PAGE o electroforesis en gel capilar para evaluar los glicanos y bioconjugados. La longitud del polímero de los glicanos del antígeno O es definida por el número de unidades de repetición que se ensamblan linealmente. Esto significa que el patrón típico semejante a escalera es una consecuencia de los números diferentes de unidades de repetición que componen el glicano. De esta manera, dos bandas una junto a otra en SDS-PAGE u otras técnicas que separan por tamaño, difieren únicamente por una sola unidad de repetición. Estas diferencias discretas son aprovechadas cuando se analizan las glicoproteínas por el tamaño del glicano: La proteína portadora no glicosilada y el bioconjugado con diferentes longitudes de cadena de polímero se separan de acuerdo con sus movilidades electroforéticas. Se mide el primer número de unidades de repetición detectables ( $n_1$ ) y el número promedio de unidades de repetición ( $n_{\text{promedio}}$ ) presentes en un bioconjugado. Estos parámetros se pueden usar para demostrar la consistencia de lote a lote o la estabilidad del polisacárido.

En otra realización, se puede aplicar MS de masa alta y HPLC de exclusión de tamaño para medir el tamaño de los bioconjugados completos.

En otra realización, se puede usar un ensayo de antrona-ácido sulfúrico para medir los rendimientos de polisacárido. Véase Leyva A, Quintana A, Sánchez M, Rodríguez EN, Cremata J, Sánchez JC: "Rapid and sensitive anthrone-sulfuric acid assay in microplate format to quantify carbohydrate in biopharmaceutical products: method development and validation". *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization* 2008, 36 (2): 134-141. En otra realización, se puede usar un ensayo de metilpentosa para medir los rendimientos de polisacárido; véase, por ejemplo, Dische *et al.*, *J Biol Chem.*, septiembre de 1948; 175 (2): 595-603.

### Cambio en el uso del sitio de glicosilación

Para mostrar que el uso de sitio en una proteína específica cambia en un sistema de plásmido múltiple, a diferencia de un sistema insertado, debe cuantificarse el uso del sitio de glicosilación. Más abajo se indican los métodos para hacerlo así.

LC-MS/MS del glicopéptido: Los bioconjugados se digieren con una o más proteasas y los péptidos se separan mediante un método cromatográfico adecuado (HPLC de interacción hidrofílica, HILIC, columnas C18, GlycoSepN, SE-HPLC, AE-HPLC), y los diferentes péptidos se identifican usando MS/MS. Este método se puede usar con o sin acortamiento previo de la cadena de azúcar por métodos químicos (degradación de Smith) o enzimáticos. La cuantificación de los picos de glicopéptido usando detección de UV a 215-280 nm permite la determinación relativa del uso del sitio de glicosilación.

HPLC de exclusión de tamaño: Un uso más alto del sitio de glicosilación se refleja por un tiempo de elución más corto de una columna de SE-HPLC.

### Homogeneidad

La homogeneidad del bioconjugado (esto es, la homogeneidad de los restos de azúcar unidos) se puede evaluar usando métodos que miden la longitud del glicano y el radio hidrodinámico.

### Otras posibles aplicaciones clínicas/prácticas

Cadenas integradas pueden dar un rendimiento más alto de bioconjugados debido a la carga de selección de antibiótico reducida en comparación con el sistema de tres plásmidos. Además, ocurre menos degradación proteolítica debido a la carga metabólica reducida para las células.

Las cadenas integradas hacen que los bioconjugados tengan distribuciones de longitud de polisacárido más cortas, menos extendidas. De esta manera, los bioconjugados son más fáciles de caracterizar y se definen mejor. Además, la inserción puede reducir la magnitud del esfuerzo periplásmico para las células, lo que puede llevar a menos proteólisis del producto durante el proceso de fermentación debido a la carga de selección de antibiótico reducida en

comparación con el sistema de tres plásmidos.

Los sistemas de glicosilación de proteína requieren tres elementos recombinantes en el huésped de producción: un ADN de expresión de proteína portadora, un ADN de expresión de oligosacaryltransferasa y un ADN de expresión de polisacárido. Los sistemas de producción bacteriana de la técnica anterior contienen estos tres elementos en los plásmidos. Por lo tanto, existe el riesgo de inestabilidad durante la fabricación debido a la pérdida de plásmido, particularmente porque los antibióticos usados para el mantenimiento de los plásmidos no deben estar presentes durante la fermentación del material de GMP. Puesto que las cepas insertadas contienen un plásmido menos, son más estables durante muchas generaciones. Esto significa que son más factibles escalas de fermentación más altas y tiempos de incubación más largos (números de generación más altos). Además, la ausencia de un antibiótico para selección hace al producto más seguro, debido a la ausencia de vestigios de antibiótico que pueden causar reacciones alérgicas en sujetos sensibles; véase "COMMITTEE WE, BIOLOGICAL O, STANDARDIZATION": Informe Técnico de la OMS, Serie 941, en el 56.º Informe, editado por Organization WH. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 2007.

Las cepas insertadas son genéticamente más estables debido a la inserción cromosómica fija, llevando así a una reproducibilidad más alta de los productos de proteína deseados durante el proceso de producción, por ejemplo durante el cultivo de las células huéspedes que comprenden el ADN heterólogo insertado.

### Métodos analíticos para probar el beneficio

Rendimiento. El rendimiento se mide como cantidad de carbohidrato derivada de un litro de cultivo de producción bacteriana desarrollado en un biorreactor bajo condiciones controladas y optimizadas. Después de la purificación del bioconjugado, los rendimientos de carbohidrato se pueden medir directamente por medio del ensayo de antrona o por ELISA usando un antisuero específico de carbohidrato. Son posibles mediciones indirectas usando la cantidad de proteína (medida mediante los ensayos de BCA, Lowry o Bradford muy conocidos) y la longitud y estructura del glicano para calcular una cantidad teórica de carbohidrato por gramo de proteína. Además, el rendimiento también se puede medir desecando la preparación de glicoproteína en un amortiguador volátil y usando una balanza para medir el peso.

Homogeneidad. La homogeneidad significa la variabilidad de la longitud del glicano y posiblemente el número de sitios de glicosilación. Los métodos arriba indicados se pueden usar para este propósito. La SE-HPLC permite la medición del radio hidrodinámico. Un número más alto de sitios de glicosilación en el portador produce una variación más alta del radio hidrodinámico en comparación con un portador con menos sitios de glicosilación. Sin embargo, cuando se analizan cadenas de glicano simples, estas pueden ser más homogéneas debido a la longitud más controlada. La longitud del glicano se mide por hidrazinólisis, SDS-PAGE y CGE. Además, la homogeneidad también puede significar que ciertos patrones de uso del sitio de glicosilación cambian a una gama más amplia/más estrecha. Estos factores se pueden medir por medio de LC-MS/MS del glicopéptido.

Estabilidad y reproducibilidad de la cepa. La estabilidad de la cepa durante la fermentación bacteriana en ausencia de presión selectiva se mide por métodos directos e indirectos que confirman la presencia o ausencia del ADN recombinante en las células del cultivo de producción. La influencia del volumen de cultivo puede ser simulada por tiempos de cultivo prolongados, lo que significa mayores tiempos de generación. A más generaciones en la fermentación, será más probable que se pierda un elemento recombinante. La pérdida de un elemento recombinante se considera inestabilidad. Los métodos indirectos se basan en la asociación de casetes de selección con ADN recombinante, por ejemplo los casetes de resistencia a antibiótico en un plásmido. Las células del cultivo de producción se siembran sobre medios selectivos, por ejemplo placas LB complementadas con antibióticos u otras sustancias químicas relacionadas con un sistema de selección, y las colonias resistentes se consideran positivas para el ADN recombinante asociado con la sustancia química de selección respectiva. En el caso de un sistema de múltiples plásmidos, se cuentan las colonias resistentes a múltiples antibióticos y la proporción de células que contienen las tres resistencias se considera la población estable. Como alternativa, se puede usar PCR cuantitativa para medir la cantidad de ADN recombinante de los tres elementos recombinantes en presencia, ausencia de selección, y en diferentes puntos de tiempo de fermentación. De esta manera, se mide y se compara la cantidad relativa y absoluta de ADN recombinante. La reproducibilidad del proceso de producción se mide por el análisis completo de lotes de consistencia mediante los métodos indicados en esta solicitud.

## 5.5 Composiciones

### Composiciones que comprenden células huéspedes

En un aspecto, se proveen aquí composiciones que comprenden las células huéspedes aquí descritas (véase la sección 5.1). Tales composiciones se pueden usar en métodos para generar los bioconjugados aquí descritos (véase la sección 5.3); por ejemplo, las composiciones que comprenden las células huéspedes se pueden cultivar bajo condiciones adecuadas para la producción de proteínas. Subsecuentemente, los bioconjugados de dichas composiciones que comprenden las células huéspedes se pueden aislar usando los métodos conocidos en la técnica.

Las composiciones que comprenden las células huéspedes aquí provistas pueden comprender componentes adicionales adecuados para el mantenimiento y supervivencia de las células huéspedes aquí descritas, y adicionalmente pueden comprender componentes adicionales requeridos o beneficiosos para la producción de proteínas por parte de las células huéspedes, por ejemplo inductores para promotores inducibles, tales como

arabinosa, IPTG.

### Composiciones que comprenden bioconjugados

5 En otro aspecto, se proveen aquí composiciones (p. ej., composiciones farmacéuticas) que comprenden uno o más de los bioconjugados aquí descritos (véase la sección 5.3). Las composiciones aquí descritas son útiles en el tratamiento y prevención de la infección de sujetos (p. ej., sujetos humanos) por *Pseudomonas*. Véase la sección 5.6.

10 En ciertas realizaciones, además de comprender un bioconjugado descrito en la presente (véase la sección 5.3), las composiciones aquí descritas (p. ej., composiciones farmacéuticas) comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa aquí, la expresión “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia regulatoria del gobierno federal o estatal, o incluido en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para usarse en animales y, más particularmente, en seres humanos. El término “vehículo”,  
15 usado en la presente en el contexto de un vehículo farmacéuticamente aceptable, se refiere a un diluyente, adyuvante o excipiente con el cual se administra la composición farmacéutica. También se pueden utilizar soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, harina de arroz, greda, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche en polvo descremada, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. Se describen ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados en “Remington's Pharmaceutical Sciences” de E.W. Martin.

20 En una realización específica, se provee aquí una composición (p. ej., composición farmacéutica) que comprende un bioconjugado que comprende una proteína portadora enlazada a un antígeno de *Pseudomonas*. En una realización específica, se provee aquí una composición (p. ej., composición farmacéutica) que comprende un bioconjugado que comprende una proteína portadora enlazada a un antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa*.

25 En una realización específica, se provee aquí una composición (p. ej., composición farmacéutica) que comprende un bioconjugado que comprende una proteína portadora enlazada a un antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa*, en donde dicho antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa* es un antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O1, O2, O3, O4, O5, O6, O7, O8, O9, O10, O11, O12, O13, O14, O15, O16, O17, O18, O19 u O20.

En una realización específica, se provee aquí una composición (p. ej., composición farmacéutica) que comprende un bioconjugado que comprende una proteína portadora enlazada a un antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa*, en donde dicho antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa* es un antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6.

30 En una realización específica, se provee aquí una composición (p. ej., composición farmacéutica) que comprende un bioconjugado que comprende una proteína portadora enlazada a un antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa*, en donde dicho antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa* es un antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O11. En una realización específica, dicho antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O11 es de *Pseudomonas aeruginosa* de la cepa PA103 (véase, por ejemplo, N.º Acceso Genbank KF364633.1).

35 Las composiciones que comprenden bioconjugados que se proveen en la presente, se pueden usar para provocar una respuesta inmunitaria en un huésped a quien se le administra la composición, esto es, las composiciones son inmunogénicas. De esta manera, las composiciones aquí descritas se pueden usar como vacunas contra la infección por *Pseudomonas*, o se pueden usar en el tratamiento de infección por *Pseudomonas*.

40 Las composiciones que comprenden los bioconjugados aquí descritos pueden comprender cualquier componente adicional adecuado para usarse en la administración farmacéutica. En realizaciones específicas, las composiciones aquí descritas son formulaciones monovalentes. En otras realizaciones, las composiciones aquí descritas son formulaciones multivalentes, por ejemplo formulaciones bivalentes, trivalentes y tetravalentes. Por ejemplo, una formulación multivalente comprende más de un bioconjugado aquí descrito.

45 En ciertas realizaciones, las composiciones aquí descritas comprenden adicionalmente un conservador, por ejemplo el derivado de mercurio timerosal. En una realización específica, las composiciones farmacéuticas aquí descritas comprenden de 0,001% a 0,01% de timerosal. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas aquí descritas no comprenden conservador.

50 En ciertas realizaciones, las composiciones aquí descritas (p. ej., las composiciones inmunogénicas) comprenden, o se administran en combinación con, un adyuvante. El adyuvante para su administración en combinación con una composición aquí descrita se puede administrar antes, concomitantemente o después de la administración de dicha composición. En algunas realizaciones, 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, incrementa o refuerza la respuesta inmunitaria a un bioconjugado, pero cuando el compuesto se administra solo, no genera respuesta inmunitaria al bioconjugado. En algunas realizaciones, el adyuvante genera una respuesta inmunitaria al polipéptido bioconjugado y no produce alergia ni otra reacción adversa. Los adyuvantes pueden incrementar una respuesta  
55 inmunitaria por varios mecanismos que incluyen, por ejemplo, reclutamiento de linfocitos, estimulación de células B o T y estimulación de macrófagos.

Los ejemplos específicos de adyuvantes incluyen, pero sin limitación, sales de aluminio (alumbre) (tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y sulfato de aluminio), monofosforil-lípido A (MPL) 3-des-O-acilado (véase la patente del Reino Unido GB2220211), MF59 (Novartis), AS03 (GlaxoSmithKline), AS04 (GlaxoSmithKline), polisorbato 80 (Tween 80; ICL Americas, Inc.), compuestos de imidazopiridina (véase la solicitud internacional N.º PCT/US2007/064857, publicada como la publicación internacional N.º WO 2007/109812), compuestos de imidazoquinoxalina (véase la solicitud internacional N.º PCT/US2007/064858, publicada como publicación internacional N.º WO 2007/109813) y saponinas, tales como QS21 (véase Kensil y col., en "Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach" (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); patente de EE. UU. N.º 5.057.540). En algunas realizaciones, el adyuvante es adyuvante de Freund (completo o incompleto). Otros adyuvantes son emulsiones de aceite en agua (tales como escualeno o aceite de cacahuate), opcionalmente en combinación con inmunoestimulantes tales como monofosforil-lípido A (véase Stoute y col., *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)). Otro adyuvante es CpG (*Bioworld Today*, 15 de noviembre de 1998).

En ciertas realizaciones, las composiciones aquí descritas se formulan para ser adecuadas para la vía de administración deseada para un sujeto. Por ejemplo, las composiciones aquí descritas se pueden formular para ser adecuadas para su administración subcutánea, parenteral, oral, intradérmica, transdérmica, colorrectal, intraperitoneal y rectal. En una realización específica, la composición farmacéutica se puede formular para su administración intravenosa, oral, intraperitoneal, intranasal, intratraqueal, subcutánea, intramuscular, tópica, intradérmica, transdérmica o pulmonar.

En ciertas realizaciones, las composiciones aquí descritas comprenden adicionalmente uno o más tampones, por ejemplo tampón fosfato y tampón fosfato glutamato de sacarosa. En otras realizaciones, las composiciones aquí descritas no comprenden tampones.

En ciertas realizaciones, las composiciones aquí descritas comprenden adicionalmente una o más sales, por ejemplo cloruro de sodio, cloruro de calcio, fosfato de sodio, glutamato monosódico y sales de aluminio (p. ej., hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, alumbre (sulfato de aluminio y potasio), o una mezcla de tales sales de aluminio). En otras realizaciones, las composiciones aquí descritas no comprenden sales.

Las composiciones aquí descritas se pueden incluir en un recipiente, paquete o dispensador junto con las instrucciones para su administración.

Las composiciones aquí descritas se pueden almacenar antes de usar; por ejemplo, las composiciones se pueden almacenar congeladas (p. ej., a aproximadamente -20 °C o a aproximadamente -70 °C); se pueden almacenar en refrigeración (p. ej., a aproximadamente 4 °C); o se pueden almacenar a temperatura ambiente.

### 5.6 Usos profilácticos y terapéuticos

En un aspecto, se proveen aquí métodos de tratamiento de una infección de *Pseudomonas* en un sujeto, que comprenden administrarle al sujeto un bioconjugado descrito en la presente (véase la sección 5.3) o una composición del mismo (véase la sección 5.5). En otro aspecto, se proveen aquí métodos de prevención de una infección de *Pseudomonas* en un sujeto, que comprenden administrarle al sujeto un bioconjugado descrito en la presente (véase la sección 5.3) o una composición del mismo (véase la sección 5.5).

También se proveen aquí métodos de inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto contra *Pseudomonas*, que comprenden administrarle al sujeto un bioconjugado descrito en la presente (véase la sección 5.3) o una composición descrita en la presente (véase la sección 5.5). En una realización, dicho sujeto tiene una infección de *Pseudomonas* en el momento de la administración. En otra realización, dicho sujeto no tiene una infección de *Pseudomonas* en el momento de la administración.

En una realización específica, se provee aquí un método para prevenir una infección de *Pseudomonas* en un sujeto, en donde dicho método comprende administrarle al sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de una composición descrita en la sección 5.5. Los métodos de prevención de una infección de *Pseudomonas* en un sujeto provistos en la presente resultan en la inducción de una respuesta inmunitaria en el sujeto, y comprenden administrarle al sujeto una composición descrita en la sección 5.5. El experto en la materia entenderá que los métodos aquí descritos de inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto dan como resultado la vacunación del sujeto contra infección por cepas de *Pseudomonas* cuyos antígenos están presentes en las composiciones.

En una realización específica, se provee aquí un método para tratar una infección de *Pseudomonas* en un sujeto, en donde dicho método comprende administrarle a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de una composición descrita en la sección 5.5.

En ciertas realizaciones, la respuesta inmunitaria inducida por un bioconjugado descrito en la presente (véase la sección 5.3) o una composición descrita en la presente (véase la sección 5.5), es eficaz para prevenir o tratar una infección de *Pseudomonas* causada por *Pseudomonas aeruginosa*. En ciertas realizaciones, la respuesta inmunitaria inducida por el bioconjugado aquí descrito (véase la sección 5.3) o la composición aquí descrita (véase la sección 5.5) es eficaz para prevenir o tratar una infección de *Pseudomonas* por más de una cepa o serotipo de *Pseudomonas aeruginosa*.

En una realización específica, la respuesta inmunitaria inducida por un bioconjugado aquí descrito (véase la sección 5.3) o una composición aquí descrita (véase la sección 5.5) es eficaz para prevenir o tratar una infección causada por *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O1, O2, O3, O4, O5, O6, O7, O8, O9, O10, O11, O12, O13, O14, O15, O16, O17, O18, O19 u O20. En otra realización específica, dicho racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* es el racimo *rfb* de cualquiera de los serotipos descritos en Knirel y col., 2006, *Journal of Endotoxin Research* 12 (6): 324-336. En una realización específica, la respuesta inmunitaria inducida por el bioconjugado aquí descrito (véase la sección 5.3) o la composición aquí descrita (véase la sección 5.5) es eficaz para prevenir y/o tratar una infección causada por *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6. En una realización específica, la respuesta inmunitaria inducida por el bioconjugado aquí descrito (véase la sección 5.3) o la composición aquí descrita (véase la sección 5.5) es eficaz para prevenir y/o tratar una infección causada por *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O11. En una realización específica, dicha *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O11 es *Pseudomonas aeruginosa* de la cepa PA103 (véase, por ejemplo N.º Acceso Genbank KF364633.1).

En ciertas realizaciones, la respuesta inmunitaria inducida en un sujeto después de la administración del bioconjugado aquí descrito (véase la sección 5.3) o la composición aquí descrita (véase la sección 5.5) es eficaz para reducir uno o más síntomas que resultan de una infección por *Pseudomonas*.

En ciertas realizaciones, la respuesta inmunitaria inducida en un sujeto después de la administración del bioconjugado aquí descrito (véase la sección 5.3) o la composición aquí descrita (véase la sección 5.5) es eficaz para reducir la probabilidad de hospitalización de un sujeto que padece una infección de *Pseudomonas*. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria inducida en un sujeto después de la administración del bioconjugado aquí descrito (véase la sección 5.3) o la composición aquí descrita (véase la sección 5.5) es eficaz para reducir el tiempo de hospitalización de un sujeto que padece una infección de *Pseudomonas*.

## 5.7 Ensayos

### Ensayo para evaluar la capacidad de los bioconjugados para inducir una respuesta inmunitaria

La capacidad de los bioconjugados/composiciones aquí descritas para generar una respuesta inmunitaria en un sujeto se puede evaluar usando cualquier estrategia conocida para los expertos en la materia o descrita en la presente. En algunas realizaciones, la capacidad de un bioconjugado para generar una respuesta inmunitaria en un sujeto se puede evaluar inmunizando a un sujeto (p. ej., un ratón) o grupo de sujetos con un bioconjugado descrito en la presente, e inmunizando a un sujeto adicional (p. ej., un ratón) o grupo de sujetos con un control (PBS). Los sujetos o grupo de sujetos pueden ser provocados subsecuentemente con *Pseudomonas* y se puede determinar la capacidad de *Pseudomonas* para causar enfermedad en los sujetos o grupo de sujetos. Los expertos en la materia reconocerán que si el sujeto o grupo de sujetos inmunizados con el control padecen la enfermedad después de la provocación con *Pseudomonas*, pero el sujeto o grupo de sujetos inmunizados con el bioconjugado o composición del mismo descritos en la presente padece menos la enfermedad o no la padece, entonces el bioconjugado es capaz de generar una respuesta inmunitaria en el sujeto. La capacidad de uno o más bioconjugados o composición de los mismos aquí descritos para inducir un antisuero que reacciona de forma cruzada con un antígeno de *Pseudomonas* se puede probar, por ejemplo, por medio de un inmunoensayo tal como ELISA.

### Ensayos bactericidas *in vitro*

La capacidad de los bioconjugados aquí descritos para generar una respuesta inmunitaria en un sujeto se puede evaluar usando un ensayo bactericida del suero (SBA) o un ensayo de muerte opsonofagocítica (OPK), que representa un método establecido y aceptado que se ha utilizado para obtener la aprobación de vacunas basadas en glicoconjugado. Tales ensayos son muy conocidos en la técnica y, en resumen, comprenden los pasos de generar y aislar anticuerpos contra un objetivo de interés (p. ej., un antígeno de *Pseudomonas*), administrándole al sujeto (p. ej., un ratón) un compuesto que provoca tales anticuerpos. Subsecuentemente, la capacidad bactericida de los anticuerpos se puede evaluar, por ejemplo, cultivando la bacteria en cuestión en presencia de dichos anticuerpos y complemento y -dependiendo del ensayo- células neutrófilas, y valorando la capacidad de los anticuerpos para matar o neutralizar las bacterias, por ejemplo usando estrategias microbiológicas estándar.

## 6. Ejemplos

### Ejemplo 1: Las cepas bacterianas con una oligosacaryltransferasa insertada y un racimo *rfb* insertado son estables y producen bioconjugados

Este ejemplo demuestra que se pueden producir exitosamente bioconjugados con una cepa huésped bacteriana que ha sido modificada genéticamente por inserción de (i) un ácido nucleico que codifica una oligosacaryltransferasa y (ii) un ácido nucleico que codifica un racimo *rfb*.

Se generaron células huéspedes de *E. coli* modificadas insertando lo siguiente directamente en el genoma de la célula huésped: (i) un ácido nucleico que codifica la oligosacaryltransferasa (PglB) de *C. jejuni* y (ii) un ácido nucleico que codifica el racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa*, cepa PA103. Este racimo *rfb* codifica los genes necesarios para la síntesis del antígeno O de la *Pseudomonas aeruginosa* del serogrupo O11. Las inserciones se realizaron usando el método de inserción novedoso descrito en PCT/EP2013/071328 (véase la sección 5.2, arriba) o el sistema pUT mini

(Biomedal Lifescience). El método de inserción descrito en PCT/EP2013/071328 es específico del sitio y utiliza recombinación homóloga, mientras que el sistema pUT mini es una estrategia aleatoria mediada por transposón que da como resultado una secuencia de ácido nucleico de interés que se inserta aleatoriamente en el genoma de una célula huésped. Las células huéspedes de *E. coli* se modificaron adicionalmente por introducción de un plásmido que expresa exotoxina A (EPA) detoxificada de *Pseudomonas* como proteína portadora en las células huéspedes. De esta manera, las células huéspedes modificadas de *E. coli* descritas en este ejemplo expresan (i) la oligosacariiltransferasa (PglB) de *C. jejuni*, en virtud de la integración de un ácido nucleico que codifica la oligosacariiltransferasa en el genoma de la célula huésped; (ii) genes de un racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* que producen el antígeno O11, en virtud de la integración de un ácido nucleico que codifica el racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* de la cepa PA103 en el genoma de la célula huésped; y (iii) la proteína portadora EPA, en virtud de la transformación de la célula huésped con un plásmido que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína portadora.

Se generaron células huéspedes de *E. coli* modificadas adicionales para permitir la comparación de la capacidad de las células huéspedes modificadas que comprenden integraciones dobles (integración de una oligosacariiltransferasa e integración de un racimo *rfb*) para producir bioconjugados (EPA-O11), con la producción de bioconjugado por células huéspedes que tienen (i) sólo una integración simple de la oligosacariiltransferasa o el racimo *rfb*, y los componentes restantes (proteína portadora y oligosacariiltransferasa o racimo *rfb*) expresados por plásmido por la célula huésped; o (ii) sin componentes integrados, con todos los componentes (proteína portadora y oligosacariiltransferasa y racimo *rfb*) expresados por plásmido.

En el análisis se usaron tres cepas diferentes de *E. coli* de referencia: (i) "St4167" (W3110  $\Delta waaL$ ,  $\Delta rfbO16::rfbP.a.O11$ ), que comprende una supresión del gen *waaL* de *E. coli*, una supresión del racimo *rfb* O16 de *E. coli* y una inserción del racimo *rfb* O11 de *P. aeruginosa* (PCT/EP2013/071328); (ii) "St1128" (W3110  $\Delta waaL$ ), que comprende una supresión del gen *waaL* de *E. coli*; y (iii) "St1935" (W3110  $\Delta waaL$ ,  $\Delta wzzE-wecG$ ,  $\Delta wbbIJK$ ), que comprende la supresión de los genes indicados. Para la inserción del racimo *rfb* O11 de *P. aeruginosa* en St4167, el racimo *rfb* de O11 se clonó en el plásmido pDOC y se utilizó el método de acuerdo con el documento PCT/EP2013/071328. Las cepas St4167 representan las cepas de integración doble.

Los plásmidos específicos utilizados para introducir EPA en las cepas de la célula huésped se designan "p1077" y "p150". Este último se describe en Ihssen, y col. (2010) *Microbial cell factories* 9, 61, y los plásmidos son los mismos, excepto por el hecho de que p1077 reemplaza al casete Amp de p150 con un casete Kan.

Se generaron las siguientes variantes de St4167: (i) St4167 con *pglB* insertado en lugar del gen *yahL* de la célula huésped (mediante el método del documento PCT/EP2013/071328) y EPA expresada por el plásmido p1077; (ii) St4167 con *pglB* insertado en lugar del gen *ompT* de la célula huésped (usando el sistema pUT mini) y EPA expresada por el plásmido p150; (iii) St4167 con *pglB* expresado por el plásmido p1769 (*pglB* en pDOC) y EPA expresada por el plásmido p1077; (iv) St4167 con *pglB* expresado por el plásmido p939 (plásmido de expresión basado en pEXT21 para PglB con una etiqueta HA, codón optimizado) y EPA expresada por el plásmido p1077; y (v) St4167 con *pglB* expresado por el plásmido p1762 (*pglB* en pDOC) y EPA expresada por el plásmido p1077.

Se generaron las siguientes variantes de St1128: (i) St1128 con *pglB* expresado por el plásmido p939, racimo *rfb* O11 de *P. aeruginosa* expresado por el plásmido p164 (plásmido pLAFR manipulado para contener el racimo *rfb* O11 de *P. aeruginosa*) y EPA expresada por el plásmido p1077; y (ii) St1128 con *pglB* insertado en lugar del gen *yahL* de la célula huésped (mediante el método del documento PCT/EP2013/071328), racimo *rfb* O11 de *P. aeruginosa* expresado por el plásmido p164 y EPA expresada por el plásmido p1077.

Se generaron las siguientes variantes de St1935: (i) St1935 con *pglB* insertado en lugar del gen *ompT* de la célula huésped (mediante el método del documento PCT/EP2013/071328), racimo *rfb* O11 de *P. aeruginosa* expresado por el plásmido p164 y EPA expresada por el plásmido p1077; (ii) St1935 con *pglB* insertado en lugar del gen *yahL* de la célula huésped (mediante el método del documento PCT/EP2013/071328), racimo *rfb* O11 de *P. aeruginosa* expresado por el plásmido p164 y EPA expresada por el plásmido p1077; y St1935 con *pglB* expresado por el plásmido p939, racimo *rfb* O11 de *P. aeruginosa* expresado por el plásmido p164 y EPA expresada por el plásmido p1077.

Como se muestra en la figura 1, todas las cepas que expresan una oligosacariiltransferasa, proteína portadora y un racimo *rfb* produjeron bioconjugados. Véanse las manchas representadas entre los marcadores 100 y 130 kDa, que corresponden a EPA-O11. De forma importante, esta observación incluye cepas que comprenden integración doble de una oligosacariiltransferasa y un racimo *rfb*. Véanse en particular los resultados mostrados para St4167. De esta manera, este ejemplo demuestra que no sólo se pueden generar células huéspedes estables después de inserción doble de genes/racimos de genes en el genoma de la célula huésped, sino que también se mantiene la función de los genes. Específicamente, se conservó la función de la oligosacariiltransferasa insertada y el racimo *rfb* insertado, dando como resultado la producción de bioconjugados.

## **Ejemplo 2: Identificación de un gen de formiltransferasa que contribuye a la síntesis de un oligo/polisacárido del antígeno O de *P. aeruginosa* O6**

Este ejemplo describe la identificación de la formiltransferasa de O6 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Se buscaron datos de proteoma para O6 de *Pseudomonas aeruginosa* de la cepa "LESB58", cuyo genoma se conoce,

para encontrar dominios que contienen homología con los dominios prototipo de consulta "Formiltransferasa" y "dominio de tipo C-terminal de FMT" usando el algoritmo provisto en [www.supfam.org/SUPERFAMILY/](http://www.supfam.org/SUPERFAMILY/). La búsqueda identificó 9 secuencias de proteína con posibles dominios relacionados.

5 Para evaluar si alguno de los 9 candidatos identificados era específico para O6 (y con ello para una unidad de repetición del antígeno O formilado), se analizó su ausencia en el proteoma de otro serotipo de *Pseudomonas aeruginosa* (O5, cepa PAO1) usando una búsqueda BLAST (sitio web de NCBI). La estructura del antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa* O5 no está relacionada con la de *Pseudomonas aeruginosa* O6. Específicamente, no hay grupo formilo presente en la estructura O5. De los 9 candidatos 8 tuvieron homólogos en la *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O5, lo que indica que estas proteínas eran inespecíficas para la cepa LESB58 de *Pseudomonas*  
10 *aeruginosa* O6. El candidato restante (locus\_tag=PLES\_12061, GenBank: CAW25933.1; SEQ ID NO: 2) no tiene homología obvia en el serotipo O5 de *Pseudomonas aeruginosa* y por lo tanto se clasificó como específico para LESB58/serotipo O6 de *Pseudomonas aeruginosa*.

15 Para confirmar la especificidad de O6, se verificó la presencia de la formiltransferasa descubierta del serotipo O6 de *Pseudomonas aeruginosa* (SEQ ID NO: 2) en otras cepas del serotipo O6 de *Pseudomonas aeruginosa*. Se identificaron proteínas equivalentes a la formiltransferasa del serotipo O6 de *Pseudomonas aeruginosa* (SEQ ID NO: 2) en otras cuatro cepas del serotipo O6 de *Pseudomonas aeruginosa*, que incluyen la etiqueta de locus: PAK\_01412 en la cepa "PAK" y la etiqueta de locus: PAM18\_1171 en la cepa M18.

20 También se identificaron formiltransferasas con baja identidad de secuencia de aminoácidos con la formiltransferasa del serotipo O6 de *Pseudomonas aeruginosa* (SEQ ID NO: 2) en *Methylobacterium sp.* (33% de identidad, Acceso WP\_020093860), *Thiothrix nivea* (30% de identidad, Acceso WP\_002707142), *Anaerophaga thermohalophila* (28% de identidad, Acceso WP\_010422313), *Halorubrum californiense* (27% de identidad, Acceso WP\_008445073), *Azorhizobium caulinodans* (25% de identidad, Acceso WP\_012170036) y *Burkholderia glathei* (24% de identidad, Acceso KDR39707). Tomados juntos, estos análisis de homología indican que los genes relacionados codifican una actividad específica de O6 relacionada con la formilación.

25 Para probar la actividad funcional de la formiltransferasa del serotipo O6 de *Pseudomonas aeruginosa* (SEQ ID NO: 2) sobre la estructura no formilada de la unidad de repetición O6, se clonó el gen que codifica la SEQ ID NO: 2. El codón de iniciación raro TTG fue reemplazado por ATG. En la figura 5 se da una representación esquemática de la clonación de la formiltransferasa del serotipo O6 de *Pseudomonas aeruginosa* (SEQ ID NO: 2) en el racimo *rfb* de O6 de *Pseudomonas aeruginosa* y la organización relativa de los genes.

30 Una vez identificada, se evaluó la función de la formiltransferasa O6 de *Pseudomonas aeruginosa*. La formiltransferasa del serotipo O6 de *Pseudomonas aeruginosa* (SEQ ID NO: 2) se analizó para determinar su funcionalidad por coexpresión con los genes del racimo *rfb* O6 de *Pseudomonas aeruginosa* en las cepas de *E. coli* que carecen de un racimo de ECA funcional (*wec*). Para mostrar la formilación, se analizaron unidades de repetición de antígeno simples enlazadas a un núcleo de lípido (en una cepa *waaL* positiva). La unidad de repetición del antígeno O formilado O6 fue  
35 identificada por inmunodetección usando un anticuerpo específico para O6 (figura 3A), indicando que el grupo formilo es un epitopo relevante de la estructura del antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa* O6.

Para mostrar la formilación en el ámbito molecular, se analizaron unidades de repetición O6 por MALDI-MSMS. Unidades de repetición purificadas y marcadas con 2AB mostraron que la coexpresión de formiltransferasa del serotipo O6 de *Pseudomonas aeruginosa* (SEQ ID NO: 2) con los genes del racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* O6 produjo  
40 una señal de fluorescencia del pico principal que fue cambiada por 2-3 minutos (de 58 a 61 minutos, figura 3B).

El análisis de MALDI-MSMS del material contenido en los picos a 58 min dio como resultado una serie de fragmentación de ion Y que está en concordancia con la unidad de repetición O6 no formilada, N-acetilada, marcada con 2-AB. El ion precursor protonado,  $m/z = 905$ , se fragmentó en una serie de iones prominentes de 905  $\rightarrow$  759  $\rightarrow$  543  $\rightarrow$  326, que corresponde a pérdidas de 146 unidades (desoxihexosa), 216 unidades (ácido N-acetilhexosaminurónico amidado), 217 unidades (ácido N-acetilhexosaminurónico). El material recolectado a los 61 min obtenido de las células que expresan el gen de formiltransferasa del serotipo O6 de *Pseudomonas aeruginosa* contenía un ion precursor prominente de 891, que se fragmentó a 891  $\rightarrow$  745  $\rightarrow$  529  $\rightarrow$  326, que corresponde a pérdidas de 146 unidades (como arriba), 216 unidades (como arriba) y 203 unidades (ácido N-formilhexosaminurónico amidado). Estos datos probaron que la formilación es dependiente de la expresión de formiltransferasa del serotipo O6 de *Pseudomonas aeruginosa* y que consecuentemente el gen está codificando la formiltransferasa. De esta manera, el gen que codifica la formiltransferasa del serotipo O6 de *Pseudomonas aeruginosa* fue nombrada *fmtO6*. El hecho de que el grupo acetilo del ácido N-acetilhexosaminurónico amidado sea reemplazado por un grupo formilo, sugiere un mecanismo de dos pasos en donde primero el grupo acetilo es removido antes de que el grupo formilo se pueda añadir. Este modelo implica que un grupo amino libre estaría presente en C2 como un intermediario antes de que el dominio de formiltransferasa pegue un grupo formilo al monosacárido. De esta manera, el antígeno O desacetilado y no formilado puede ser una forma de polisacárido presente subestequiométricamente, inmunológicamente relevante, del serotipo O6 de *P. aeruginosa*.

### Ejemplo 3: Identificación y análisis del gen *wzy* para la polimerización del antígeno O de *P. aeruginosa* O6

Este ejemplo describe la identificación de la polimerasa *wzy* de *Pseudomonas aeruginosa* O6.

Los polisacáridos del antígeno O constituyen la superficie celular externa de muchas bacterias Gram negativas. La maquinaria enzimática responsable de la biosíntesis del antígeno O frecuentemente es codificada en un solo racimo de genes denominado el racimo *rfb*. Las cepas del serotipo O6 de *Pseudomonas aeruginosa* expresan un antígeno O polimérico (figura 2). Sin embargo, en el racimo de antígeno O respectivo, está ausente un gen que codifica una polimerasa del antígeno O (*wzy*). Esto significa que para expresar recombinantemente el antígeno O de *P. aeruginosa* O6 en *E. coli*, fue necesaria la identificación del gen *wzy*. Las polimerasas del antígeno O (*wzy*) son proteínas internas de la membrana integrales que catalizan la polimerización de unidades de repetición del antígeno O en el espacio periplásmico antes de la ligación “en bloque” con el oligosacárido de núcleo de lípido A para formar LPS. Las polimerasas *wzy* son altamente específicas para su oligómero de unidad de repetición y las homologías entre los genes *wzy* son bajas.

El antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa* O19 comparte similitudes estructurales con el de *Pseudomonas aeruginosa* O6. Se especuló que las proteínas *wzy* que reconocen ambas estructuras también podrían compartir propiedades similares, por ejemplo estructura, secuencia, número de dominios transmembrana. La secuencia de la proteína *Wzy* de O19 de *Pseudomonas aeruginosa* O19 (Acceso AAM27560) es conocida y se utilizó como una consulta primaria en un análisis de Blast usando el proteoma de la cepa PAK de *Pseudomonas aeruginosa* O6 como el sujeto para la búsqueda de homología.

Para evaluar si los candidatos identificados eran específicos para *Pseudomonas aeruginosa* O6, se analizó su presencia en el proteoma de otro serotipo de *Pseudomonas aeruginosa* (O5, cepa PAO1). La estructura del antígeno O, O5, no está relacionada con la de O6 y O19. Los 100 resultados principales se analizaron individualmente para determinar la presencia en el proteoma de *Pseudomonas aeruginosa* O5 usando análisis de Blast. De los 100 candidatos del proteoma de PAK, 97 tuvieron homólogos en el proteoma de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O5, lo que indica que estas proteínas estuvieron generalmente presentes en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y posiblemente no están relacionadas con la biosíntesis del antígeno O, O6. De los 100 candidatos, tres no tuvieron homólogo obvio en el proteoma de *Pseudomonas aeruginosa* O5 y por lo tanto se determinó que eran específicos de *Pseudomonas aeruginosa* O6.

Para probar si una de las tres proteínas candidatas identificadas era una *wzy* de *Pseudomonas aeruginosa* O6, las tres proteínas se usaron como consulta en un análisis de Blast. Uno de los tres candidatos, PAK\_01823 (O6wzy PAK\_01823; SEQ ID NO: 3), comparte identidad de secuencia de aminoácidos con otras polimerasas conocidas de unidad de repetición de oligosacárido, por ejemplo 25% de identidad con polimerasas de unidad de repetición de oligosacárido de *Streptococcus sanguinis* (Acceso WP\_004192559) y 22% de identidad con polimerasas de unidad de repetición de oligosacárido de *Escherichia coli* O139 (Acceso AAZ85718). De esta manera, se identificó PAK\_01823 (O6wzy PAK\_01823; SEQ ID NO: 3) como la *wzy* de *Pseudomonas aeruginosa* O6.

Para confirmar adicionalmente que la SEQ ID NO: 3 es la proteína codificada por la *wzy* de *Pseudomonas aeruginosa* O6, la localización subcelular de la proteína se predijo por bioinformática usando PSORTb ([www.psort.org/psortb/](http://www.psort.org/psortb/)). Se predijo que la proteína estaba localizada en la membrana citoplásmica con 11 dominios transmembrana, una característica que es común entre las polimerasas del antígeno O.

Se encontraron proteínas equivalentes a PAK\_01823 (O6wzy PAK\_01823; SEQ ID NO: 3) en otras cepas de *P. aeruginosa* O6-positivas, que incluyen la cepa LESB58 (que tiene una proteína *wzy* de *Pseudomonas aeruginosa* O6 con sólo 1 diferencia de aa en comparación con la cepa PAK y una cepa probada internamente).

Posteriormente, se efectuó un análisis funcional de *wzy* de *Pseudomonas aeruginosa* O6. El racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* O6, el gen *fmtO6* (esto es, el gen que codifica la SEQ ID NO: 2, expuesta en el ejemplo 2 anterior) y el gen que codifica *wzy* de *Pseudomonas aeruginosa* O6 (esto es, el gen que codifica la SEQ ID NO: 3), se coexpresaron en células de *E. coli* W3110  $\Delta$ wec, y el lipopolisacárido formado se analizó por inmunoelectrotransferencia (figura 4). El antisuero anti-O6 detectó una señal de tipo escalera sólo en la muestra que se origina de las células que contenían los tres transgenes, indicando que PAK\_01823 (O6wzy PAK\_01823; SEQ ID NO: 3) es en realidad la polimerasa de *P. aeruginosa* O6. De esta manera, el gen que codifica PAK\_01823 se denominó O6wzy.

Para generar un solo racimo de genes que contiene todos los elementos genéticos requeridos para permitirle a *E. coli* expresar recombinantemente el antígeno O de *P. aeruginosa* O6, los genes *fmtO6* y O6wzy (esto es, los genes que codifican las SEQ ID NO: 2 y 3, respectivamente) se clonaron secuencia abajo del racimo *rfb* de *P. aeruginosa* O6. En la figura 5 se da una representación esquemática de la clonación de la polimerasa O6wzy del antígeno O de *Pseudomonas aeruginosa* O6 de codón optimizado, en el racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* O6 clonado, junto con la formiltransferasa de O6, y la organización relativa de los genes. Además, se determinó que los genes *fmtO6* y O6wzy (esto es, los genes que codifican las SEQ ID NO: 2 y 3, respectivamente) se pueden insertar en el racimo *rfb* de *P. aeruginosa* O6 en muchas posiciones. Específicamente, el gen *fmtO6* se puede insertar en una orientación en el sentido de las manecillas del reloj con respecto al racimo *rfb* secuencia abajo del racimo *rfb* o secuencia arriba del racimo *rfb*, bajo el control de un promotor separado. Además, el gen *fmtO6* se puede insertar en una orientación en el sentido contrario a las manecillas del reloj con respecto al racimo *rfb*, secuencia arriba o secuencia abajo del racimo

*rfb*. El gen O6wzy se puede insertar en una orientación en el sentido de las manecillas del reloj con respecto al racimo *rfb*, secuencia arriba o secuencia abajo del racimo *rfb*, o secuencia arriba del racimo *rfb* bajo el control de un promotor separado. Todas las construcciones anteriormente descritas eran activas en cuanto a la biosíntesis del antígeno O de *P. aeruginosa* O6 (datos no mostrados).

#### 5 **Ejemplo 4: Las cepas bacterianas con una oligosacaryltransferasa insertada y un racimo *rfb* insertado, *rfb*O6 completado, son estables y producen bioconjugados**

El ejemplo 1 demuestra que los bioconjugados pueden ser producidos exitosamente por una cepa huésped bacteriana que ha sido modificada genéticamente por inserción de (i) un ácido nucleico que codifica una oligosacaryltransferasa y (ii) un ácido nucleico que codifica un racimo *rfb*. En este ejemplo se hicieron experimentos similares a los que se describen en el ejemplo 1 usando la proteína PcrV de *Pseudomonas* como proteína portadora.

Naturalmente, la secuencia primaria de aminoácidos de PcrV (véase, por ejemplo, UniProt O30527) no comprende una secuencia consenso de N-glicosilación ("glicositio"). Usando los métodos descritos en el documento WO 2006/119987, se construyeron variantes recombinantes de PcrV que comprenden uno, dos, tres, cuatro o cinco glicositios. En particular, mediante la manipulación de la secuencia de ácido nucleico que codifica PcrV, se crearon variantes de PcrV que expresaron una, dos, tres, cuatro o cinco de las secuencias consenso de N-glicosilación optimizada Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), en donde X y Z se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido natural, excepto Pro.

Se generaron células huéspedes de *E. coli* modificadas insertando directamente lo siguiente en el genoma de la célula huésped: (i) un ácido nucleico que codifica la oligosacaryltransferasa de *C. jejuni* (PglB), y (ii) un ácido nucleico que codifica el racimo *rfb* de la cepa PAK de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6. Este racimo *rfb* codifica los genes necesarios para la síntesis de antígeno O del antígeno de *Pseudomonas aeruginosa* del serogrupo O6. Las inserciones se realizaron usando el método de inserción novedoso descrito en el documento PCT/EP2013/071328 (véase la sección 5.2, arriba) o el sistema pUT mini (Biomedal Lifescience). Las células huéspedes de *E. coli* se modificaron adicionalmente por introducción de un plásmido que expresa PcrV que comprende de uno a cinco glicositios, como se describe arriba. De esta manera, las células huéspedes de *E. coli* modificadas descritas en este ejemplo expresan (i) la oligosacaryltransferasa (PglB) de *C. jejuni*, en virtud de la integración de un ácido nucleico que codifica la oligosacaryltransferasa en el genoma de la célula huésped; (ii) genes de un racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* que producen el antígeno O6, en virtud de la integración de un ácido nucleico que codifica el racimo *rfb* de la cepa PAK de *Pseudomonas aeruginosa* en el genoma de la célula huésped; y (iii) la proteína portadora PcrV modificada, en virtud de la transformación de la célula huésped con un plásmido que comprende un ácido nucleico modificado que codifica la proteína portadora (en donde el ácido nucleico ha sido modificado de tal manera que codifica de uno a cinco glicositios, como se describe arriba).

Se generaron células huéspedes de *E. coli* modificadas adicionales para permitir la comparación de la capacidad de las células huéspedes modificadas que comprenden integraciones dobles (integración de una oligosacaryltransferasa e integración de un racimo *rfb*) para producir bioconjugados (PcrV-O6), teniendo la producción de bioconjugado por las células huéspedes (i) sólo una integración de la oligosacaryltransferasa o el racimo *rfb*, y los componentes restantes (proteína portadora y oligosacaryltransferasa o racimo *rfb*) expresados por plásmido por la célula huésped; o (ii) ningún componente integrado, con todos los componentes (proteína portadora y oligosacaryltransferasa y racimo *rfb*) expresados por plásmido.

Se usaron tres cepas diferentes de *E. coli* y se compararon en el análisis: (i) "St7343", que comprende tanto *pglB* como el racimo *rfb* O6 completado insertados en el genoma de la célula huésped (esto es, es una cepa doblemente integrada), y un plásmido que codifica una proteína portadora PcrV (con uno, dos, tres, cuatro o cinco glicositios); (ii) "St7209", que comprende *pglB* expresado por plásmido, el racimo *rfb* O6 insertado en el genoma de la célula huésped, y un plásmido que codifica una proteína portadora PcrV (con uno, dos, tres, cuatro o cinco glicositios); y (iii) "St2182", que comprende *pglB* expresado por plásmido, racimo *rfb* O6 expresado por plásmido, y un plásmido que codifica una proteína portadora PcrV (con uno, dos, tres, cuatro o cinco glicositios). La figura 6 representa las características de cada cepa (6A: St7343; 6B: St7209; 6C: St2182).

Como se muestra en la figura 6, todas las cepas que expresan una oligosacaryltransferasa, proteína portadora y un racimo *rfb* produjeron bioconjugados. Véanse las manchas representados entre los marcadores de 40-70 kDa (alrededor del marcador de 55 kDa), que corresponden a PcrV-O6. Es importante, como se muestra en el ejemplo 1, que esta observación incluye cepas que comprenden integración doble de una oligosacaryltransferasa y un racimo *rfb*. Véanse en particular los resultados mostrados en la figura 6A. De esta manera, como en el ejemplo 1, este ejemplo demuestra que no sólo se pueden generar células huéspedes estables después de una inserción doble de genes/racimos de genes en el genoma de la célula huésped, sino que también se mantiene la función de los genes. Específicamente, se conserva la función de la oligosacaryltransferasa insertada y el racimo *rfb* insertado, dando como resultado la producción de bioconjugados.

#### **Ejemplo 5: Producción y purificación de bioconjugados EPA-O6**

Este ejemplo describe la producción de bioconjugados que comprenden el antígeno O6 de *Pseudomonas aeruginosa*.

La *E. coli* W3110  $\Delta$ waal  $\Delta$ wec  $\Delta$ rff se transformó con plásmidos que comprenden el racimo *rff* de O6 de *Pseudomonas aeruginosa*, la oligosacilartransferasa *pglB* de *C. jejuni*, el gen que codifica la proteína portadora EPA detoxificada y los genes de biosíntesis/transferasa de QuiNAc *wbpVLM* (de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* O6). En la figura 8 se presentan los resultados del análisis de retención de plásmido. Medio (caldo LB) suplementado con tetraciclina, espectinomicina, kanamicina y ampicilina se inoculó con células huéspedes que contenían los cuatro plásmidos. El precultivo se desarrolló durante la noche a 37° C. Al día siguiente, se inoculó medio (TB) suplementado con MgCl<sub>2</sub>, tetraciclina, espectinomicina, kanamicina y ampicilina diluyendo el precultivo a una DO<sub>600</sub> de 0,1. Las células se desarrollaron a 37° C hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de aproximadamente 0,8-1,0, después se indujo la expresión de *pglB*, *epa* y *wbpVLM* con la adición de IPTG 1 mM y arabinosa a 0,1%. Las células se cosecharon por centrifugación después de inducción durante la noche.

Los bioconjugados EPA-O6 se purificaron de los extractos periplásmicos de células huéspedes modificadas usando cromatografía de afinidad de quelato de metal (IMAC), cromatografía de intercambio aniónico (Fuente Q) y cromatografía de exclusión de tamaño (SEC). Las fracciones eluidas que contenían los glicoconjugados se reunieron y subsecuentemente se sometieron al siguiente paso de cromatografía. Los eluatos finales de SEC se caracterizaron por SDS-PAGE, seguido por tinción con azul de Coomassie o Western blot usando los anticuerpos indicados en la figura 7.

El bioconjugado EPA-O6 se caracterizó usando una serie de métodos analíticos. El nivel de endotoxina se midió usando el ensayo LAL (13 EU/ml). La pureza se determinó por SDS-PAGE y electroforesis en gel capilar (CGE, 86% de pureza). La cantidad de proteína se midió usando el ensayo BCA (1,75 mg/ml). La cantidad de polisacárido se midió usando el ensayo de antrona (Dubois *et al.*, 1956; 311.6 µg/ml). El tamaño promedio del O6-polímero se determinó usando una SDS-PAGE de "grado de glicosilación" ("DOG") de alta resolución (promedio de 7,9 unidades de repetición por polímero). La determinación de las isoformas eléctricas del bioconjugado se hizo por enfoque isoelectrónico (IEF). Finalmente, la identidad del bioconjugado se confirmó por inmunoelectrotransferencia usando anticuerpos dirigidos contra la proteína (EPA) o el polisacárido (O6).

#### 25 Ejemplo 6: Estudios de inmunización

Este ejemplo demuestra que el bioconjugado de O6 de *P. aeruginosa*-EPA es inmunogénico.

Ratones BALB/c OlaHsd hembras de 6 semanas de edad (en grupos de 25) se inmunizaron por vía intramuscular los días 0, 14 y 28 con 0,2 µg o 2 µg de conjugado O6-EPA (véase el ejemplo 5) en una formulación sin adyuvante o con adyuvante (con un adyuvante de emulsión aceite en agua). Un grupo de control de 10 ratones se vacunó con adyuvante solo (O/W). Los títulos de ELISA y opsónicos de anti-O6 se determinaron en el suero individual recolectado el día 42 (14 post III) y en el suero reunido Post -II y Post-III. Los resultados se muestran en la figura 9 y se describen más abajo en detalle.

La figura 9A representa la respuesta de ELISA anti-O6. El LPS-O6, O6 purificado (PaO6a,6c) se extendió a 8 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS) sobre placas de microtitulación de alta unión (Nunc Maxisorp), durante la noche a 4 °C. Las placas se bloquearon con PBS-BSA al 1% durante 30 minutos a RT con agitación. El antisuero de los ratones se diluyó previamente 1/10 y después se hicieron diluciones adicionales de dos veces en las microplacas y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación. Después de lavar, el anticuerpo murino enlazado se detectó usando anti-IgG de ratón (H+L) de cabra AffiniPure conjugado con peroxidasa de Jackson ImmunoLaboratories Inc. (ref: 115-035-003) diluido 1/5000 en PBS-Tween 0,05%-BSA 0,2%. Los anticuerpos de detección se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. El color se desarrolló usando 4 mg de OPD + 5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 10 ml de tampón citrato 0,1 M, pH 4,5, durante 15 minutos, en la oscuridad y a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 50 µl de HCl y la densidad óptica (DO) se leyó a 490 nm con respecto a 650 nm.

El nivel de los anticuerpos anti-O6 presentes en el suero se expresó en títulos de punto medio. Se calculó un GMT del suero individual para las 25 muestras de cada grupo de tratamiento (10 para el grupo de control).

Se observó una respuesta inmunitaria en los ratones después de la inyección del bioconjugado formulado con el adyuvante. No se observó diferencia entre las dosis. Se hicieron observaciones similares con respecto al porcentaje de seroconversión. No se observaron respuestas o se observaron respuestas muy débiles con la formulación sin adyuvante.

La figura 9B muestra el título opsónico en las células HL60 de ratones inmunizados con el bioconjugado O6-EPA formulado con adyuvante o sin adyuvante.

El ensayo de opsonofagocitosis (OPA) se realizó en microplacas de fondo redondo con 15 µl de células fagocíticas HL-60 (ajustadas a 5 10<sup>6</sup> células/ml), 15 µl de bacterias *P. aeruginosa* (desarrolladas en placa de agar TSA), 15 µl de las diluciones del suero de prueba y 15 µl del complemento de lechón. Primero, el suero de prueba reunido desactivado se diluyó (dilución final 1/16 o 1/50) en HBSS-BSA al 1% y se agregó a una cepa de *P. aeruginosa* O6 (ID de la cepa: HNCMB 170009, obtenida de la Colección Nacional de Bacterias Médicas de Hungría) diluida para contar 200-250 UFC/pocillo al final de la prueba.

Las células HL-60 (ajustadas a 5.10<sup>6</sup>/ml) y el complemento de lechón (12,5% final) se agregaron entonces en cada

poçillo. Se incluyó un control con complemento desactivado para cada muestra de prueba.

La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 90 minutos con agitación. Después de una dilución 1/200, se transfirieron 50 µl del volumen a una microplaca de fondo plano. Se agregaron 50 µl de agar MH seguido por PBS-agar a 0,9%. Se hizo el conteo automatizado de las colonias después de una incubación nocturna a 34 °C.

- 5 La actividad de opsonofagocitosis se expresa como el recíproco de la dilución del suero que da por lo menos 50% de muerte.

Los datos demuestran la funcionalidad de los anticuerpos inducidos después de la inyección del grupo con adyuvante.

En conclusión, este ejemplo demuestra que el bioconjugado de O6 de *P. aeruginosa*-EPA es tanto inmunogénico como funcional (esto es, induce anticuerpos que matan a *P. aeruginosa* O6 *in vivo*).

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GlaxoSmithKline Biologicals S.A. GlycoVaxyn AG

<120> CÉLULAS HUÉSPEDES MODIFICADAS Y USOS DE LAS MISMAS

<130> 103651PC

- 15 <140> TBA

<141> En la misma fecha que la presente

<150> 61/980.988

<151> 17-04-2014

<160> 3

- 20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

- 25 <220>

<223> Secuencia consenso de N-glicosilación

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

- 30 <223> Xaa = Asp o Glu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = cualquier aminoácido natural excepto Pro

- 35 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa = cualquier aminoácido natural excepto Pro

<220>

- 40 <221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa = Ser o Thr

<400> 1

**Xaa Xaa Asn Xaa Xaa**  
**1 5**

- 45

<210> 2

<211> 558

<212> PRT  
<213> Pseudomonas aeruginosa O6

<220>  
<223> formiltransferasa

5 <400> 2

ES 2 805 000 T3

Met Ser Trp Gln Leu Phe Ser Glu Lys Cys Arg Phe Leu Gly Ala Val  
1 5 10 15

Glu Ile Ser Gln His Phe Trp Gly Phe Ile Val Leu Glu Ala Ser Phe  
20 25 30

Gly Met Lys Ile Lys Ala Ala Leu Ile Val Asp Asp Leu Ser Leu Ser  
35 40 45

Glu Trp Gln Lys Arg Ala Ile Glu Asp Ser Ser Glu Tyr Leu Asp Ile  
50 55 60

Gln Leu Val Leu Ser Cys Arg Asn Ser Ala Thr Lys Lys Ser Val Ile  
65 70 75 80

Lys His Cys Gly Tyr Tyr Phe Leu Asn Ile Leu Ser Leu Lys Asn Asp  
85 90 95

Met Thr Arg Arg Val Gln Leu Asp Ser Arg Gly Ser Glu Val Ile His  
100 105 110

Phe Asp Ser Asp Tyr Glu Gly Ala Trp Gln Arg Ile Pro Glu Asp Val  
115 120 125

Cys Ala Arg Ile Leu Asp Lys Gly Ile Lys Leu Val Ile Lys Phe Gly  
130 135 140

Met Ser Leu Leu Arg Ile Asp Gly Gly Leu Gln Arg Leu Asp Ile Leu  
145 150 155 160

Ser Tyr His His Gly Asp Pro Glu Tyr Tyr Arg Gly Arg Pro Ala Gly  
165 170 175

Phe Tyr Glu Ile Tyr Glu Asn Ala Asp Ser Val Gly Ile Ile Val Gln  
180 185 190

Lys Leu Ser Asn Lys Leu Asp Ala Gly Glu Val Leu Val Arg Gly Tyr  
195 200 205

Ser Lys Val His His His Ser Tyr Lys Lys Thr Ser Arg Asn Phe Tyr  
210 215 220

Leu Asn Ser Val Val Leu Leu Arg Lys Ala Leu Val Asn Tyr Ser Arg  
225 230 235 240

Gly Glu Gln Val Val Leu Glu Lys Leu Gly Lys Asn Tyr Arg Leu Pro  
245 250 255

ES 2 805 000 T3

Ser Asn Phe Thr Val Phe Lys Phe Phe Cys Lys Thr Ile Phe Arg Gly  
 260 265 270

Leu Ala Arg Leu Ser Tyr Gly Ala Phe Phe Glu Lys Lys Trp Asn Val  
 275 280 285

Val Ala Leu Pro Tyr Asn Asp Ile Pro Ser Leu Gln Glu Leu Ser Val  
 290 295 300

Ser Ala Gly Lys Ile Pro Lys Val Glu Lys Gly Tyr Thr Phe Tyr Ala  
 305 310 315 320

Asp Pro Phe Phe Ser Ala Asp Gly Lys Leu Ile Arg Leu Glu Ala Leu  
 325 330 335

Asn Ala Ser Asn Gly Leu Gly Glu Ile Ile Glu Leu Lys Ala Gln Ser  
 340 345 350

Leu Asp Phe Ser Arg Val Ile Leu Lys Gly Asn His Phe Ser Tyr Pro  
 355 360 365

Tyr Ser Phe Glu Ala Ser Gly Val Glu Tyr Leu Ile Pro Glu Val Ala  
 370 375 380

Ser His Ser Ala Pro Cys Leu Leu Pro Pro Pro Phe Ala Leu Glu Ser  
 385 390 395 400

Lys Lys Leu Phe Gln Gly Met Glu Gly Glu Arg Ile Leu Asp Gly Thr  
 405 410 415

Leu Phe Glu His Gly Gly Arg Tyr Tyr Leu Phe Cys Gly Gln Ala Val  
 420 425 430

Ser Gly Ser Asp Asn Leu Tyr Leu Tyr Val Gly Glu Ser Leu Glu Gly  
 435 440 445

Pro Tyr Thr Ser His Pro Cys Asn Pro Val Val Met Asn Pro Gly Ser  
 450 455 460

Ala Arg Met Gly Gly Arg Ile Phe Lys Glu Gly Gly Lys Leu Tyr Arg  
 465 470 475 480

Phe Gly Gln Asn Asn Ser Tyr Gly Tyr Gly Ser Ser Leu Ala Val Asn  
 485 490 495

Glu Ile Glu Val Leu Asp Pro Glu His Tyr Ser Glu Lys Arg Val Ala  
 500 505 510

ES 2 805 000 T3

Asn Leu Ala Phe Gln Asp Ala Arg Gly Pro His Thr Ile Asp Ile His  
515 520 525

Gly Gln Thr Met Ile Leu Asp Phe Tyr Gln Asp Arg Phe Ser Leu Leu  
530 535 540

Ala Gly Tyr Arg Arg Leu Val Ala Arg Leu Leu Ser Arg Gly  
545 550 555

5 <210> 3  
<211> 417  
<212> PRT  
<213> Pseudomonas aeruginosa O6

<220>  
<223> polimerasa wzy  
10 <400> 3

ES 2 805 000 T3

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

Ala Arg Leu Leu Ala Arg Ser Ala Ile His Pro Ser Val Ala Met Pro  
 20 25 30

Ile Thr Trp Gly Leu Gly Leu Ile Gly Val Ser Leu Ala Ser Leu Ile  
 35 40 45

Gly Phe Tyr Arg Val Glu Ser Asp Ala Leu Leu Ile Phe Leu Phe Gly  
 50 55 60

Val Met Ser Phe Ser Leu Ser Ala Gly Cys Phe Ser Phe Leu Tyr Asn  
 65 70 75 80

Gly Tyr Phe Arg Ala Pro Ser Ser Asn Phe Leu Phe Asp Ser Glu Leu  
 85 90 95

Arg Thr Arg Ala Leu Val Ile Phe Phe Cys Leu Ala His Ile Val Phe  
 100 105 110

Leu Thr Val Ile Tyr Arg Asp Leu Ser Ser Ile Ala Pro Thr Leu Arg  
 115 120 125

Glu Ala Ala Tyr Met Ala Arg Ala Gln Ser Val Ser Gly Glu Pro Val  
 130 135 140

Leu Ser Ser Leu Ser Met Asn Tyr Leu Gln Leu Gly Gln Thr Val Ile  
 145 150 155 160

ES 2 805 000 T3

Pro Leu Val Val Leu Leu Tyr Leu Arg Gly Lys Cys Gly Val Leu Gly  
 165 170 175

Phe Leu Ala Ile Ser Val Pro Trp Met Gly Val Ile Leu Leu Ala Ser  
 180 185 190

Gly Arg Ala Ser Leu Met Gln Met Leu Val Gly Leu Phe Phe Ile Tyr  
 195 200 205

Ile Leu Val Lys Gly Ser Pro Ser Leu Lys Ser Leu Leu Val Ile Gly  
 210 215 220

Leu Ala Met Phe Leu Val Ile Ala Val Gly Ala Val Ala Thr Ser Lys  
 225 230 235 240

Ile Gln Phe His Glu Gly Asp Gly Ile Ser Thr Leu Phe Ile Glu Leu  
 245 250 255

Tyr Arg His Val Ala Gly Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Val Leu Phe Asp  
 260 265 270

Arg Tyr Tyr Gln Gly Ser Ile His Leu Glu Pro Tyr Trp Ser Pro Leu  
 275 280 285

Asn Gly Phe Cys Ser Ile Leu Ala Thr Val Gly Leu Cys Gln Lys Pro  
 290 295 300

Pro Leu His Leu Asp Phe Tyr Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Leu Gly Asn  
 305 310 315 320

Val Tyr Ser Met Phe Phe Ser Met Tyr Pro His Tyr Gly Ala Leu Gly  
 325 330 335

Val Ile Gly Val Met Ala Leu Tyr Gly Met Leu Cys Ser Tyr Ala Tyr  
 340 345 350

Cys Lys Ala Lys Lys Gly Ser Leu Tyr Phe Thr Val Leu Ser Ser Tyr  
 355 360 365

Leu Phe Ser Ala Ile Val Phe Ser Leu Phe Ser Asp Gln Ile Ser Thr  
 370 375 380

Ser Trp Trp Phe Tyr Val Lys Met Thr Ile Ile Leu Gly Ile Leu Cys  
 385 390 395 400

Phe Val Phe Arg Arg Asp Arg Met Phe Val Ile Arg Leu Pro Gln Ala  
 405 410 415

Gly

**REIVINDICACIONES**

1. Una célula huésped que comprende:
  - i. un ácido nucleico que codifica una glicosiltransferasa derivada de un racimo *rfb* de *Pseudomonas*;
  - ii. un ácido nucleico que codifica una enzima formiltransferasa, en donde dicho ácido nucleico codifica una proteína que tiene aproximadamente, o por lo menos, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad u homología con la SEQ ID NO: 2, o en donde dicho ácido nucleico codifica la SEQ ID NO: 2;
  - iii. un ácido nucleico que codifica una oligosacariiltransferasa; y
  - iv. un ácido nucleico que codifica una proteína portadora que comprende una secuencia consenso de N-glicosilación D/E-X-N-X-S/T, en donde X es cualquier aminoácido excepto prolina.
2. La célula huésped de la reivindicación 1, que comprende además un ácido nucleico que codifica una polimerasa wzy, en donde dicho ácido nucleico codifica una proteína que tiene aproximadamente, o por lo menos, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad u homología con la SEQ ID NO: 3, o en donde dicho ácido nucleico codifica la SEQ ID NO: 3.
3. La célula huésped de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la glicosiltransferasa deriva de un racimo *rfb* de *Pseudomonas aeruginosa* del serotipo O6.
4. La célula huésped de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha célula huésped es *E. coli*.
5. Un método de producción de un bioconjugado que comprende un antígeno de *Pseudomonas* enlazado con una proteína portadora, comprendiendo dicho método cultivar la célula huésped de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en condiciones adecuadas para la producción de proteínas.
6. Un bioconjugado producido por el método de la reivindicación 5, en donde dicho bioconjugado comprende un antígeno de *Pseudomonas* enlazado con una proteína portadora.
7. Un bioconjugado que comprende un antígeno de *Pseudomonas aeruginosa* de serotipo O6 conjugado con una proteína portadora a través del resto N de al menos una secuencia consenso de N-glicosilación D/E-X-N-X-S/T, en donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, en donde el antígeno O6 está formilado.
8. El bioconjugado de la reivindicación 7, en donde el antígeno O6 comprende un grupo formilo unido a por lo menos 1 resto de GalNFmA.
9. El bioconjugado de la reivindicación 8, en donde por lo menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 100 % de las unidades de repetición del antígeno O están formiladas.
10. El bioconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 8-9 para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad causada por infección por *Pseudomonas* en un sujeto humano.
11. El bioconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 8-9 para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad causada por infección por *Pseudomonas* en un sujeto humano.

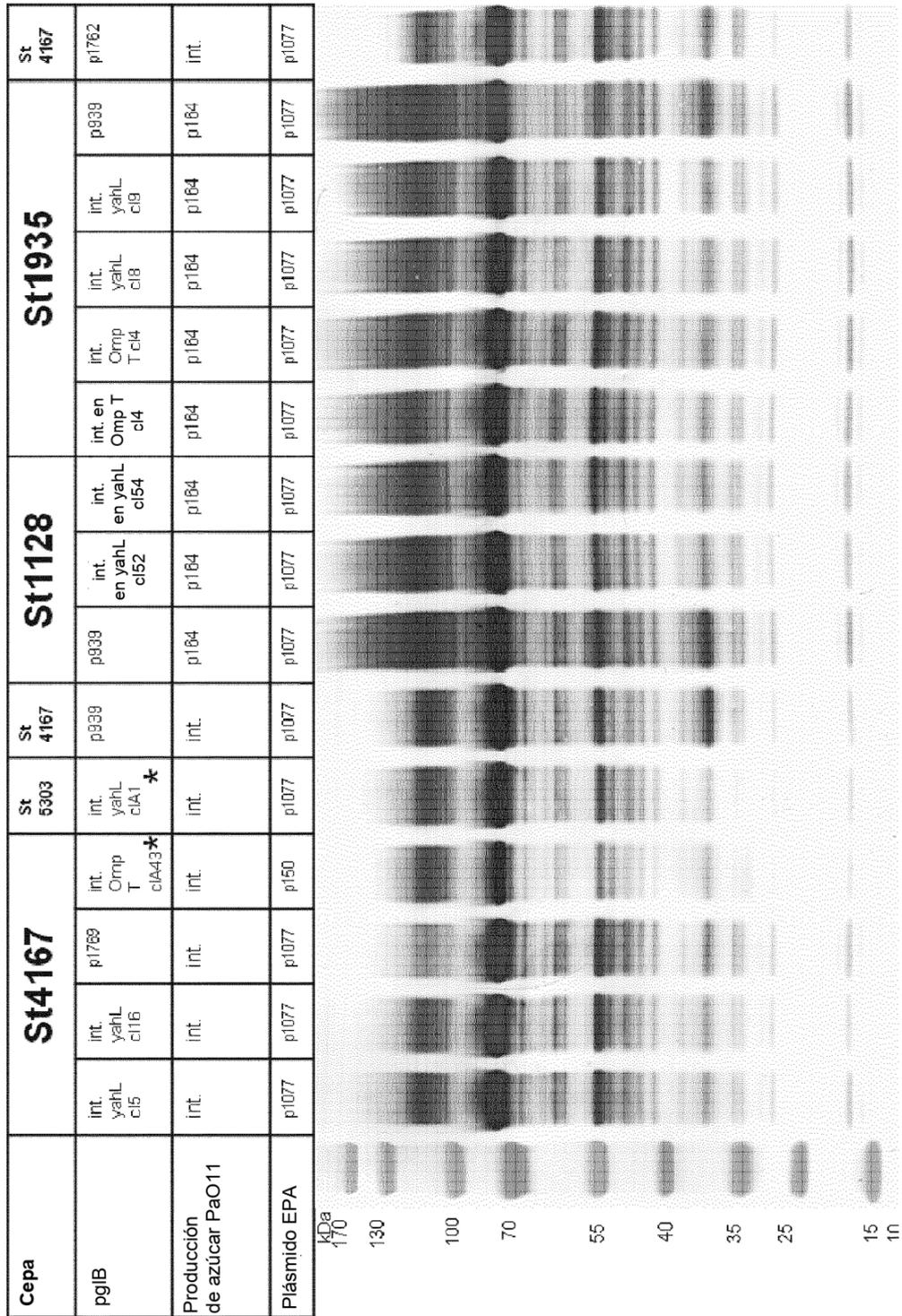


FIG. 1

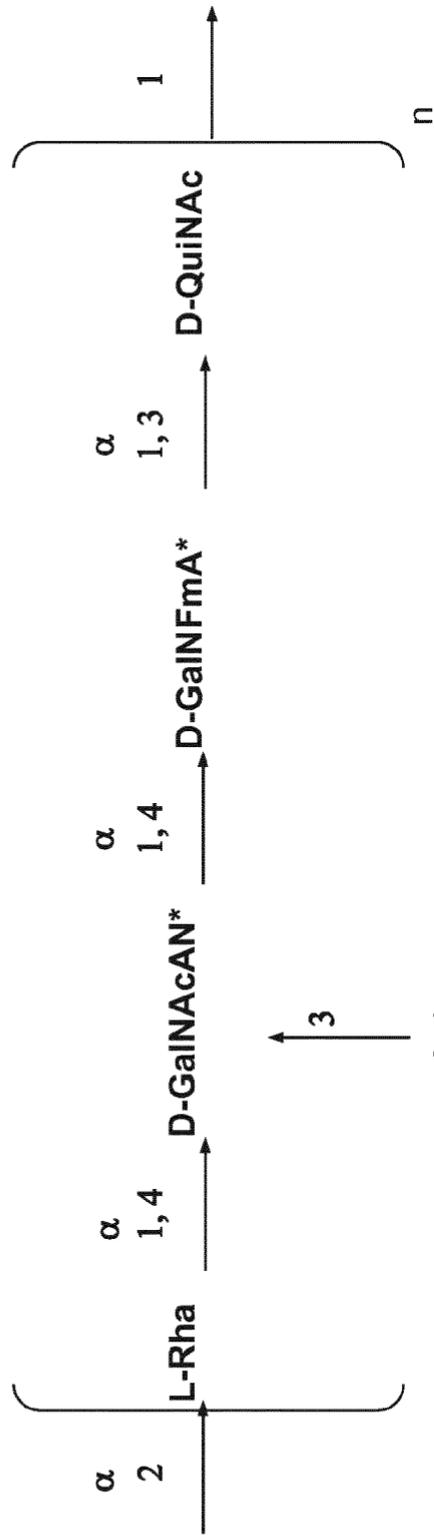


Fig. 2

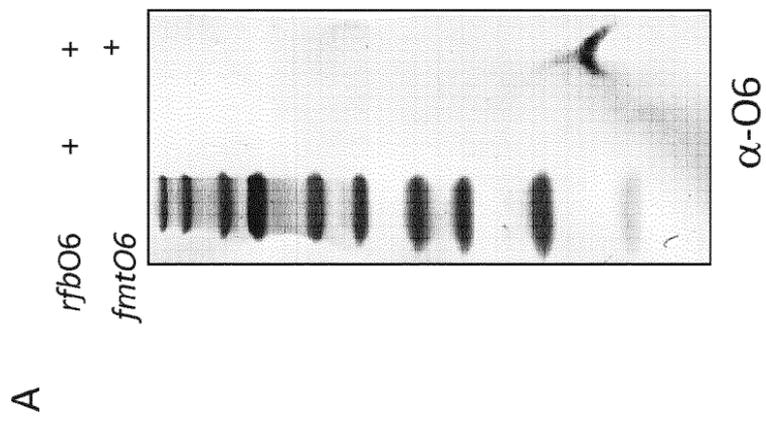
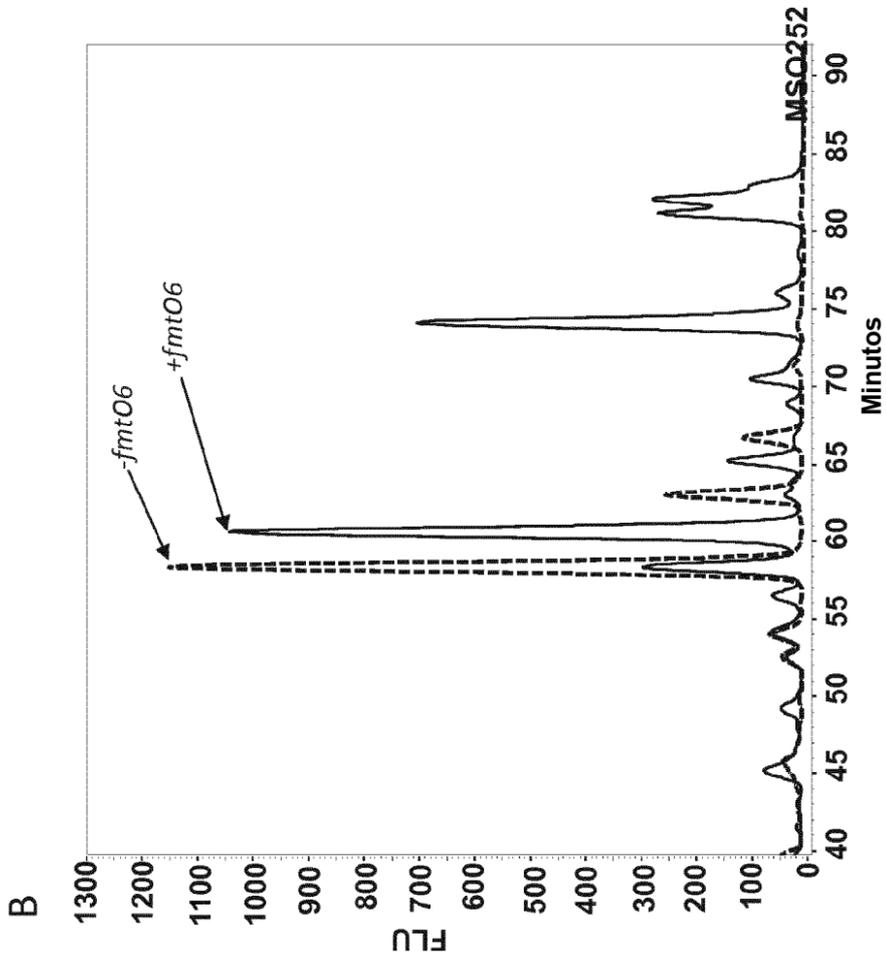


Fig. 3A-3B

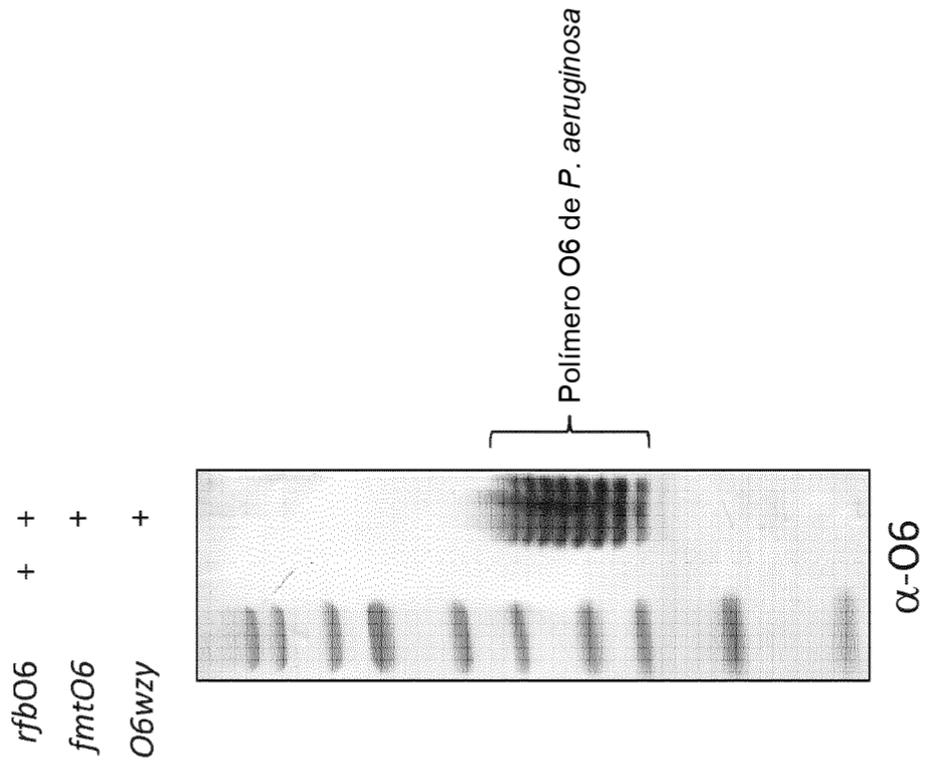


Fig. 4

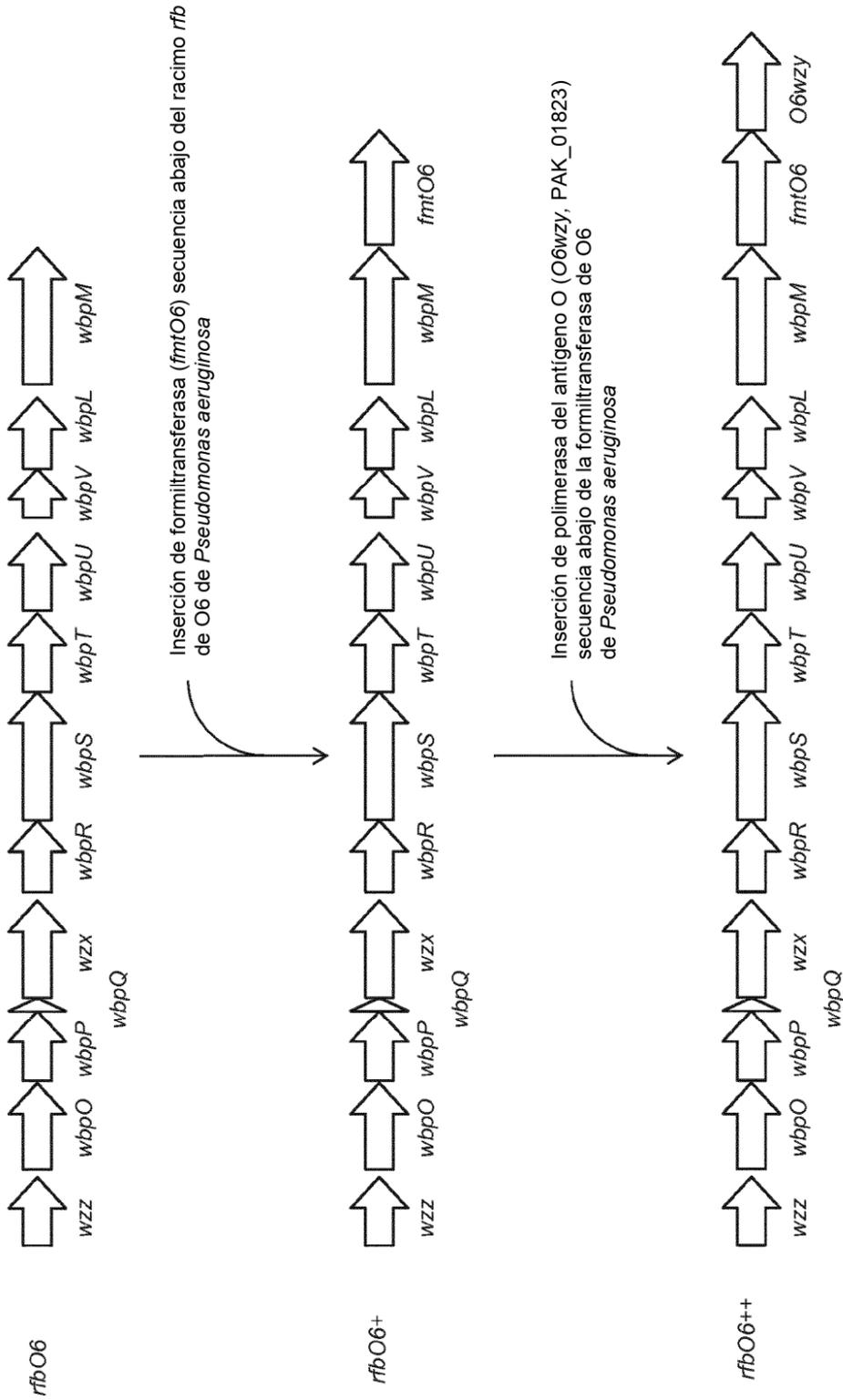


Fig. 5

Carril	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Muestra	M	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Cepa		St7343								
Pa06		genómico								
pgIB		genómico								
PcrV		p1536	p1538	p1794	p1809	p1994	p1995	p2016	p2019	p2020
# glicositos		1		2		3		4	5	
mutaciones		2	4	2+4	4+6	1+4+6	1+4+7	2+5+7+26	1+4+6+7+26	1+2+6+7+8

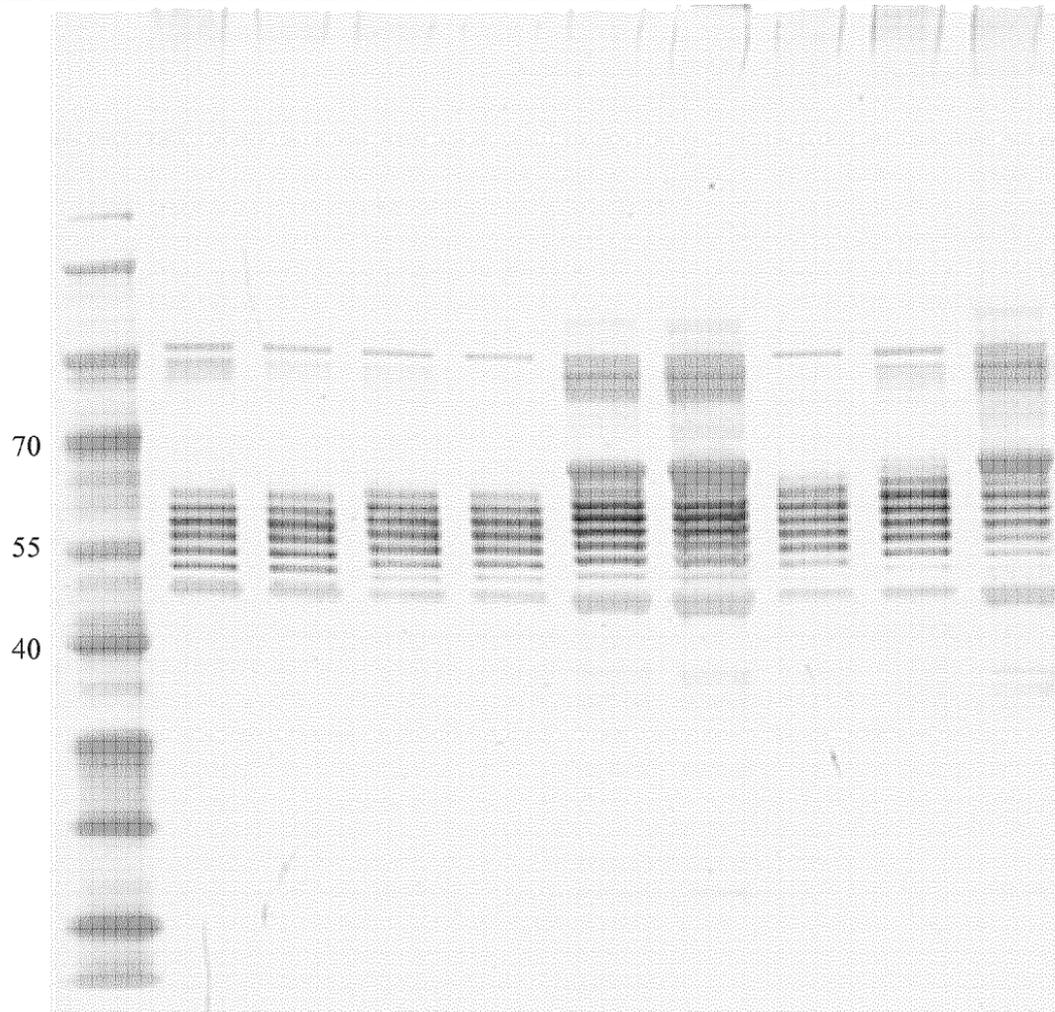


Fig. 6A

<b>Carril</b>	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<b>Muestra</b>	10	11	12	13	11	15	16	17	18	M
<b>Cepa</b>	St7209									
<b>PaO6</b>	genómico									
<b>pgIB</b>	p939									
<b>PcrV</b>	p1536	p1538	p1794	p1809	p1994	p1995	p2016	p2019	p2020	
<b># glicositos</b>	1	1	2	2	3	3	4	5	5	
<b>mutaciones</b>	2	4	2+4	4+6	1+4+6	1+4+7	2+5+7+28	1+4+5+6+28	1+2+6+7+28	

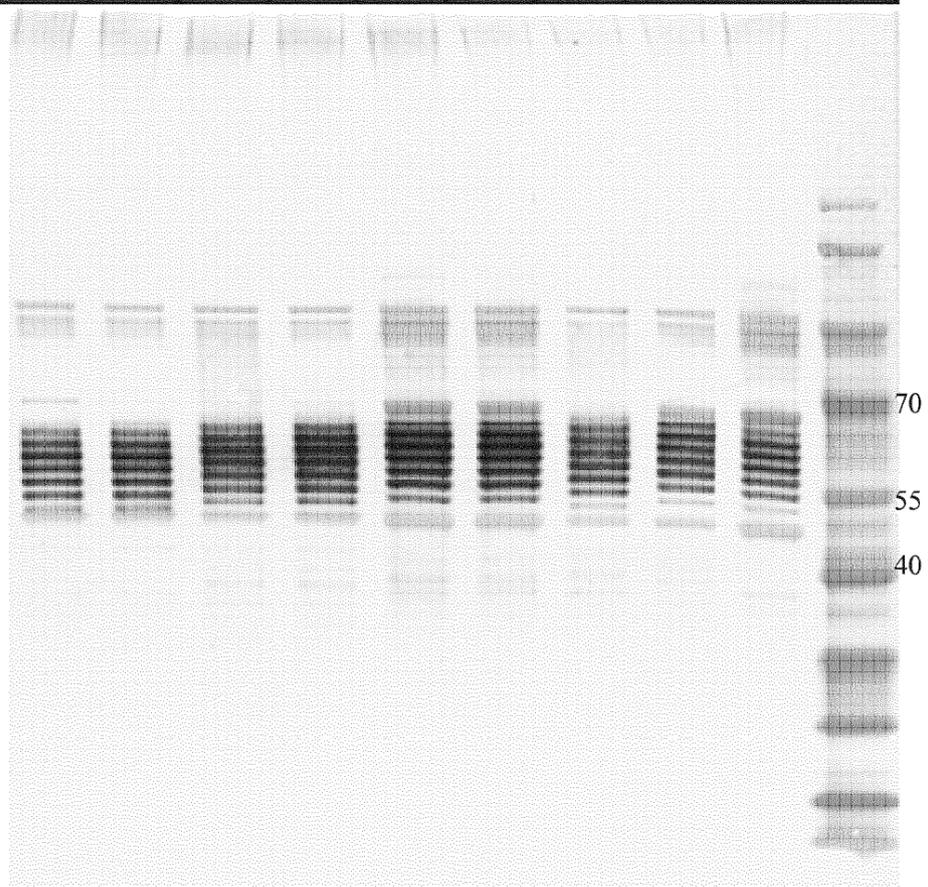


Fig. 6B

Carril	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Muestra	III	2	11	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Cepa		ST343	ST309	St2182								
PaO6		genómico	genómico	p1521								
pgIB		genómico	p939	p939								
PcrV		p1538	p1538	p1538	p1538	p1794	p1809	p1994	p1995	p2016	p2019	p2020
# glicositos		1	1	1	1	2	2	3	3	4	5	5
mutaciones		4	4	2	4	2+4	4+6	1+4+6	1+4+7	2+6+7+28	1+4+5+6+28	1+2+6+7+28

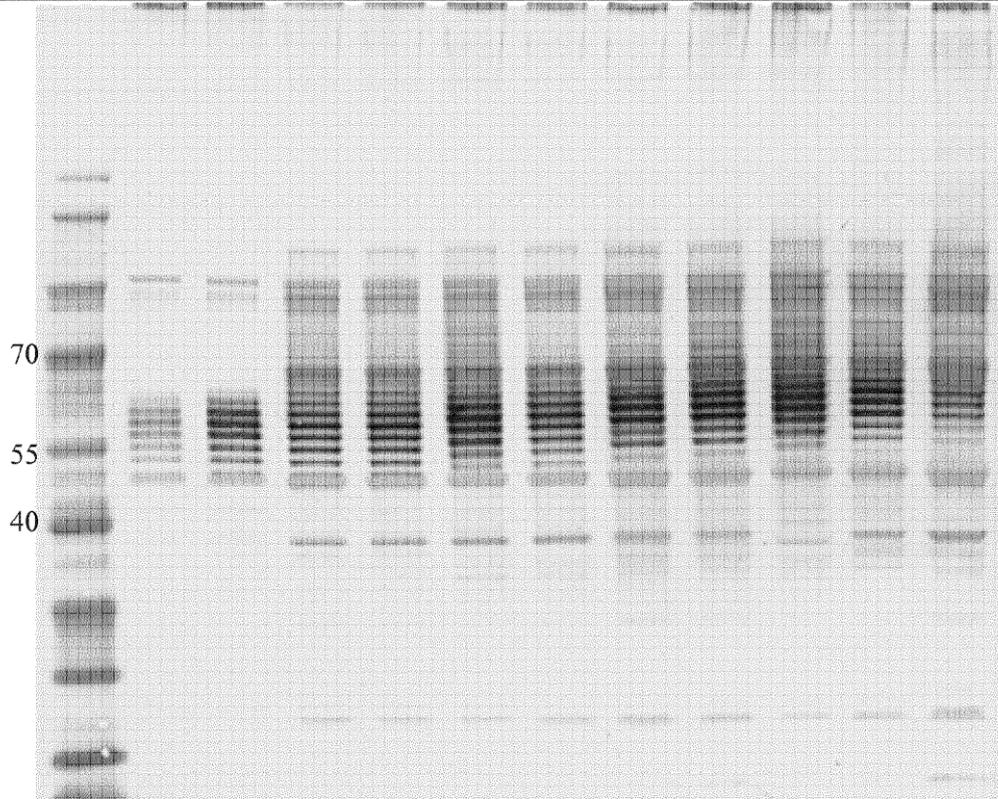


Fig. 6C

EPA-06

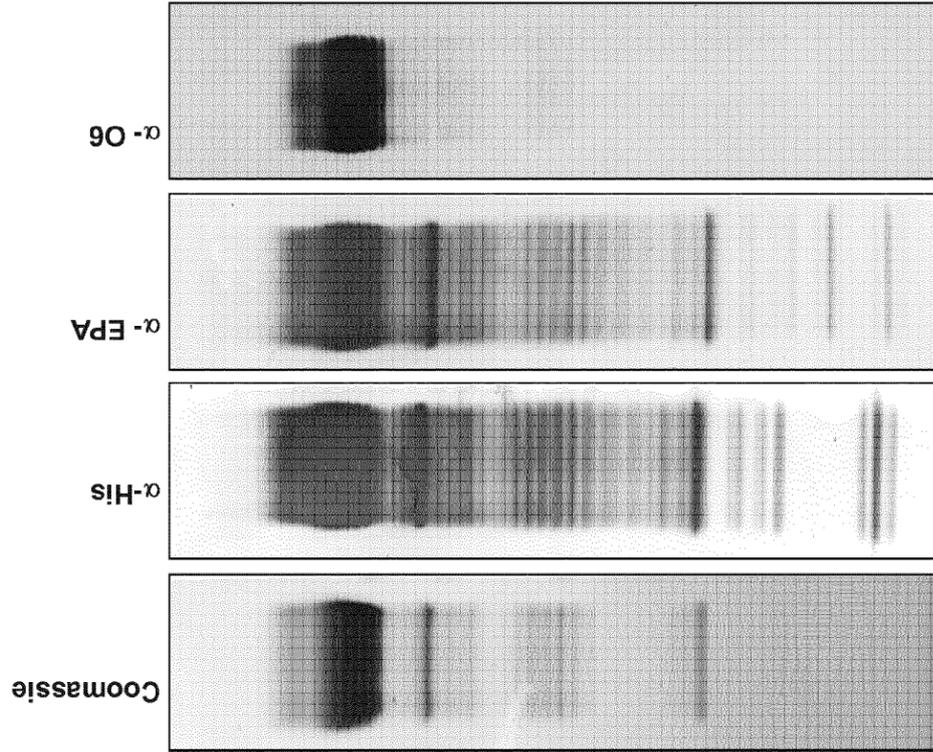


Fig. 7

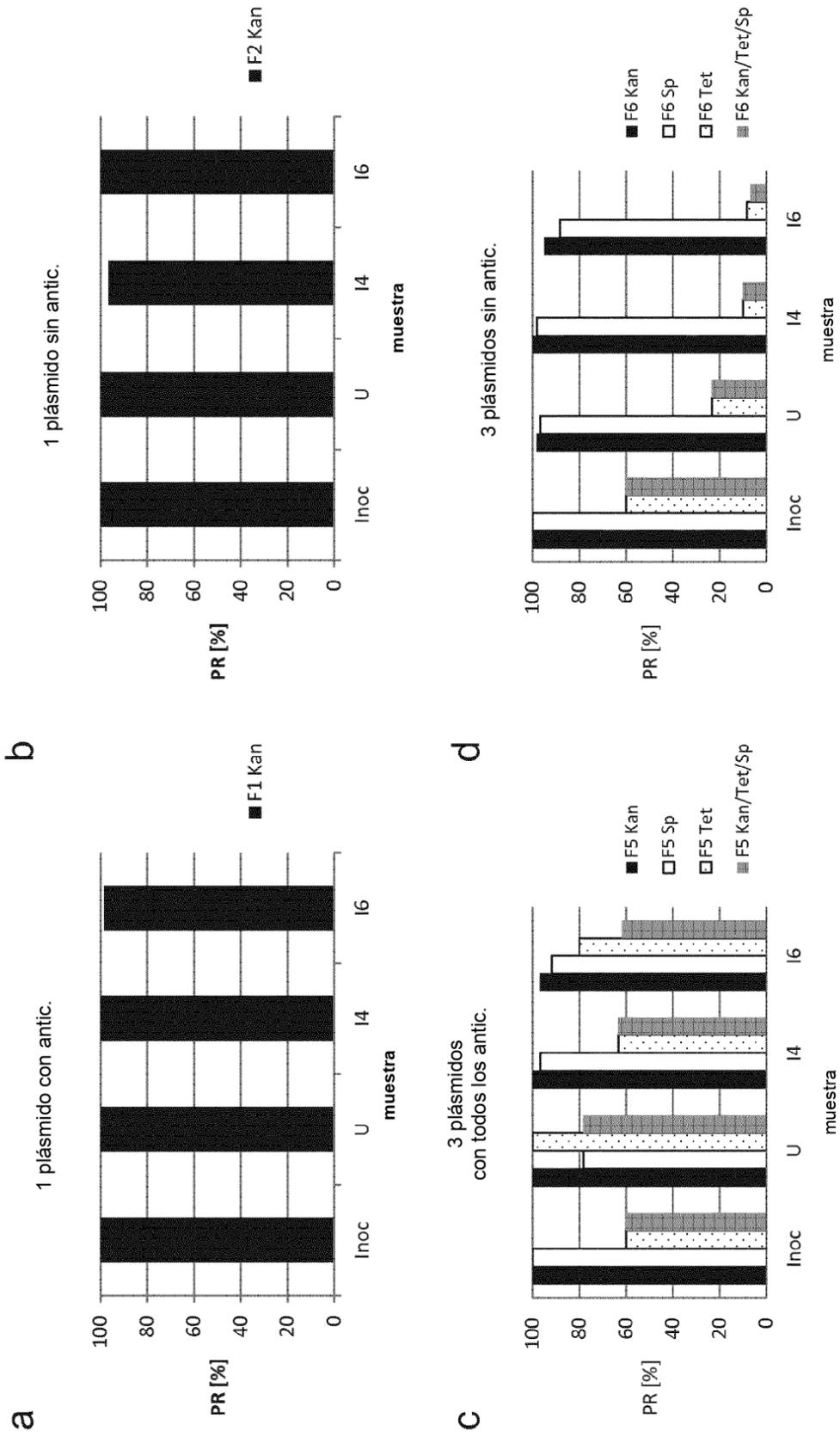


Fig. 8A-D

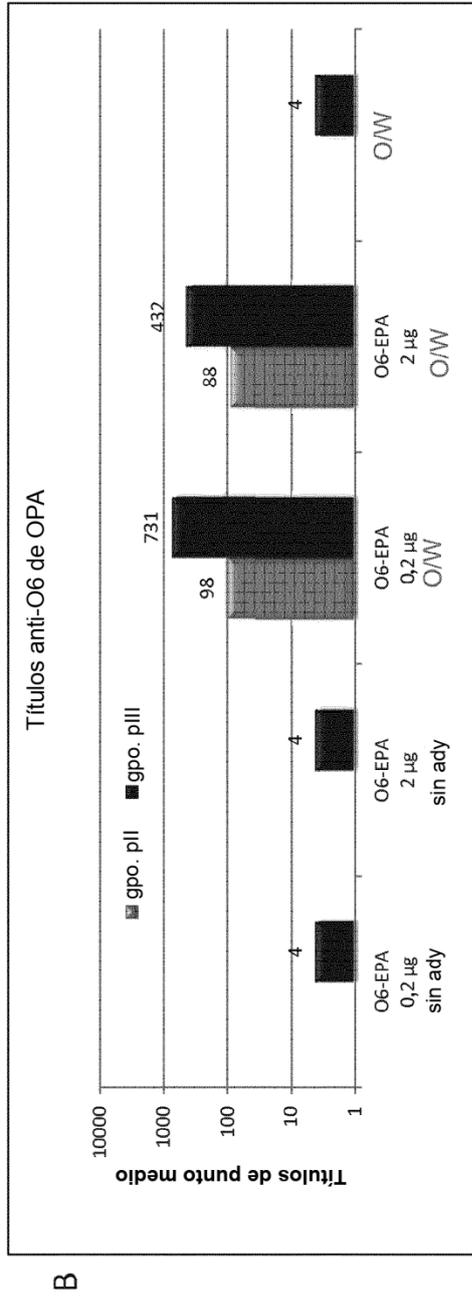
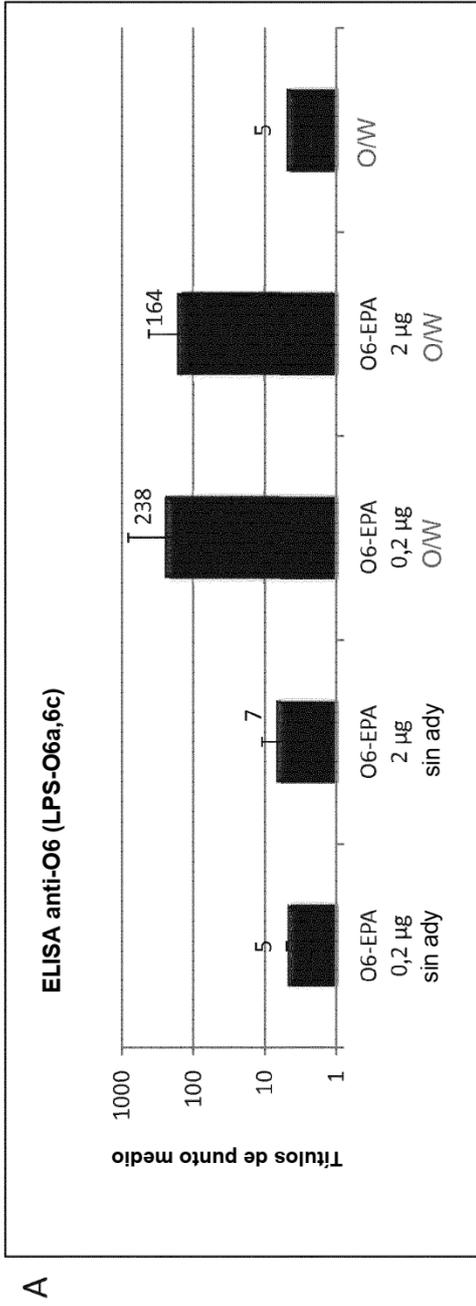


Fig. 9A-B