



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0033764

(51)⁷ A61K 39/02; C07K 14/24

(13) B

(21) 1-2016-03576

(22) 23/02/2015

(86) PCT/EP2015/053739 23/02/2015

(87) WO 2015/124769 A1 27/08/2015

(30) 61/943,710 24/02/2014 US

(45) 25/10/2022 415

(43) 26/12/2016 345A

(73) GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A (BE)

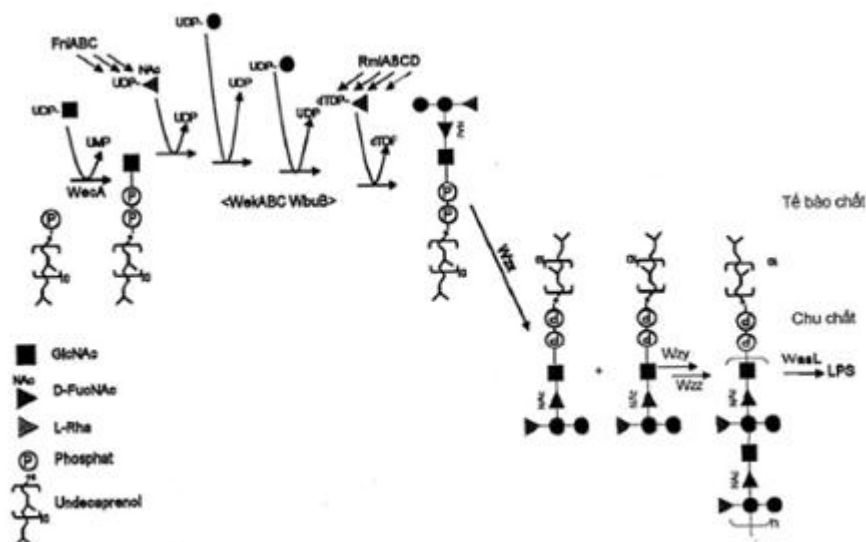
Rue de L'Institut 89, B-1330 Rixensart, Belgium.

(72) KOWARIK, Michael, T. (CH); WETTER, Michael, L. (CH); KEMMLER, Stefan, J. (CH); HAEUPTLE, Micha, A. (CH); GAMBILLARA, Veronica (CH); MALLY, Manuela (CH).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) CHẾ PHẨM CHỨA PHỨC HỢP SINH HỌC O25B VÀ TẾ BÀO CHỦ KHÔNG NHÂN SẢN XUẤT PHỨC HỢP SINH HỌC O25B

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ, dược phẩm, chứa phức hợp sinh học chứa O25B. Chế phẩm này có thể được sử dụng làm vaccin chống lại sự nhiễm trùng với ExPEC, và có thể còn chứa một hoặc nhiều phức hợp sinh học khác. Sáng chế cũng đề cập đến tế bào chủ không nhân chứa enzyme (ví dụ, glycosyltransferaza) được sử dụng trong quá trình sản xuất O25B. Tế bào chủ theo sáng chế sản xuất phức hợp sinh học O25B, trong đó phức hợp sinh học này chứa O25B được liên kết với protein mang.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến cấu trúc của kháng nguyên O25B của *E. coli*, cũng như sử dụng O25B, phương pháp sản xuất O25B, và phức hợp sinh học chứa O25B. Các tác giả sáng chế đã xác định được cụm gen của *E.coli* chịu trách nhiệm cho sự sản xuất O25B và xác định được một cách đầy đủ đặc trưng cấu trúc của kháng nguyên O25B này. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến axit nucleic có khả năng sản xuất O25B trong tế bào chủ. Sáng chế còn đề cập đến tế bào chủ, ví dụ, tế bào chủ được biến đổi tái tổ hợp, chứa axit nucleic có khả năng sản xuất O25B. Tế bào chủ này có thể được sử dụng để tạo ra phức hợp sinh học chứa O25B được liên kết với protein mang, mà có thể được sử dụng trong, ví dụ, dược phẩm trị liệu (ví dụ, vaccin). Kháng nguyên O25B theo sáng chế còn hữu dụng để tạo ra kháng thể, mà có thể được sử dụng, ví dụ, trong phương pháp trị liệu như tạo miễn dịch thụ động cho đối tượng cần điều trị. Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm chứa O25B, ở dạng riêng rẽ hoặc kết hợp với các kháng nguyên khác của *E.coli* (ví dụ, O1, O2, và O6 và các kiểu huyết thanh phụ của chúng), để sử dụng trong phương pháp trị liệu, ví dụ, tạo ra chủng ngừa cho vật chủ để chống lại sự nhiễm khuẩn *E.coli* (ví dụ, *E.coli* gây bệnh ngoài đường ruột, như gây bệnh viêm màng não).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hàng năm, *E.coli* gây bệnh ngoài đường ruột (Extraintestinal pathogenic *E.coli* - ExPEC) gây ra rất nhiều các bệnh nhiễm trùng khác nhau mà có thể gây ra sự hoành hành của bệnh tật, dẫn đến tử vong, và tiêu tốn chi phí điều trị liên quan rất lớn. Nhiễm trùng đường tiết niệu là tình trạng bệnh lý hay gặp nhất mà ExPEC gây ra đối với con người. Tuy nhiên, ExPEC còn gây ra các tình trạng bệnh lý có thể đe dọa đến tính mạng, như bệnh viêm màng não và sự nhiễm trùng.

Việc vi khuẩn kháng lại thuốc đối với thuốc kháng sinh là mối quan ngại lớn trong cuộc chiến chống lại sự nhiễm khuẩn, và chủng *E.coli* kháng đa thuốc (Multi-drug resistant - MDR) ngày càng trở nên phổ biến (xem, Schito et al., 2009, Int. J. Antimicrob. Agents 34(5):407-413; và Pitout et al., 2012, Expert Rev. Anti.

Infect. Ther. 10(10):1165-1176). Do đó, có nhu cầu đối với việc phát triển loại vacxin hiệu quả chống lại ExPEC.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân chứa axit nucleic mã hóa enzym (ví dụ, glycosyltransferaza) có khả năng sản xuất polysacarit theo sáng chế, O25B của *E. coli*. Sáng chế còn đề cập đến tế bào chủ chứa axit nucleic mã hóa enzym (ví dụ, glycosyltransferaza) có khả năng sản xuất các kháng nguyên khác của *E. coli*, ví dụ, O25A, O1, O2, và O6, và các kiểu huyết thanh phụ của chúng. Tế bào chủ theo sáng chế có thể biểu hiện một cách tự nhiên axit nucleic đặc hiệu cho sự sản xuất kháng nguyên O liên quan, hoặc tế bào chủ có thể được tạo ra để biểu hiện axit nucleic này, cụ thể hơn, theo một số phương án axit nucleic này không tương đồng với tế bào chủ. Theo một số phương án, tế bào chủ theo sáng chế chứa axit nucleic mã hóa enzym khác có hoạt tính đối với quá trình N-glycosyl hóa của protein, ví dụ, tế bào chủ theo sáng chế có thể còn chứa axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza hoặc axit nucleic mã hóa glycosyltransferaza khác. Theo một số phương án, tế bào chủ theo sáng chế chứa axit nucleic mã hóa protein mang, ví dụ, protein mà oligosacarit và/hoặc polysacarit có thể được gắn vào để tạo ra phức hợp sinh học. Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*. được mô tả trong mục “Tế bào chủ” dưới đây.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân chứa cụm gen *rfb*(upec138) của *E. coli* (SEQ ID NO:12), hoặc cụm gen mà tương đồng khoảng hoặc ít nhất là 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% tương đồng với cụm gen *rfb*(upec138) của *E. coli* (SEQ ID NO:12). Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân chứa cụm gen *rfb(upec163)* của *E. coli*, hoặc cụm gen mà tương đồng khoảng hoặc ít nhất là 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% tương đồng với cụm gen *rfb(upec163)* của *E. coli*. Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân chứa cụm gen *rfb(upec177)* của *E. coli*, hoặc cụm gen mà tương đồng khoảng hoặc ít nhất là 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% tương đồng với cụm gen *rfb(upec177)* của *E. coli*. Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân được biến đổi tái tổ hợp để chứa (ví dụ, bằng cách đưa (bổ sung) một hoặc nhiều vectơ/plasmit vào trong tế bào chủ) một, hai, ba, bốn, hoặc nhiều hơn các gen sau đây (hoặc axit nucleic mà tương đồng khoảng hoặc ít nhất là 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% tương đồng với một trong số các gen sau đây): *rmlB* (SEQ ID NO:1), *rmlD* (SEQ ID NO:2), *rmlA* (SEQ ID NO:3), *rmlC* (SEQ ID NO:4), *wzx* (SEQ ID NO:5), *wekA* (SEQ ID NO:6), *wekB* (SEQ ID NO:7), *wzy* (SEQ ID NO:8), *wbbJ* (SEQ ID NO:9), *wbbK* (SEQ ID NO:10), và/hoặc *wbbL* (SEQ ID NO:11). Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ

không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza (ví dụ, oligosacaryltransferaza không tương đồng). Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân được biến đổi tái tổ hợp để chứa (ví dụ, bằng cách đưa một hoặc nhiều vecto/plasmit vào trong tế bào chủ) một, hai, ba, bốn, hoặc nhiều hơn các enzym sau đây (i) dTDP-Glucoza 4,6-dehydrataza; (ii) dTDP-6-Deoxy-D-Glucoza 3,5-epimeraza; (iii) Glucoza-1-phosphat thymidyltransferaza; (iv) dTDP-4-dehydrorhamnoza 3,5-epimeraza; (v) flippaza kháng nguyên O; (vi) dTDP-Rha:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP α -1,3-rhamnosyltransferaza; (vii) UDP-Glc:Rha-GlcNAc-UPP α -1,3-glucosyltransferaza; (viii) polymeraza của kháng nguyên O; (ix) O-acetyl transferaza; (x) UDP-Glc:Rha-GlcNAc-UPP α -1,3-glucosyltransferaza; và/hoặc (xi) dTDP-Rha: GlcNAc-UPP α -1,3-rhamnosyltransferaza. Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza (ví dụ, oligosacaryltransferaza dị chủng). Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Theo một số phương án, tế bào chủ không nhân theo sáng chế được loại bỏ hoặc bất hoạt chức năng của một hoặc nhiều gen. Xem mục “Nền di truyền” dưới đây. Theo một phương án cụ thể, một hoặc nhiều trong số các gen *waaL*, gen *gtrA*, gen *gtrB*, gen *gtrS*, hoặc cụm gen *rfb* (hoặc gen hoặc gen trong cụm *rfb*) được loại

bỏ hoặc làm bất hoạt chức năng từ bộ gen của tế bào chủ không nhân theo sáng chế.

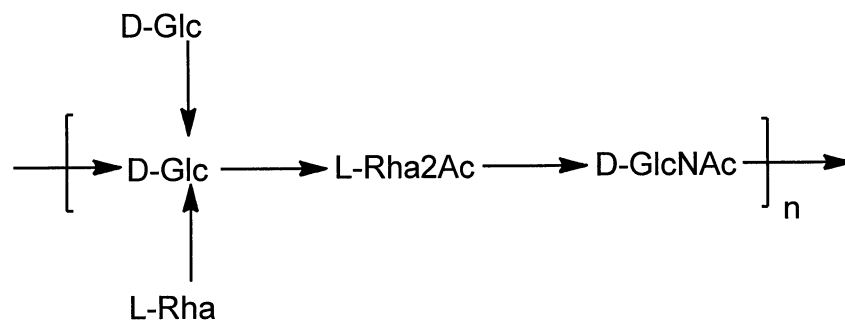
Protein mang được biểu hiện bởi tế bào chủ không nhân theo sáng chế có thể là được chọn từ protein mang bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, ngoại độc tố (Exotoxin) A được khử độc tính của *P. aeruginosa* (EPA; xem, ví dụ, Ihssen, et al., (2010) *Microbial cell factories* 9, 61), CRM197, protein gắn kết maltoza (maltose binding protein - MBP), giải độc tố bạch cầu, giải độc tố uốn ván, tan huyết tố được khử độc tính của *S. aureus*, yếu tố kết cụm A, yếu tố kết cụm B, FimH của *E. coli*, FimHC của *E. coli*, độc tố đường ruột không bền nhiệt của *E. coli*, biến thể được khử độc tính của độc tố đường ruột không bền nhiệt của *E. coli*, tiểu đơn vị B của độc tố cholera (Cholera toxin B - CTB), độc tố cholera, biến thể được khử độc tính của độc tố cholera, protein Sat của *E. coli*, vùng chờ của protein Sat của *E. coli*, Pneumolysin của *Streptococcus pneumoniae* và biến thể được khử độc tính của chúng, AcrA của *C. jejuni*, và glycoprotein tự nhiên của *C. jejuni*. Theo một phương án cụ thể, protein mang được biểu hiện bởi tế bào chủ không nhân theo sáng chế là ngoại độc tố được khử độc tính của *Pseudomonas* (EPA). Theo một số phương án, protein mang của tế bào chủ theo sáng chế chứa trình tự tín hiệu (trình tự đích) để hướng protein mang vào trong chu chất của tế bào chủ. Theo một phương án cụ thể, trình tự đích là từ DsbA của *E. coli*, porin A lớp màng ngoài của *E. coli* (outer membrane porin A - OmpA), protein gắn kết maltoza của *E. coli* (MalE), pectat lyaza của *Erwinia carotovora* (PelB), FlgI, NikA, hoặc endoxylanaza của *Bacillus sp.* (XynA), độc tố LTIIb đường ruột không bền nhiệt của *E. coli*, endoxylanaza XynA của *Bacillus*, hoặc flagellin của *E. coli* (FlgI). Theo một số phương án, trình tự axit nucleic mã hóa protein mang được biểu hiện bởi tế bào chủ theo sáng chế được biến đổi (ví dụ, bằng kỹ thuật tái tổ hợp) để mã hóa một hoặc nhiều trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); và/hoặc trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một số phương án, protein mang được biểu hiện bởi tế bào chủ

theo sáng chế chứa hai, ba, bốn, năm hoặc nhiều hơn các trình tự điều hòa này. Xem, mục “Protein mang” dưới đây.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất protein mang được N-glycosyl hóa (còn được gọi là phức hợp sinh học) mà chứa protein mang (ví dụ, EPA) được tạo liên kết thông qua nguyên tử N với kháng nguyên O của *E. coli* (ví dụ, O25B của *E. coli*), phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế dưới các điều kiện thích hợp để sản xuất protein, và tinh chế protein mang được N-glycosyl hóa. Phương pháp sản xuất protein bằng cách sử dụng tế bào chủ, ví dụ, *E. coli*, và phân lập protein được tạo ra bởi tế bào chủ, là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem mục “Tế bào chủ” dưới đây.

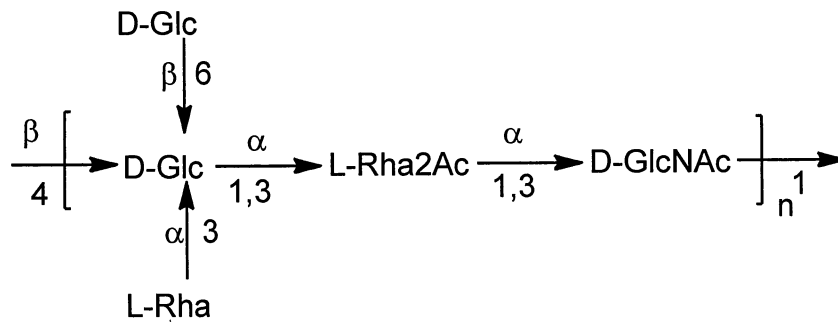
Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phức hợp sinh học được tạo ra bởi tế bào chủ theo sáng chế. Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến phức hợp sinh học chứa protein mang (ví dụ, EPA) được tạo liên kết thông qua nguyên tử N với O25B của *E. coli*. Xem mục “Phức hợp sinh học” dưới đây.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến phức hợp sinh học (“bioconjugate”) chứa protein mang (ví dụ, EPA) được liên kết với hợp chất có công thức O25B, như được thể hiện dưới đây:



trong đó n là số nguyên có giá trị nằm trong khoảng từ 1 đến 30, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 5, 10 đến 30, 15 đến 30, 20 đến 30, 25 đến 30, 5 đến 25, 10 đến 25, 15 đến 25, 20 đến 25, 10 đến 20, hoặc 15 đến 20. Theo một phương án cụ thể, protein mang được tạo liên kết thông qua nguyên tử N với kháng nguyên O của công thức O25B.

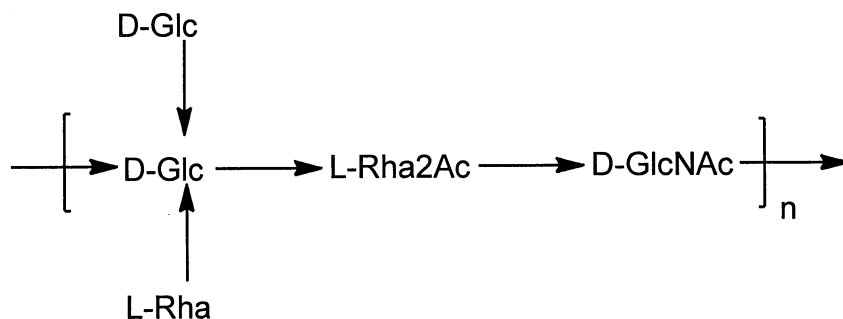
Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến phức hợp sinh học chứa protein mang (ví dụ, EPA) được liên kết với hợp chất có công thức O25B', như được thể hiện dưới đây:



trong đó n là số nguyên có giá trị nằm trong khoảng từ 1 đến 30, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 5, 10 đến 30, 15 đến 30, 20 đến 30, 25 đến 30, 5 đến 25, 10 đến 25, 15 đến 25, 20 đến 25, 10 đến 20, hoặc 15 đến 20. Theo một phương án cụ thể, protein mang được tạo liên kết thông qua nguyên tử N với kháng nguyên O của công thức O25B'.

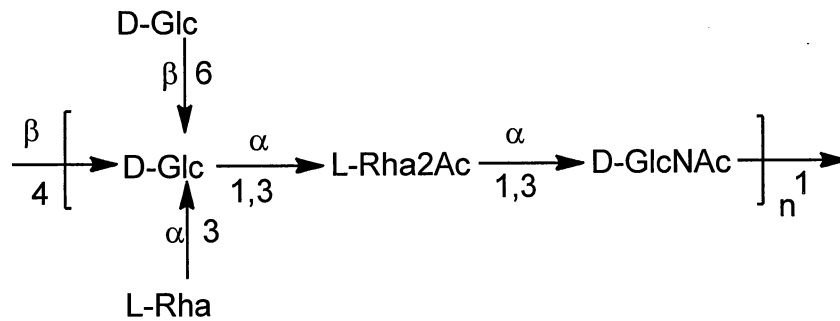
Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng nguyên O được phân lập từ chủng ExPEC *E. coli*, trong đó chủng này tạo ra O25B. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng nguyên O được phân lập từ chủng *E. coli* upec138. Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng nguyên O được phân lập từ chủng *E. coli* upec163, Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng nguyên O được phân lập từ chủng *E. coli* upec177. Xem mục “Kháng nguyên O của *E. coli*” dưới đây.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến hỗn hợp các đại phân tử (“macromolecule”) được phân lập có công thức O25B, như được thể hiện dưới đây:



trong đó n là số nguyên có giá trị nằm trong khoảng từ 1 đến 30, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 5, 10 đến 30, 15 đến 30, 20 đến 30, 25 đến 30, 5 đến 25, 10 đến 25, 15 đến 25, 20 đến 25, 10 đến 20, hoặc 15 đến 20. Theo một phương án cụ thể, n của ít nhất 80% của các đại phân tử trong hỗn hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 30, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 5, 10 đến 30, 15 đến 30, 20 đến 30, 25 đến 30, 5 đến 25, 10 đến 25, 15 đến 25, 20 đến 25, 10 đến 20, hoặc 15 đến 20.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến hỗn hợp các đại phân tử được phân lập có công thức O25B', như được thể hiện dưới đây:

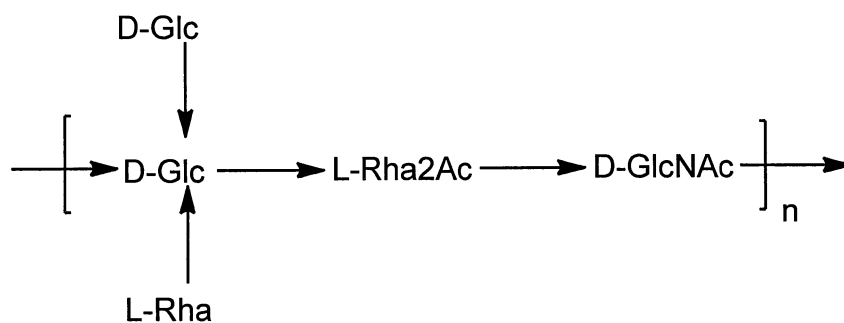


trong đó n là số nguyên có giá trị nằm trong khoảng từ 1 đến 30, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 5, 10 đến 30, 15 đến 30, 20 đến 30, 25 đến 30, 5 đến 25, 10 đến 25, 15 đến 25, 20 đến 25, 10 đến 20, hoặc 15 đến 20. Theo một phương án cụ thể, n của ít nhất 80% của các đại phân tử trong hỗn hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 30, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 5, 10 đến 30, 15 đến 30, 20 đến 30, 25 đến 30, 5 đến 25, 10 đến 25, 15 đến 25, 20 đến 25, 10 đến 20, hoặc 15 đến 20.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra kháng thể kháng O25B bằng cách sử dụng O25B và/hoặc phức hợp sinh học chứa O25B. Sáng chế còn đề cập đến kháng thể được tạo ra theo phương pháp này. Xem mục “Kháng thể kháng O25B” dưới đây.

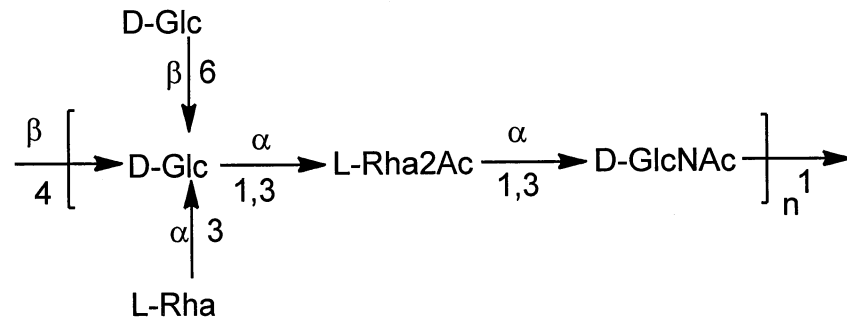
Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ, chế phẩm dược dụng (sau đây, còn gọi là dược phẩm), chứa phức hợp sinh học theo sáng chế và/hoặc đại phân tử (hoặc hỗn hợp của chúng) theo sáng chế. Xem mục “Chế phẩm” dưới đây.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ, dược phẩm, chứa đại phân tử chứa cấu trúc có công thức O25B:



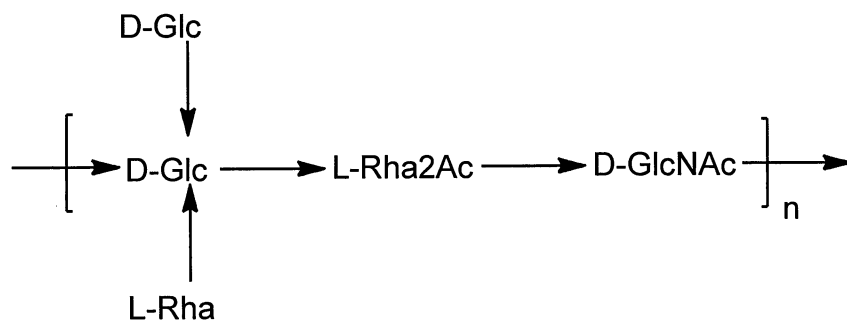
trong đó n là số nguyên có giá trị nằm trong khoảng từ 1 đến 30, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 5, 10 đến 30, 15 đến 30, 20 đến 30, 25 đến 30, 5 đến 25, 10 đến 25, 15 đến 25, 20 đến 25, 10 đến 20, hoặc 15 đến 20.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ, dược phẩm, chứa đại phân tử chứa cấu trúc có công thức O25B':



trong đó n là số nguyên có giá trị nằm trong khoảng từ 1 đến 30, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 5, 10 đến 30, 15 đến 30, 20 đến 30, 25 đến 30, 5 đến 25, 10 đến 25, 15 đến 25, 20 đến 25, 10 đến 20, hoặc 15 đến 20.

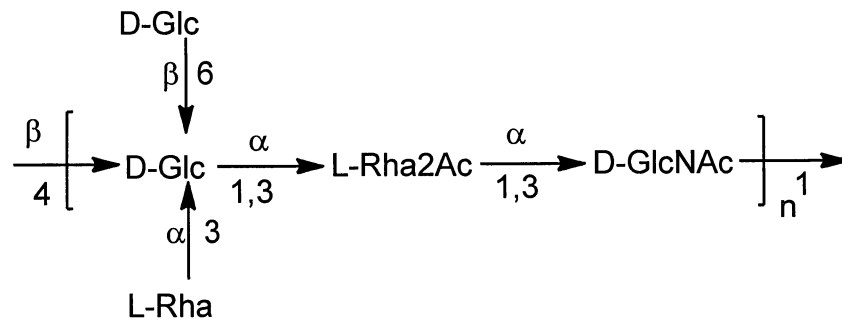
Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ, dược phẩm, chứa phức hợp sinh học theo sáng chế, trong đó phức hợp sinh học này chứa protein mang (ví dụ, EPA) được liên kết với hợp chất có công thức O25B, như được thể hiện dưới đây:



trong đó n là số nguyên có giá trị nằm trong khoảng từ 1 đến 30, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 5, 10 đến 30, 15 đến 30, 20 đến 30, 25 đến 30, 5 đến 25, 10 đến 25, 15 đến 25, 20 đến 25, 10 đến 20, hoặc 15 đến 20. Theo một phương án cụ thể, protein mang được tạo liên kết thông qua nguyên tử N với kháng nguyên O có công thức O25B'.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ, dược phẩm, chứa phức hợp sinh học theo sáng chế, trong đó phức hợp sinh học này chứa

protein mang (ví dụ, EPA) được liên kết với hợp chất có công thức O25B', như được thể hiện dưới đây:

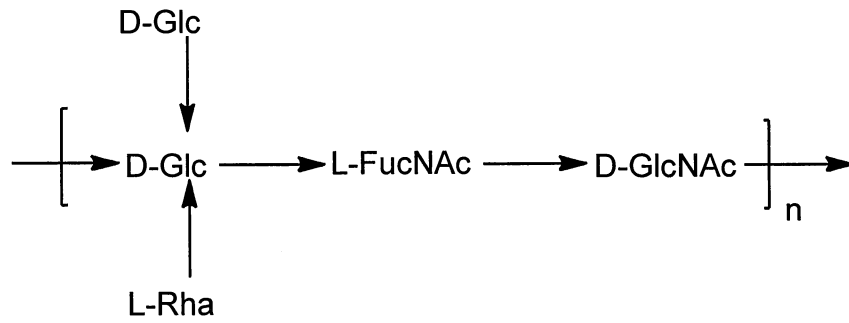


trong đó n là số nguyên có giá trị nằm trong khoảng từ 1 đến 30, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 5, 10 đến 30, 15 đến 30, 20 đến 30, 25 đến 30, 5 đến 25, 10 đến 25, 15 đến 25, 20 đến 25, 10 đến 20, hoặc 15 đến 20. Theo một phương án cụ thể, protein mang được tạo liên kết thông qua nguyên tử N với kháng nguyên O có công thức O25B'.

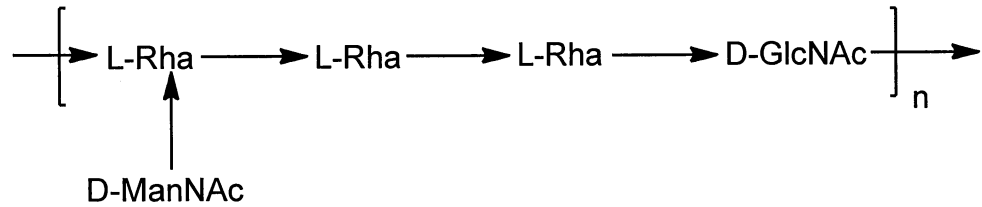
Theo một số phương án, được phẩm theo sáng chế chứa một hoặc nhiều kháng nguyên O khác của *E. coli*, trong đó kháng nguyên này không phải là O25B (ví dụ, công thức O25B hoặc công thức O25B'), ví dụ, kháng nguyên O từ *E. coli* (ví dụ, ExPEC) khác với kháng nguyên từ kiểu huyết thanh O25B của *E. coli*, và/hoặc một hoặc nhiều phức hợp sinh học chứa protein mang được liên kết với kháng nguyên O của *E. coli*, trong đó kháng nguyên này không phải là O25B (ví dụ, công thức O25B hoặc công thức O25B'). Được phẩm này có thể chứa một hoặc nhiều đại phân tử khác chứa kháng nguyên O của ExPEC và/hoặc một hoặc nhiều phức hợp sinh học khác, ví dụ, đại phân tử O1A, O2, và/hoặc O6 và/hoặc phức hợp sinh học O1A, O2, và/hoặc O6.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ, được phẩm, chứa một hoặc nhiều đại phân tử khác chứa kháng nguyên O của ExPEC và/hoặc một hoặc nhiều phức hợp sinh học khác, cùng với đại phân tử O25B (ví dụ, đại phân tử chứa công thức O25B hoặc công thức O25B') và/hoặc phức hợp sinh học O25B (ví dụ, phức hợp sinh học chứa protein mang được liên kết với công thức O25B hoặc công thức O25B'), trong đó đại phân tử khác này chứa cấu trúc được chọn từ nhóm bao gồm:

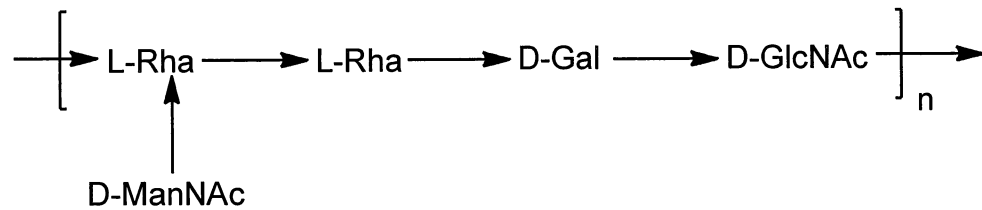
- a. Công thức O25A



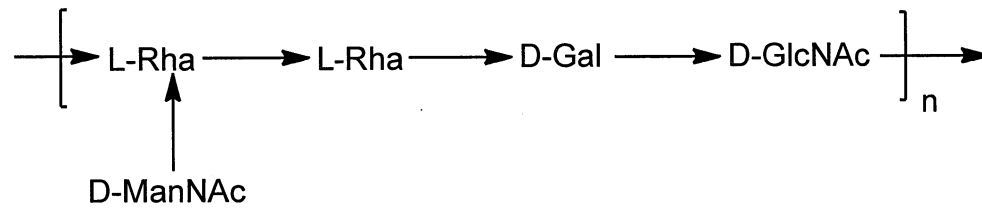
b. Công thức O1A



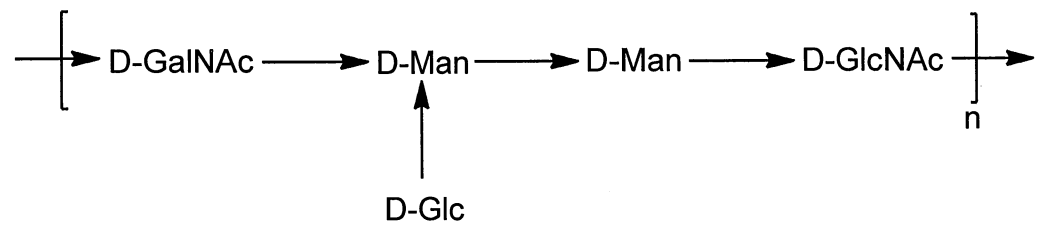
c. Công thức O1B



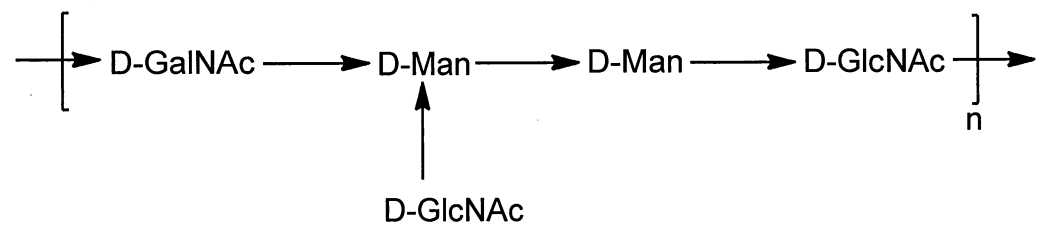
d. Công thức O1C



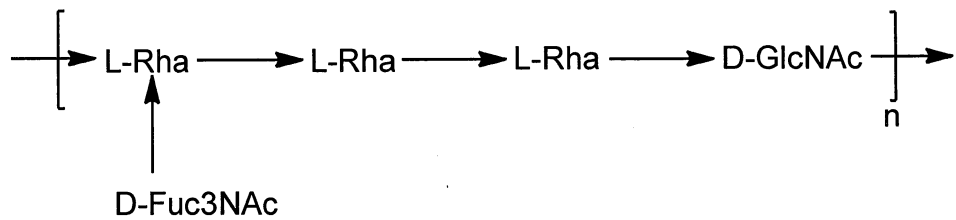
e. Công thức O6Glc



f. Công thức O6GlcNAc

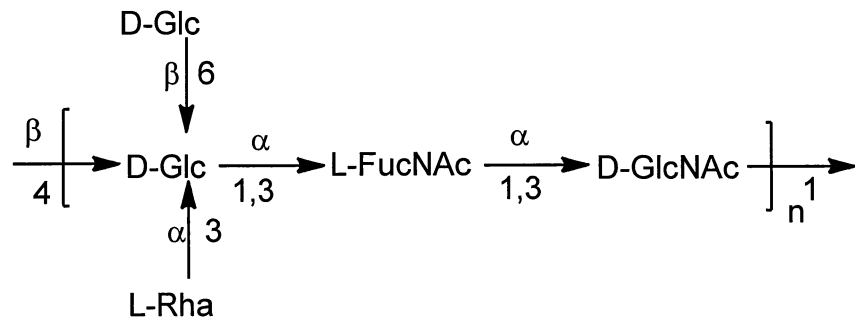


g. Công thức O2

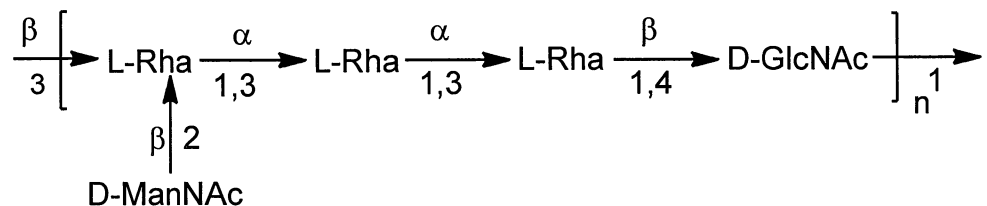


Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ, được phẩm, chứa một, hai, ba, bốn, năm, sáu, hoặc bảy đại phân tử hoặc phức hợp sinh học chứa đại phân tử này, cùng với đại phân tử O25B (ví dụ, đại phân tử chứa công thức O25B hoặc công thức O25B') và/hoặc phức hợp sinh học O25B (ví dụ, phức hợp sinh học chứa protein mang được liên kết với công thức O25B hoặc công thức O25B'), trong đó đại phân tử khác này chứa cấu trúc được chọn từ nhóm bao gồm:

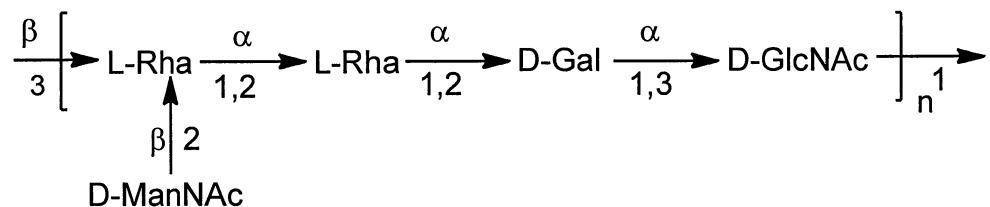
a. Công thức O25A'



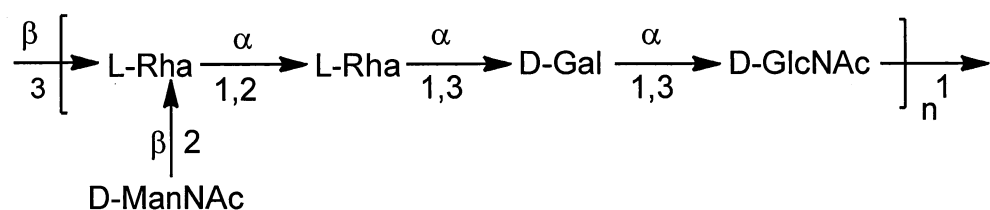
b. Công thức O1A'



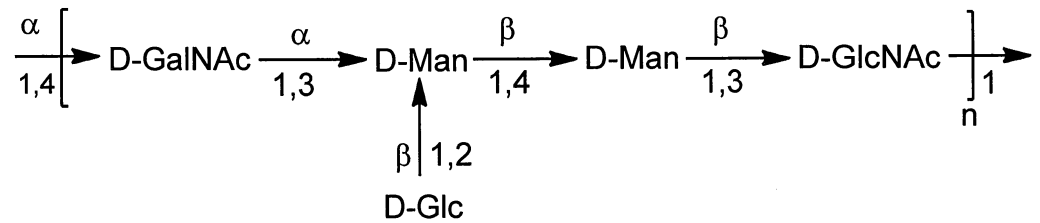
c. Công thức O1B'



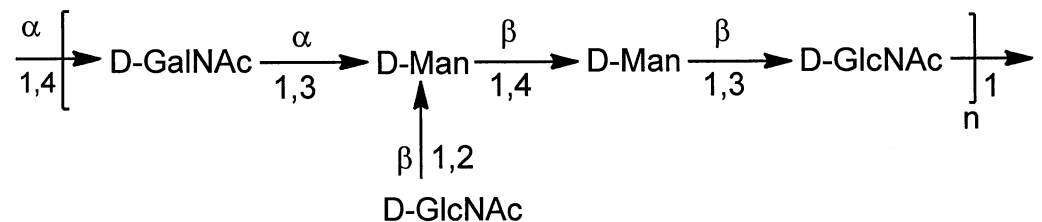
d. Công thức O1C'



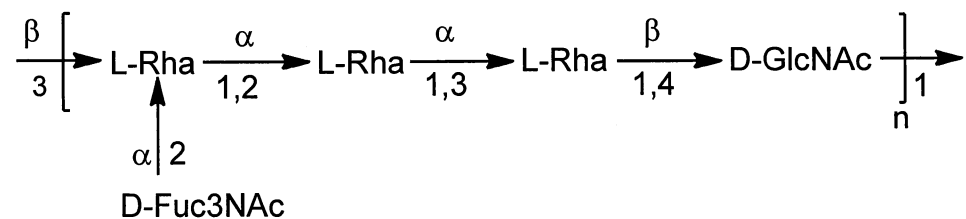
e. Công thức O6Glc'



f. Công thức O6GlcNAc'



g. Công thức O2'



Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ, dược phẩm, chứa (i) đại phân tử O25 (ví dụ, O25A hoặc O25B), hoặc phức hợp sinh học chứa O25 (ví dụ, O25A hoặc O25B) và (ii) đại phân tử O1 hoặc phức hợp sinh học chứa O1. Theo một phương án cụ thể, đại phân tử O25 này là đại phân tử O25B. Theo một phương án cụ thể khác, đại phân tử O1 này là O1A. Theo một phương án cụ thể khác, đại phân tử O1 này là O1B. Theo một phương án cụ thể khác, đại phân tử O1 này là O1C.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ, dược phẩm, chứa (i) đại phân tử O25 (ví dụ, O25A hoặc O25B), hoặc phức hợp sinh học chứa O25 (ví dụ, O25A hoặc O25B) và (ii) đại phân tử O2 hoặc phức hợp sinh học chứa O2. Theo một phương án cụ thể, đại phân tử O25 này là đại phân tử O25B.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ, dược phẩm, chứa (i) đại phân tử O25 (ví dụ, O25A hoặc O25B), hoặc phức hợp sinh học chứa O25 (ví dụ, O25A hoặc O25B) và (ii) đại phân tử O6 (ví dụ, đại phân tử O6 chứa monosacarit Glc phân nhánh (O6Glc) hoặc monosacarit GlcNAc phân nhánh (O6GlcNAc)) hoặc phức hợp sinh học chứa O6. Theo một phương án cụ thể, đại

phân tử O25 này là đại phân tử O25B. Theo một phương án cụ thể khác, đại phân tử O6 này là đại phân tử O6 chứa monosacarit Glc phân nhánh (O6Glc).

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ, dược phẩm, chứa ít nhất hai trong số các thành phần sau: (i) đại phân tử O25 (ví dụ, O25A hoặc O25B) hoặc phức hợp sinh học chứa O25 (ví dụ, O25A hoặc O25B); (ii) đại phân tử O1 hoặc phức hợp sinh học chứa O1; (iii) O2 hoặc phức hợp sinh học chứa O2; và/hoặc (iv) đại phân tử O6 (ví dụ, đại phân tử O6 chứa monosacarit Glc phân nhánh hoặc monosacarit GlcNAc phân nhánh) hoặc phức hợp sinh học chứa O6. Theo một phương án cụ thể, đại phân tử O25 này là đại phân tử O25B. Theo một phương án cụ thể khác, đại phân tử O1 này là O1A. Theo một phương án cụ thể khác, đại phân tử O1 này là O1B. Theo một phương án cụ thể khác, đại phân tử O1 này là O1C. Theo một phương án cụ thể khác, đại phân tử O6 này là đại phân tử O6 chứa monosacarit Glc phân nhánh (còn được gọi là O6Glc).

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ, dược phẩm, chứa đại phân tử O25B, đại phân tử O1A, đại phân tử O2, và đại phân tử O6 chứa monosacarit Glc phân nhánh. Theo một số phương án, đại phân tử này được tạo phức hợp với protein mang.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp ngăn ngừa sự nhiễm trùng cho đối tượng, ví dụ, người, do ExPEC gây ra, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu về mặt dược dụng của chế phẩm (ví dụ, chế phẩm gây miễn dịch) theo sáng chế. Xem mục “Trị liệu kết hợp” dưới đây.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị sự nhiễm trùng cho đối tượng, ví dụ, người, trong đó đối tượng bị nhiễm trùng bởi ExPEC, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu về mặt dược dụng của chế phẩm (ví dụ, chế phẩm gây miễn dịch) theo sáng chế. Xem mục “Trị liệu kết hợp” dưới đây.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra đáp ứng miễn dịch chống lại ExPEC cho đối tượng, ví dụ, người, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu về mặt dược dụng của chế phẩm (ví dụ, chế phẩm gây miễn dịch) theo sáng chế. Xem mục “Trị liệu kết hợp” dưới đây.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra sự sản xuất kháng thể thực bào opsonin chống lại ExPEC cho đối tượng, ví dụ, người, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu về mặt dược dụng của chế phẩm (ví dụ, chế phẩm gây miễn dịch) theo sáng chế. Xem mục “Trị liệu kết hợp” dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: Con đường sinh tổng hợp O25A. Các mũi tên thể hiện mỗi quá trình chuyển hóa enzym, trong đó tên của enzym được thể hiện. Đường được hoạt hóa bằng nucleotit được tạo ra trong tế bào chất bằng enzym được tạo ra trong cụm kháng nguyên O hoặc bằng cách duy trì enzym của tế bào chủ Gram âm. Glycosylphosphat transferaza (WecA) đưa D-GlcNAc phosphat vào undecaprenyl phosphat (UP), tạo ra GlcNAc-UPP. Sau đó, glycosyltransferaza đặc hiệu còn kéo dài phân tử UPP-GlcNAc bằng cách bổ sung monosacarit mà tạo ra đơn vị lặp lại sinh học (BRU) oligosacarit (WekABC WbuB). Thứ tự được thể hiện của enzym không được dùng để chỉ trình tự các sự kiện xảy ra trong quá trình tổng hợp BRU (được thể hiện bằng $\hookleftarrow$). Sau đó, BRU được lật vào trong chu chất bằng Wzx. Wzy trùng hợp tuyến tính BRU của chu chất để tạo ra kháng nguyên polysacarit O. Độ dài của polyme được kiểm soát bằng Wzz. Các oligo và polysacarit trong vi khuẩn được kết hợp trên UPP và sau đó được chuyển để phân tử khác, cụ thể hơn, nền chung tạo cấu trúc UPP cho oligo- và polysacarit trong vi khuẩn. Trong *E. coli*, và hầu hết các vi khuẩn Gram âm khác, kháng nguyên O được vận chuyển từ UPP đến lõi lipid bằng enzym *WaaL* của *E.coli* để tạo ra lipopolysacarit (LPS).

Fig.2: Cụm *rfb*, cấu trúc, và con đường tổng hợp kháng nguyên O phụ thuộc vào *wzx/wzy*, được minh họa bằng cụm *rfb* O25A và kháng nguyên O của *E. coli*, trong đó: A. thể hiện cấu trúc cụm *rfb* của chủng E47a của *E. coli*, nằm giữa gen *galF* và *gnd*. Gen được thể hiện dưới dạng các mũi tên và việc điền thêm ký tự được thể hiện theo chức năng của sản phẩm gen: gen màu đen là cho quá trình sinh tổng hợp monosacarit được hoạt hóa bằng nucleotit mà không tham gia vào quá trình duy trì bộ danh mục của *E.coli* (mà được mã hóa trong hệ gen), sọc chéo trắng/đen là glycosyltransferaza chịu trách nhiệm việc chỉ bổ sung đơn vị monosacarit cho BRU, flippaza *wzx* và polymeraza *wzy*; B. Cấu trúc hóa học của

BRU của kháng nguyên O25A O như đã được mô tả (xem, Fundin et al., 2003, Magnetic Resonance in Chemistry 41, 4).

Fig.3: A. Cấu trúc O25A, O25B, và O16 BRU. B. Sự so sánh cụm sinh tổng hợp kháng nguyên O (*cum rfb*) giữa O25A, O25B, và O16. Gen với màu đen là gen tham gia vào quá trình sinh tổng hợp monosacarit được hoạt hóa bằng nucleotit, sọc chéo được cho là gen glycosyltransferaza, màu xám thể hiện gen vận chuyển hoặc xử lý BRU, và sọc đứng thể hiện tính tương đồng của *O*-axetyltransferaza. Khung màu xám thể hiện tỷ lệ về tính tương đồng lớn hơn 25% giữa các gen; các trị số cụ thể cũng được thể hiện. Các mũi tên nhỏ màu xám và đen thể hiện vị trí bắt cặp theo kiểu của các oligonucleotit PCR đối với vùng 3' của *wzy* (đặc hiệu O25A và O25B) và O25B (đặc hiệu O25B).

Fig.4: Sự phân bố kiểu huyết thanh từ nghiên cứu dịch tễ học. Kiểu huyết thanh của kháng nguyên O của *E.coli* được xác định trong các mẫu của nhóm người cần cho mẫu UTI được phân loại theo số lần xuất hiện.

Fig.5: Phân tích nhuộm màu Silver và Western của LPS từ mẫu phân lập lâm sàng với kiểu hình ngưng kết dương tính với O25. Số lượng chủng được thể hiện trên làn gel. Mỗi dòng được phát triển và sinh khối được chuẩn hóa OD được thu hoạch bằng cách ly tâm. Các viên nhỏ được hòa tan trong dung dịch đệm Lämmli SDS PAGE và được xử lý bằng proteinaza K để thủy phân tất cả protein trong mẫu. Phương pháp nhuộm màu bạc chuẩn được sử dụng cho gel PAGE được thể hiện trong A, và việc lấy mẫu thăm dò của màng nitrocellulose chứa chất vận chuyển điện tử từ gel làm việc đồng nhất bằng huyết thanh miễn dịch ngưng kết O25 có bán trên thị trường được thể hiện trong B.

Fig.6: Các vết HPLC 2AB của các mẫu O25A và O25B. Các mẫu LLO được đánh dấu bằng 2AB từ các chủng upec138 (đường chấm chấm) và upec436 (đường nét đậm) được tạo ra. Các đỉnh được xác định và cấu trúc BRU tương ứng được xác định từ mô hình phân mảnh MS/MS được mô tả chi tiết trong Fig.7 bằng các mũi tên.

Fig.7: Các phân mảnh ion MS/MS thu được từ các đỉnh được thể hiện trong Fig.6 tại thời điểm quá trình rửa giải 50 và 60 phút của các ion gốc $m/z=1022$ (A;

từ chủng upec138) hoặc $m/z=1021$ (B; từ chủng upec_436). Các ion được thể hiện theo hình mẫu của BRU giả định.

Fig.8: Quá trình deacetyl hóa mẫu LLO được đánh dấu bằng 2AB thu được từ mẫu phân lập lâm sàng dương tính với O25B. Đỉnh đặc hiệu O25B tại thời điểm rửa giải 50 phút thu được từ LLO được đánh dấu bằng 2AB của mẫu phân lập lâm sàng với kiểu gen O25B được thu gom, và được phân tích bằng HPLC pha thường, sau đó xử lý với (đường nét đậm) hoặc không xử lý với (đường chấm chấm) NaOH để thủy phân các nhóm theo chương trình ND Cal's Special Patent Program.

Fig.9: Sự phân tích thành phần monosacarit của phức hợp sinh học O25A và O25B. Phức hợp sinh học O25 được tạo ra, được tinh chế, và được xử lý để phân tích thành phần monosacarit. Các vết HPLC C18 của các mẫu được thể hiện. O25A (đường nét đậm) và O25B (đường chấm chấm) thu được các mẫu được so sánh đối với hỗn hợp của các monosacarit từ các nguồn thương mại (Glc, GlcNAc, Rha, FucNAc). Thời gian rửa giải của monosacarit được thể hiện bằng các mũi tên.

Fig.10: Đặc trưng của phức hợp sinh học O25A. Lượng cuối được tinh chế của phức hợp sinh học 4S-EPA-O25A được phân tích bằng SDS PAGE và được hiển thị hóa bằng quá trình nhuộm trực tiếp với Coomassie (C) và phương pháp Western Blot bằng cách sử dụng huyết thanh miễn dịch kháng EPA hoặc huyết thanh miễn dịch kháng O25.

Fig.11: Đặc trưng của phức hợp sinh học O25B. Lượng cuối được tinh chế của phức hợp sinh học 4S-EPA-O25B được phân tích bằng SDS PAGE và được hiển thị hóa bằng quá trình nhuộm trực tiếp với Coomassie (C) và phương pháp Western Blot bằng cách sử dụng huyết thanh miễn dịch kháng EPA hoặc huyết thanh miễn dịch kháng O25.

Fig.12: Quá trình sinh tổng hợp gen kháng nguyên O O1 và cấu trúc hóa học. A. Cụm *rfb* và các gen hai bên của chủng *E.coli* O1A G1632 (Mã số nhận biết đặc hiệu No. GU299791) được thể hiện. Các ký hiệu sọc màu, màu đen và màu xám là giống với các ký hiệu trong Fig.2, được mô tả trên đây. B. Cấu trúc hóa học BRU của các kiểu huyết thanh phụ O1 được thể hiện.

Fig.13: Quá trình phân tích LPS từ mẫu phân lập lâm sàng với kiểu hình ngưng kết dương tính với O1. A. Sự nhuộm bằng bạc và B. Phương pháp Western Blot bằng cách sử dụng huyết thanh miễn dịch kháng O1.

Fig.14: Quá trình xác định O1A trong mẫu phân lập lâm sàng O1. Các mẫu LLO được đánh dấu bằng 2AB từ mẫu phân lập lâm sàng O1 được phân tích bằng lấy dấu LLO. A. Các vết HPLC pha thường sau 60 phút được thể hiện. Đường cơ sở đối với từng mẫu được dịch chuyển để hiển thị hóa các đỉnh cùng dịch chuyển. Số lượng upec thể hiện chủng lâm sàng. B. Các phân mảnh ion MS/MS có $m/z=1849,6$ (Sản phẩm cộng Na^+). Hình mẫu thể hiện mô hình phân mảnh ion và sự bẻ gãy liên kết glycosit có thể xảy ra trong oligosacarit của 2 BRU của O1A.

Fig.15: Phức hợp sinh học O1. Thử nghiệm biểu hiện ở mức độ nhỏ của glycoprotein EPA-O1 bằng tế bào *E.coli* (W3110 $\Delta rfbO16::rfbO1 \Delta waaL$) được biến đổi bằng plasmit biểu hiện EPA (pGVXN659) và năm plasmit khác nhau biểu hiện pglB: A, p114: sự biểu hiện không codon (đơn vị mã) được tối ưu hóa, HA tag chứa pglB; B, p939: codon được tối ưu hóa, HA tag chứa pglB; C, p970: codon được tối ưu hóa, HA tag được loại bỏ pglB; D, codon được tối ưu hóa, HA tag chứa, vị trí glycosyl hóa tự nhiên N534Q được loại bỏ pglB; và E, codon được tối ưu hóa, HA tag được loại bỏ, vị trí glycosyl hóa tự nhiên N534Q được loại bỏ pglB. Các tế bào được phát triển và được cảm ứng bằng arabinosa và IPTG, sau đó ủ qua đêm ở 37°C, các tế bào được thu hoạch và các phần chiết protein chu chất được tạo ra. Sau đó, các phần chiết được tách bằng SDS PAGE, được chuyển đến màng nitrocellulose bằng cách điện thấm, và được phát hiện miễn dịch bằng cách sử dụng huyết thanh kháng EPA.

Fig.16: Phức hợp sinh học được mô tả trong Fig.15, được phát hiện bằng huyết thanh kháng O1.

Fig.17: Cấu trúc hóa học và gen O6. A. Cụm sinh tổng hợp kháng nguyên O (cụm *rfb*) và các gen hai bên của *E.coli* CFT073 (Ngân hàng dữ liệu gen AE014075.1). Chức năng gen được giả định theo BLAST được thể hiện và gen đặc hiệu cho quá trình sinh tổng hợp kháng nguyên O O6 được thể hiện. B. Cấu trúc hóa học của cấu trúc BRU O6 được mô tả (Jann et al., Carbohydr. Res. 263 (1994) 217-225).

Fig.18: Quá trình xác định O6 với các mẫu LLO được đánh dấu bằng Glc. 2AB phân nhánh từ O6 mẫu phân lập lâm sàng được phân tích bằng lấy dấu LLO. A. Các vết HPLC pha thường từ 60 phút sau đó thể hiện. Các phần chiết được tạo ra từ chủng đối chứng CCUG11309 (đường nét đậm nhỏ) và 11311 (đường nét đứt) chứa các nhánh Glc và GlcNAC. Sự chồng lấp cho thấy sự khác nhau rất rõ về thời gian rửa giải của các BRU được xác định. B. Các phần chiết từ mẫu phân lập lâm sàng như được thể hiện bằng số lượng upec được so sánh với chủng đối chứng từ A.

Fig.19: Quá trình sinh tổng hợp gen kháng nguyên O O2 và cấu trúc hóa học. A. Cụm sinh tổng hợp kháng nguyên O (cụm *rfb*) và các gen hai bên của chủng *E.coli* G1674 (mã số nhận biết đặc hiệu No. GU299792). Các ký hiệu sọc màu, màu đen và màu xám là như được mô tả trong các Fig trên đây (ví dụ, Fig.2). B. Cấu trúc hóa học BRU của kháng nguyên O2.

Fig.20: Quá trình phân tích LPS từ mẫu phân lập lâm sàng với kiểu hình ngưng kết dương tính với O2. A. Sự nhuộm bằng bạc. B. Phương pháp Western Blot bằng cách sử dụng huyết thanh miễn dịch kháng O2.

Fig.21: Quá trình phân tích OPS từ chủng W3110 $\Delta waaL \Delta rfb$ W3110::*rfb*O2 $\Delta wekS$. Sắc ký đồ của quá trình phân tích LLO được đánh dấu bằng 2AB bằng HPLC pha thường được thể hiện.

Fig.22: Quá trình nhận dạng LPS của O25A và O25B bằng huyết thanh miễn dịch MBP kháng O25A và kháng O25B trong phân tích Western Blot. Hai màng nitrocellulose mà thu được sau quá trình chuyển dịch điện tử của LPS, các mẫu được tạo ra từ upec436 (O25A) và upec138 (O25B) và được tách bằng SDS-PAGE. Mô hình tải là giống nhau cho cả hai màng, lần bên trái: LPS của O25A từ upec438, lần giữa: LPS của O25B từ upec 138. Phức hợp sinh học MBP được sử dụng cho quá trình tạo miễn dịch ở thỏ. Tấm bên trái: huyết thanh miễn dịch MBP kháng O25B; tấm bên phải: huyết thanh miễn dịch MBP kháng O25A.

Fig.23: Phổ MS/MS của OPS của O2 BRU. Phổ MS/MS của sản phẩm cộng Na^+ với $m/z = 989,4$ từ đỉnh rửa giải ở phút 43,5 phút từ các phần chiết LLO được đánh dấu bằng 2AB từ chủng CCUG25. Hình mẫu O2 BRU và các ion Y đi kèm được thể hiện giúp xác định trình tự monosacarit mong muốn.

Fig.24: Phức hợp sinh học EPA chứa kháng nguyên O1A, O2, và O6 được sử dụng trong nghiên cứu tiền lâm sàng. Polysacarit OPS được tạo ra và được tinh chế, và được phân tích bằng SDS PAGE và được hiển thị hóa bằng cách nhuộm bằng Coomassie.

Fig.25 thể hiện độ chuẩn ELISA trung bình thu được với huyết thanh từ chuột được tạo miễn dịch bằng O1A-EPA (G1), protein mang riêng rẽ (G10), TBS (G11), hoặc hỗn hợp thành phần bậc bốn bao gồm EPA-O1A, O2, O6Glc, và O25B (G12), được thử nghiệm với đĩa ELISA được phủ bằng O1A-LPS được tinh chế từ chủng upec032.

Fig.26 thể hiện độ chuẩn ELISA trung bình thu được với huyết thanh từ chuột được tạo miễn dịch bằng O2 -EPA (G4), protein mang riêng rẽ (G10), TBS (G11), hoặc chế phẩm bốn chủng bao gồm EPA-O1A, O2, O6Glc, và O25B (G12), được thử nghiệm với đĩa ELISA được phủ bằng O2 LPS được tinh chế từ chủng CCUG25.

Fig.27 thể hiện độ chuẩn ELISA trung bình thu được với huyết thanh từ chuột được tạo miễn dịch bằng O6Glc-EPA (G7), protein mang riêng rẽ (G10), TBS (G11), hoặc chế phẩm bốn chủng bao gồm EPA-O1A, O2, O6Glc, và O25B (G12), được thử nghiệm với đĩa ELISA được phủ bằng O6Glc-LPS được tinh chế từ chủng CCUG11309.

Fig.28 thể hiện độ chuẩn ELISA trung bình thu được với huyết thanh từ chuột được tạo miễn dịch bằng O25B-EPA (G9), protein mang riêng rẽ (G10), TBS (G11), hoặc chế phẩm bốn chủng bao gồm O1A, O2, O6Glc, và O25B (G12), được thử nghiệm với đĩa ELISA được phủ bằng O25B-LPS được tinh chế từ chủng upec177.

Fig.29: Chỉ số opsonin hóa của huyết thanh thu được từ chuột trước quá trình tạo miễn dịch (vòng tròn trống) được so sánh để việc tạo miễn dịch sau 42 ngày (hình vuông kín) với một liều miễn cảm sơ bộ và hai liều tăng cường của các liều được thể hiện của vacxin loại đơn trị liệu (vacxin một chủng). (A) Quá trình tạo miễn dịch O2-EPA; (B) Quá trình tạo miễn dịch O6-EPA; (C) Quá trình tạo miễn dịch O25B-EPA.

Fig.30: Độ chuẩn ELISA thu được với huyết thanh từ người được tạo chủng ngừa với vaccin bốn chủng chứa các kháng nguyên *E.coli* O1A, O2, O6Glc, và O25B. Sự gia tăng đáng kể về độ chuẩn ELISA giữa sau (30 ngày sau khi tiêm) và trước khi tiêm (ngày 1) chỉ quan sát trong nhóm được tạo chủng ngừa (* thể hiện giá trị thống kê).

Fig.31: Chỉ số opsonin (OI) thu được với huyết thanh từ người được tạo chủng ngừa với vaccin bốn chủng chứa các kháng nguyên *E.coli* O1A, O2, O6Glc, và O25B. Đáp ứng miễn dịch như được thể hiện bằng OI đối với giả được và các thành phần của vaccin bốn chủng (O1A-EPA (31A), O2-EPA (31B), O6Glc-EPA (31C), và O25B-EPA (31D)) trước khi và sau khi tiêm được mô tả. Trước khi tiêm, được xác định là ngày 1, được thể hiện bằng V2 (lần kiểm tra 2), và sau khi tiêm, được xác định là ngày 30, được thể hiện bằng V4 (lần kiểm tra 4). Sự gia tăng đáng kể về OI giữa trước và sau khi tiêm (được thể hiện bằng *, trong đó bội số * là mức độ tăng của giá trị) chỉ quan sát trong nhóm được tạo chủng ngừa. NS là không có sự khác nhau đáng kể.

Fig.32: Độ chuẩn ELISA (được thể hiện theo giá trị EC50) của huyết thanh từ đối tượng được tạo chủng ngừa theo LPS của O25A (thanh màu đen) và LPS của O25B (thanh màu xám), ở ngày 1 (trước khi được tạo chủng ngừa) và sau đó 30 ngày (sau khi tiêm vaccin). Sự gia tăng đáng kể về mặt thống kê về độ chuẩn ELISA giữa sau khi tiêm (30 ngày sau khi tiêm) và trước khi tiêm (ngày 1) được quan sát cho cả hai kiểu huyết thanh: LPS của O25A (thanh màu đen) và LPS của O25B (thanh màu xám).

Fig.33: Hoạt tính của huyết thanh từ đối tượng được tạo chủng ngừa theo O25A (đường màu đen) và O25B (đường màu xám) biểu hiện chủng *E. coli*. Đường chấm màu xám: kiểu huyết thanh chủng O75, mẫu đối chứng âm. Fig.33 cho thấy rằng kháng thể IgG huyết thanh được tạo ra bằng vaccin từ đối tượng được tạo chủng ngừa đáp ứng mạnh với chủng O25A và O25B.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ và ký hiệu viết tắt

OPS: polysaccharit O; kháng nguyên O của vi khuẩn Gram âm. OPS còn được gọi là kháng nguyên O.

Cụm *rfb*: cụm gen (ví dụ, cụm gen của *E. coli*) mà mã hóa bộ máy enzym có khả năng tổng hợp cấu trúc bộ khung của kháng nguyên O. Thuật ngữ cụm *rfb* có thể được dùng để chỉ cụm kháng nguyên O sinh tổng hợp bất kỳ, bao gồm kháng nguyên từ vi khuẩn mà không thuộc về chi *Escherichia*.

waaL: gen ligaza của kháng nguyên O mã hóa enzym gắn kết màng với vị trí hoạt tính nằm trong chu chất. Enzym được mã hóa chuyển hóa kháng nguyên O liên kết với undecaprenylphosphat (UPP) thành lõi lipit, tạo ra lipopolysacarit.

wecA: gen thứ nhất được mã hóa trong cụm *wec*. Protein được mã hóa xúc tác cho quá trình chuyển hóa GlcNAc-phosphat từ UDP-GlcNAc thành UPP để tạo ra GlcNAc liên kết với UPP.

ECA: kháng nguyên phổ biến của vi khuẩn trong ruột.

RU: đơn vị lặp lại. Trong bản mô tả này, RU được điều chỉnh bằng với đơn vị lặp lại sinh học (Biological Repeated Unit - BRU). BRU mô tả RU của kháng nguyên O vì nó được tổng hợp in vivo.

UPP: undecaprenylpyrophosphat.

LLO: oligosacarit liên kết với lipit.

2AB: 2-amino benzamit.

MS: phổ khối lượng.

O25B: thuật ngữ O25B được dùng để chỉ kháng nguyên O25B từ *E.coli* như được mô tả trong bản mô tả này (kiểu huyết thanh phụ của kiểu huyết thanh O25 của *E. coli*). Trong bản mô tả này, phần mô tả liên quan đến O25B bao gồm công thức O25B và công thức O25B' được mô tả như trên đây.

O25A: thuật ngữ O25A được dùng để chỉ kháng nguyên O25A của *E.coli* (kiểu huyết thanh phụ của kiểu huyết thanh O25 của *E. coli*). Trong bản mô tả này, phần mô tả liên quan đến O25A bao gồm công thức O25A và công thức O25A' được mô tả như trên đây.

O1A: thuật ngữ O1A được dùng để chỉ kháng nguyên O1A của *E.coli* (kiểu huyết thanh phụ của kiểu huyết thanh O1 của *E. coli*). Trong bản mô tả này, phần mô tả liên quan đến O1A bao gồm công thức O1A và công thức O1A' được mô tả như trên đây.

O1B: thuật ngữ O1B được dùng để chỉ kháng nguyên O1B của *E.coli* (kiểu huyết thanh phụ của kiểu huyết thanh O1 của *E. coli*). Trong bản mô tả này, phần mô tả liên quan đến O1B bao gồm công thức O1B và công thức O1B' được mô tả như trên đây.

O1C: thuật ngữ O1C được dùng để chỉ kháng nguyên O1C của *E.coli* (kiểu huyết thanh phụ của kiểu huyết thanh O1 của *E. coli*). Trong bản mô tả này, phần mô tả liên quan đến O1C bao gồm công thức O1C và công thức O1C' được mô tả như trên đây.

O2: thuật ngữ O2 được dùng để chỉ kháng nguyên O2 của *E.coli* (kiểu huyết thanh O2 của *E. coli*). Trong bản mô tả này, phần mô tả liên quan đến O2 bao gồm công thức O2 và công thức O2' được mô tả như trên đây.

O6: thuật ngữ O6 được dùng để chỉ kháng nguyên O6 của *E.coli* (kiểu huyết thanh O6 của *E. coli*). Trong bản mô tả này, phần mô tả liên quan đến O6 bao gồm công thức O6 và công thức O6' được mô tả như trên đây.

Phức hợp sinh học: thuật ngữ phức hợp sinh học được dùng để chỉ phức hợp giữa protein (ví dụ, protein mang) và kháng nguyên, ví dụ, kháng nguyên O (ví dụ, O25B) được tạo ra trong nền tế bào chủ, trong đó bộ máy tế bào chủ liên kết kháng nguyên với protein (ví dụ, liên kết thông qua nguyên tử N). Phức hợp glyco bao gồm phức hợp sinh học, cũng như phức hợp kháng nguyên đường (ví dụ, oligo- và polysacarit)-protein được tạo ra theo các cách khác, ví dụ, bằng liên kết hóa học của protein và kháng nguyên đường.

Thuật ngữ “khoảng”, nếu được sử dụng kết hợp với số, được dùng để chỉ số bất kỳ nằm trong khoảng ± 1 , ± 5 hoặc $\pm 10\%$ của số đó.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “lượng hữu hiệu” liên quan đến sử dụng trong trị liệu (ví dụ, chế phẩm theo sáng chế) cho đối tượng được dùng để chỉ lượng trị liệu mà có (các) tác dụng phòng ngừa và/hoặc điều trị. Theo một số phương án, “lượng hữu hiệu” được dùng để chỉ lượng trị liệu mà hiệu quả để thu được một, hai, ba, bốn, hoặc nhiều hơn các tác dụng sau đây: (i) làm giảm hoặc cải thiện mức độ nghiêm trọng của sự nhiễm trùng ExPEC hoặc triệu chứng đi kèm; (ii) làm giảm thời gian của sự nhiễm trùng ExPEC hoặc triệu chứng đi kèm; (iii) ngăn ngừa sự tiến triển của sự nhiễm trùng ExPEC hoặc triệu chứng đi kèm; (iv) làm thuyên

giảm sự nhiễm trùng ExPEC hoặc triệu chứng đi kèm; (v) ngăn ngừa sự phát triển hoặc khởi phát của sự nhiễm trùng ExPEC, hoặc triệu chứng đi kèm; (vi) ngăn ngừa sự tái phát nhiễm trùng do ExPEC gây ra hoặc triệu chứng đi kèm; (vii) làm giảm sự suy giảm của cơ quan do sự nhiễm trùng ExPEC; (viii) làm giảm việc phải nhập viện điều trị cho đối tượng mắc phải sự nhiễm trùng ExPEC; (ix) làm giảm việc phải nhập viện điều trị lâu dài cho đối tượng mắc phải sự nhiễm trùng ExPEC; (x) tăng khả năng sống sót cho đối tượng mắc phải sự nhiễm trùng ExPEC; (xi) ngăn ngừa sự nhiễm trùng ExPEC cho đối tượng; (xii) ngăn ngừa hoặc làm giảm sự sao chép ExPEC cho đối tượng; và/hoặc (xiii) nâng cao hoặc cải thiện (các) tác dụng phòng ngừa hoặc điều trị của phép trị liệu khác.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “ở dạng kết hợp” liên quan đến sử dụng của hai hoặc nhiều chất trị liệu cho đối tượng, được dùng để chỉ sử dụng của nhiều hơn một chất trị liệu. Sử dụng của thuật ngữ “ở dạng kết hợp” không làm giới hạn thứ tự trong đó các chất trị liệu được sử dụng cho đối tượng. Ví dụ, chất trị liệu thứ nhất (ví dụ, chế phẩm theo sáng chế) có thể được sử dụng trước (ví dụ, 5 phút, 15 phút, 30 phút, 45 phút, 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 12 giờ, 16 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 4 tuần, 5 tuần, 6 tuần, 8 tuần, hoặc 12 tuần trước khi), đồng thời với, hoặc sau (ví dụ, 5 phút, 15 phút, 30 phút, 45 phút, 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 12 giờ, 16 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 4 tuần, 5 tuần, 6 tuần, 8 tuần, hoặc 12 tuần sau đó) sử dụng của chất trị liệu thứ hai cho đối tượng.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “đối tượng” được dùng để chỉ động vật (ví dụ, chim, bò sát, và động vật có vú). Theo một phương án khác, đối tượng là động vật có vú bao gồm động vật không phải linh trưởng (ví dụ, lạc đà, lừa, ngựa vằn, bò cái, lợn, ngựa, dê, cừu, mèo, chó, chuột, và chuột nhắt) và động vật linh trưởng (ví dụ, khỉ, tinh tinh, và người). Theo một số phương án, đối tượng là động vật không phải người. Theo một số phương án, đối tượng là động vật chăn nuôi hoặc vật nuôi cảnh (ví dụ, chó, mèo, ngựa, dê, cừu, lợn, lừa, hoặc gà). Theo một phương án khác, đối tượng là người. Theo một phương án khác, đối tượng là trẻ sơ sinh. Theo một phương án khác, đối tượng là trẻ em. Theo một phương án khác, đối tượng là người trưởng thành. Theo một phương án khác, đối tượng là người già. Theo một phương

án khác, đối tượng trẻ sơ sinh chưa trưởng thành. Thuật ngữ “đối tượng” và “bệnh nhân” có thể được sử dụng thay thế cho nhau.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “trẻ sơ sinh chưa trưởng thành” được dùng để chỉ trẻ sơ sinh được sinh ở ít hơn 37 tuần tuổi thai.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “trẻ sơ sinh” được dùng để chỉ trẻ sơ sinh đến trẻ 1 tuổi.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “trẻ mới biết đi” được dùng để chỉ trẻ em từ 1 đến 3 tuổi.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “trẻ em” được dùng để chỉ người từ 1 tuổi đến 18 tuổi.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “người trưởng thành” được dùng để chỉ người từ 18 tuổi hoặc già hơn.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “người già” được dùng để chỉ người 65 tuổi hoặc già hơn.

Sáng chế đề cập đến cấu trúc của kháng nguyên O25B của *E. coli*, cũng như sử dụng O25B, phương pháp sản xuất O25B, và phức hợp sinh học chứa của O25B. Các tác giả sáng chế đã xác định được cụm gen của *E.coli* chịu trách nhiệm cho sự sản xuất O25B và xác định được một cách đầy đủ đặc trưng cấu trúc của kháng nguyên O25B. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến axit nucleic có khả năng sản xuất O25B trong tế bào chủ. Sáng chế còn đề cập đến tế bào chủ, ví dụ, tế bào chủ được biến đổi tái tổ hợp, chứa axit nucleic có khả năng sản xuất O25B. Tế bào chủ này có thể được sử dụng để tạo ra phức hợp sinh học chứa O25B được liên kết với protein mang, mà có thể được sử dụng trong, ví dụ, dược phẩm trị liệu (ví dụ, vaccin). Kháng nguyên O25B theo sáng chế còn hữu dụng để tạo ra kháng thể, mà có thể được sử dụng, ví dụ, trong phương pháp trị liệu như tạo miễn dịch thụ động cho đối tượng cần điều trị. Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm chứa O25B, ở dạng riêng rẽ hoặc kết hợp với các kháng nguyên khác của *E.coli* (ví dụ, O1, O2, và O6 và các kiểu huyết thanh phụ của chúng), để sử dụng trong phương pháp trị liệu, ví dụ, tạo ra chủng ngừa cho vật chủ để chống lại sự nhiễm khuẩn *E.coli* (ví dụ, *E.coli* gây bệnh viêm màng não).

Axit nucleic và protein

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến axit nucleic được phân lập liên quan đến quá trình sản xuất O25B, ví dụ, axit nucleic mã hóa một hoặc nhiều protein của cụm *rfb* O25B của *E. coli*. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ xác định được rằng do sự suy biến của mã di truyền, protein có trình tự axit amin cụ thể có thể được mã hóa bằng các axit nucleic khác nhau. Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu được rằng axit nucleic theo sáng chế có thể được biến đổi theo cách mà trình tự của nó khác so với trình tự theo sáng chế, mà không ảnh hưởng đến trình tự axit amin của protein được mã hóa bằng axit nucleic này.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến axit nucleic mã hóa cụm *rfb* O25B của *E. coli*. Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến axit nucleic mã hóa cụm gen *rfb*(upec138) của *E. coli* (SEQ ID NO:12). Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến axit nucleic mã hóa cụm gen mà khoảng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% giống hoặc tương đồng với SEQ ID NO:12. Upec138 là ví dụ về chủng *E. coli* có kiểu huyết thanh O25B. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ xác định được rằng chủng khác từ kiểu huyết thanh này có thể dễ dàng thu được từ mẫu phân lập lâm sàng theo phương pháp theo sáng chế, và ví dụ về chủng khác này là upec177 và upec163. Do đó, trong bản mô tả này, nếu cụm gen *rfb* hoặc mỗi gen từ cụm của chủng O25B này được đề cập, thì sẽ bao gồm các cụm gen tương ứng hoặc gen từ chủng O25B khác. Ngoài ra, trình tự theo sáng chế có thể được xác định bằng cách sắp xếp theo trình tự cụm gen *rfb* hoặc, nếu cần, của mỗi gen từ các mẫu phân lập khác này, và sẽ tạo ra trình tự tương đồng mã hóa protein tương đồng dưới dạng cụm gen hoặc gen. Theo các phương án bất kỳ trong đó cụm gen hoặc gen tương đồng được đề cập bằng cụm gen hoặc gen với thành phần phần trăm cụ thể, trình tự tương đồng này tốt hơn là mã hóa (các) protein với với chức năng tương tự protein từ chủng hoặc trình tự đối chứng.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến axit nucleic mã hóa cụm *rfb* O25B của *E. coli*. Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến axit nucleic mã hóa cụm gen *rfb*(upec163) của *E. coli*. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến axit nucleic mã hóa cụm gen mà khoảng 75%, 80%,

85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% giống hoặc tương đồng với cụm gen *rfb*(upec163) của *E. coli*.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến axit nucleic mã hóa cụm *rfb* O25B của *E. coli*. Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến axit nucleic mã hóa cụm gen *rfb*(upec177) của *E. coli*. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến axit nucleic mã hóa cụm gen mà khoảng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% giống hoặc tương đồng với cụm gen *rfb*(upec177) của *E. coli*.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến axit nucleic mã hóa protein của cụm *rfb* O25B của *E. coli*.

Theo một phương án cụ thể, axit nucleic mã hóa protein của cụm *rfb* O25B của *E. coli* theo sáng chế chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO:1, gen *rmlB* của cụm *rfb* O25B của *E. coli*. Theo một phương án cụ thể khác, axit nucleic mã hóa protein của cụm *rfb* O25B của *E. coli* theo sáng chế là giống hoặc tương đồng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:1.

Theo một phương án cụ thể, axit nucleic mã hóa protein của cụm *rfb* O25B của *E. coli* theo sáng chế chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO:2, gen *rmlD* của cụm *rfb* O25B của *E. coli*. Theo một phương án cụ thể khác, axit nucleic mã hóa protein của cụm *rfb* O25B của *E. coli* theo sáng chế là giống hoặc tương đồng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:2.

Theo một phương án cụ thể, axit nucleic mã hóa protein của cụm *rfb* O25B của *E. coli* theo sáng chế chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO:3, gen *rmlA* của cụm *rfb* O25B của *E. coli*. Theo một phương án cụ thể khác, axit nucleic mã hóa protein của cụm *rfb* O25B của *E. coli* theo sáng chế là giống hoặc tương đồng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:3,

Theo một phương án cụ thể, axit nucleic mã hóa protein của cụm *rfb* O25B của *E. coli* theo sáng chế chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO:4, gen *rmlC* của cụm *rfb* O25B của *E. coli*. Theo một phương án cụ thể khác, axit nucleic mã hóa protein của cụm *rfb* O25B của *E. coli* theo sáng chế là giống hoặc tương đồng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:4.

Theo một phương án cụ thể, axit nucleic mã hóa protein của cụm rfb O25B của *E.coli* theo sáng chế chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO:5, gen *wzx* của cụm rfb O25B của *E. coli*. Theo một phương án cụ thể khác, axit nucleic mã hóa protein của cụm rfb O25B của *E.coli* theo sáng chế là giống hoặc tương đồng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:5.

Theo một phương án cụ thể, axit nucleic mã hóa protein của cụm rfb O25B của *E.coli* theo sáng chế chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO:6, gen *wekA* của cụm rfb O25B của *E. coli*. Theo một phương án cụ thể khác, axit nucleic mã hóa protein của cụm rfb O25B của *E.coli* theo sáng chế là giống hoặc tương đồng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:6.

Theo một phương án cụ thể, axit nucleic mã hóa protein của cụm rfb O25B của *E.coli* theo sáng chế chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO:7, gen *wekB* của cụm rfb O25B của *E. coli*. Theo một phương án cụ thể khác, axit nucleic mã hóa protein của cụm rfb O25B của *E.coli* theo sáng chế là giống hoặc tương đồng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:7.

Theo một phương án cụ thể, axit nucleic mã hóa protein của cụm rfb O25B của *E.coli* theo sáng chế chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO:8, gen *wzy* của cụm rfb O25B của *E. coli*. Theo một phương án cụ thể khác, axit nucleic mã hóa protein của cụm rfb O25B của *E.coli* theo sáng chế là giống hoặc tương đồng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:8.

Theo một phương án cụ thể, axit nucleic mã hóa protein của cụm rfb O25B của *E.coli* theo sáng chế chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO:9, gen *wbbJ* của cụm rfb O25B của *E. coli*. Theo một phương án cụ thể khác, axit nucleic mã hóa protein của cụm rfb O25B của *E.coli* theo sáng chế là giống hoặc tương đồng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:9,

Theo một phương án cụ thể, axit nucleic mã hóa protein của cụm rfb O25B của *E.coli* theo sáng chế chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO:10, gen *wbbK* của cụm rfb O25B của *E. coli*. Theo một phương án cụ thể khác, axit nucleic mã hóa protein của cụm rfb O25B của *E.coli* theo sáng chế là giống hoặc tương đồng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:10.

Theo một phương án cụ thể, axit nucleic mã hóa protein của cụm rfb O25B của *E.coli* theo sáng chế chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO:11, gen *wbbL* của cụm rfb O25B của *E. coli*. Theo một phương án cụ thể khác, axit nucleic mã hóa protein của cụm rfb O25B của *E.coli* theo sáng chế là giống hoặc tương đồng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:11.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến protein được mã hóa bằng axit nucleic theo sáng chế. Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến dTDP-Glucosa 4,6-dehydrataza, được mã hóa bằng SEQ ID NO:1. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến dTDP-6-Deoxy-D-Glucosa 3,5-epimeraza, được mã hóa bằng SEQ ID NO:2. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến Glucosa-1-phosphat thymidyltransferaza, được mã hóa bằng SEQ ID NO:3. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến dTDP-4-dehydrorhamnoza 3,5-epimeraza, được mã hóa bằng SEQ ID NO:4. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến flippaza của kháng nguyên O, được mã hóa bằng SEQ ID NO:5. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến dTDP-Rha:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP α -1,3-rhamnosyltransferaza, được mã hóa bằng SEQ ID NO:6. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến UDP-Glc:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP β -1,6- glucosyltransferaza, được mã hóa bằng SEQ ID NO:7. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến polymeraza của kháng nguyên O, được mã hóa bằng SEQ ID NO:8. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến *O*-axetyl transferaza, được mã hóa bằng SEQ ID NO:9. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến UDP-Glc:Rha-GlcNAc-UPP α -1,3-glucosyltransferaza, được mã hóa bằng SEQ ID NO:10. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến dTDP-Rha:GlcNAc-UPP α -1,3-rhamnosyltransferaza, được mã hóa bằng SEQ ID NO:11.

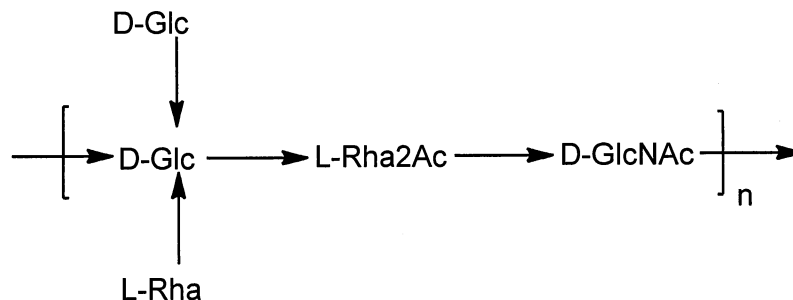
Kháng nguyên O của *E. coli*

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng nguyên *E.coli* được phân lập của kiểu huyết thanh O25, O1, O2, và O6.

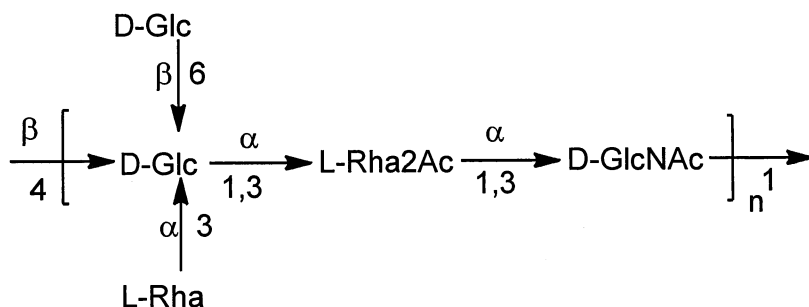
Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng nguyên O được phân lập từ chủng *E.coli* upec138. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng nguyên O được phân lập từ chủng *E.coli* upec163. Theo một phương án cụ

thể khác, sáng chế đề cập đến kháng nguyên O được phân lập từ chủng *E.coli* upec177.

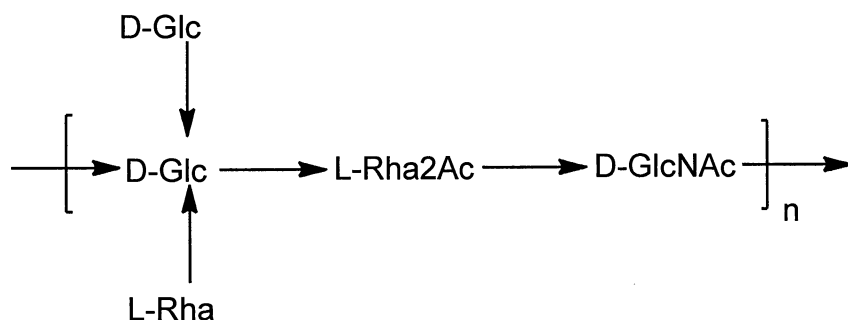
Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng nguyên O25B của *E.coli* được phân lập có công thức O25B:



Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng nguyên O25B' của *E.coli* được phân lập có công thức O25B':

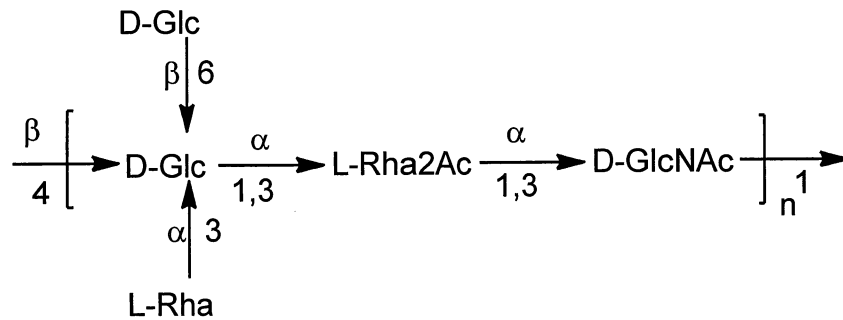


Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến hỗn hợp các đại phân tử được phân lập có công thức O25B, như được thể hiện dưới đây:



trong đó n là số nguyên có giá trị nằm trong khoảng từ 1 đến 30, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 5, 10 đến 30, 15 đến 30, 20 đến 30, 25 đến 30, 5 đến 25, 10 đến 25, 15 đến 25, 20 đến 25, 10 đến 20, hoặc 15 đến 20. Theo một phương án cụ thể, n của ít nhất 80% của các đại phân tử trong hỗn hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 30, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 5, 10 đến 30, 15 đến 30, 20 đến 30, 25 đến 30, 5 đến 25, 10 đến 25, 15 đến 25, 20 đến 25, 10 đến 20, hoặc 15 đến 20.

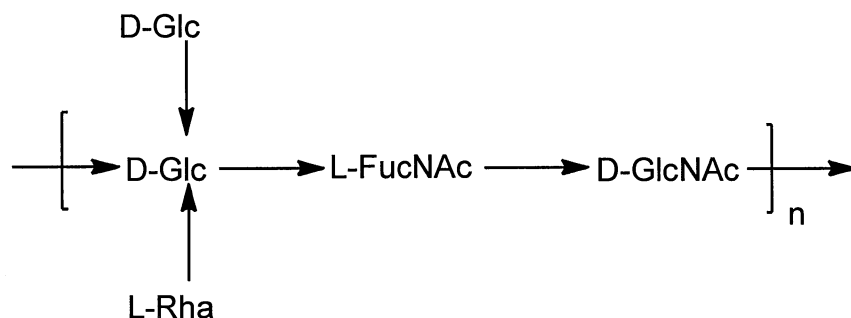
Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến hỗn hợp các đại phân tử được phân lập có công thức O25B', như được thể hiện dưới đây:



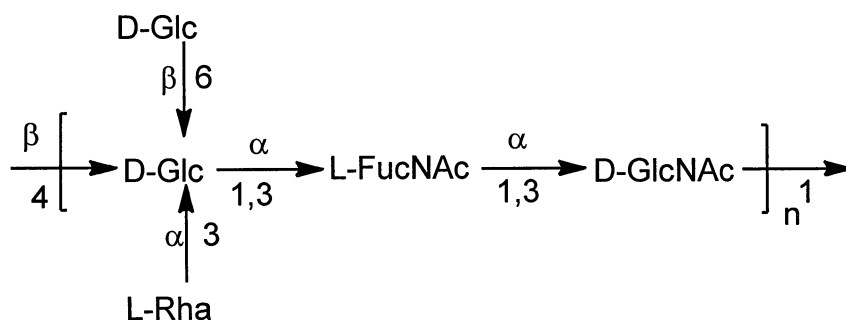
trong đó n là số nguyên có giá trị nằm trong khoảng từ 1 đến 30, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 5, 10 đến 30, 15 đến 30, 20 đến 30, 25 đến 30, 5 đến 25, 10 đến 25, 15 đến 25, 20 đến 25, 10 đến 20, hoặc 15 đến 20. Theo một phương án cụ thể, n của ít nhất 80% của các đại phân tử trong hỗn hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 30, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 5, 10 đến 30, 15 đến 30, 20 đến 30, 25 đến 30, 5 đến 25, 10 đến 25, 15 đến 25, 20 đến 25, 10 đến 20, hoặc 15 đến 20.

Các kháng nguyên *E.coli* khác hữu dụng trong chế phẩm theo sáng chế (ví dụ, dược phẩm trị liệu, ví dụ, vaccin; xem mục “Chế phẩm” dưới đây) bao gồm kháng nguyên O25A, cũng như O1, O2, và O6, và các kiểu huyết thanh phụ của chúng.

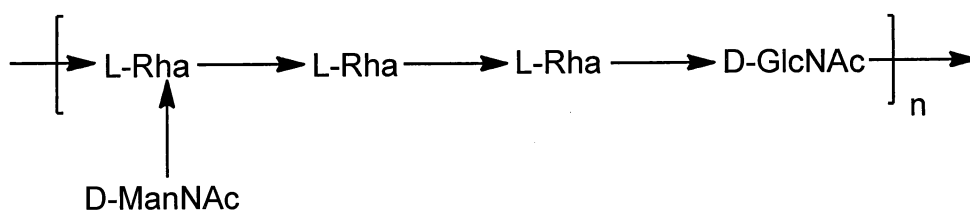
Theo một phương án, kháng nguyên O25A (ví dụ, ở dạng được phân lập hoặc ở dạng thành phần của phức hợp sinh học) được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế (ví dụ, kết hợp với kháng nguyên O25B (hoặc phức hợp sinh học chứa kháng nguyên O25B)). Theo một phương án cụ thể, kháng nguyên O25A có công thức O25A dưới đây:



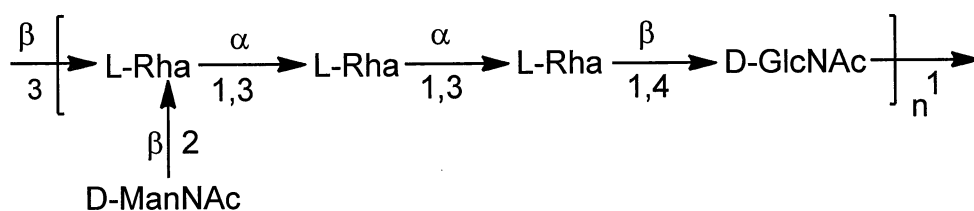
Theo một phương án cụ thể khác, kháng nguyên O25A có công thức O25A' dưới đây:



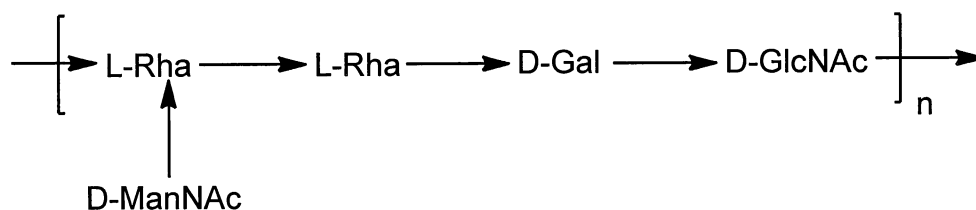
Theo một phương án, kháng nguyên O1A (ví dụ, ở dạng được phân lập hoặc ở dạng thành phần của phức hợp sinh học) được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế (ví dụ, kết hợp với kháng nguyên O25B (hoặc phức hợp sinh học chứa kháng nguyên O25B)). Theo một phương án cụ thể, kháng nguyên O1A có công thức O1A dưới đây:



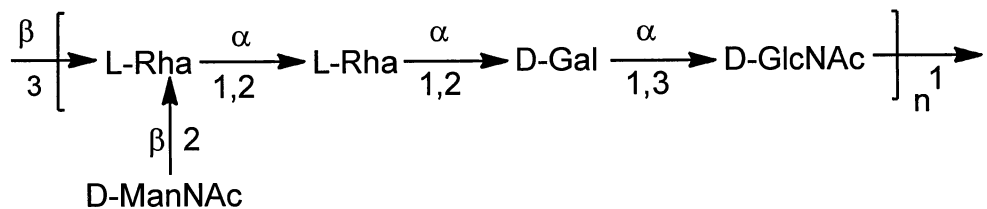
Theo một phương án cụ thể khác, kháng nguyên O1A có công thức O1A' dưới đây:



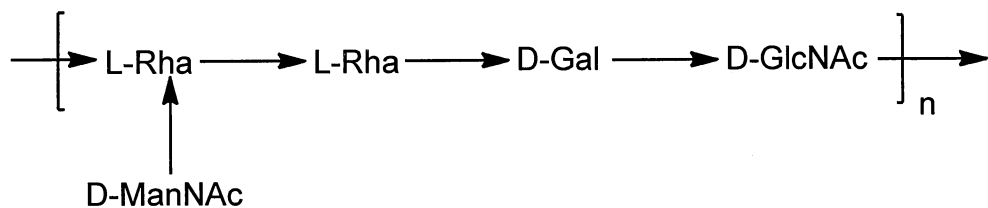
Theo một phương án, kháng nguyên O1B (ví dụ, ở dạng được phân lập hoặc ở dạng thành phần của phức hợp sinh học) được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế (ví dụ, kết hợp với kháng nguyên O25B (hoặc phức hợp sinh học chứa kháng nguyên O25B)). Theo một phương án cụ thể, kháng nguyên O1B có công thức O1B dưới đây:



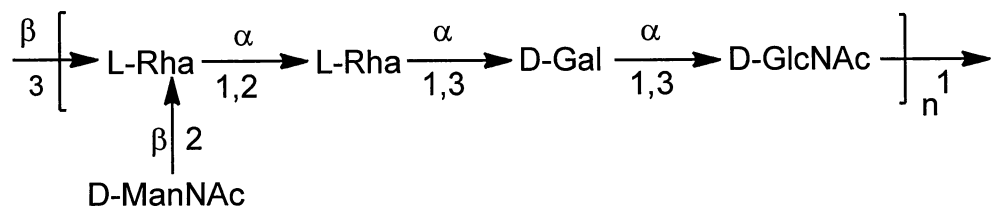
Theo một phương án cụ thể khác, kháng nguyên O1B có công thức O1B' dưới đây:



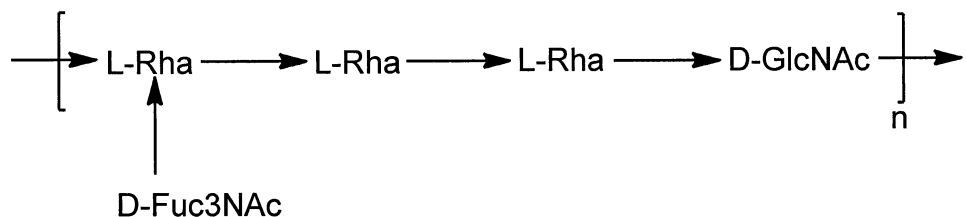
Theo một phương án, kháng nguyên O1C (ví dụ, ở dạng được phân lập hoặc ở dạng thành phần của phức hợp sinh học) được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế (ví dụ, kết hợp với kháng nguyên O25B (hoặc phức hợp sinh học chứa kháng nguyên O25B)). Theo một phương án cụ thể, kháng nguyên O1C có công thức O1C dưới đây:



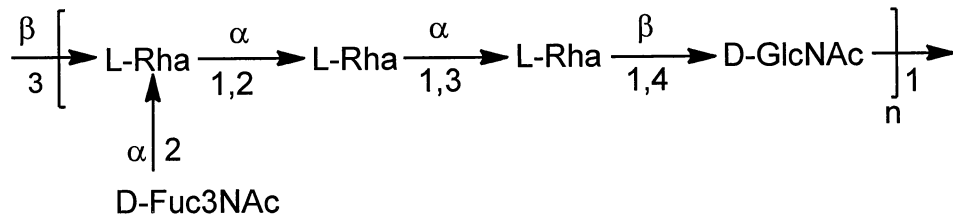
Theo một phương án cụ thể khác, kháng nguyên O1C có công thức O1C' dưới đây:



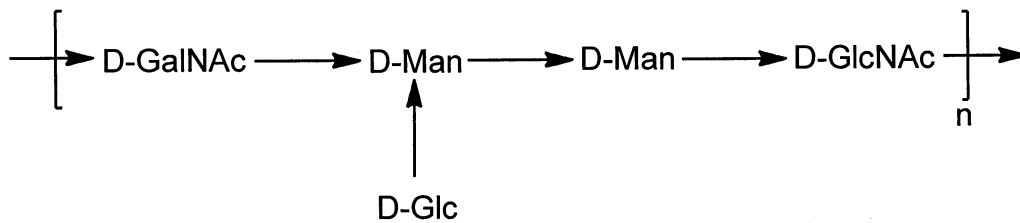
Theo một phương án, kháng nguyên O2 (ví dụ, ở dạng được phân lập hoặc ở dạng thành phần của phức hợp sinh học) được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế (ví dụ, kết hợp với kháng nguyên O25B (hoặc phức hợp sinh học chứa kháng nguyên O25B)). Theo một phương án cụ thể, kháng nguyên O2 có công thức O2 dưới đây:



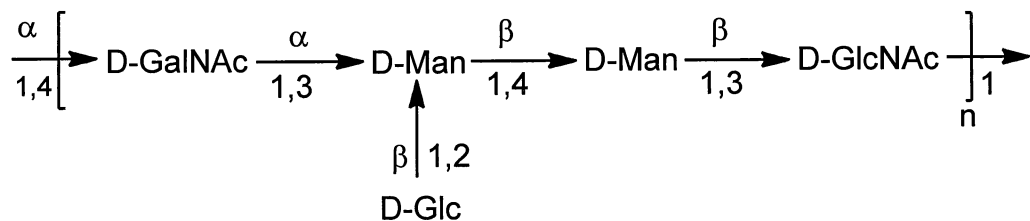
Theo một phương án cụ thể khác, kháng nguyên O2 có công thức O2' dưới đây:



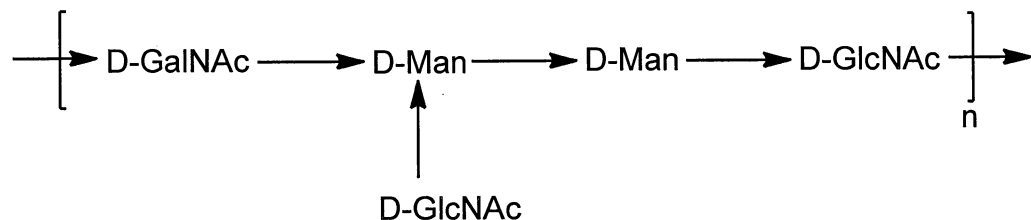
Theo một phương án, kháng nguyên O6 (ví dụ, ở dạng được phân lập hoặc ở dạng thành phần của phức hợp sinh học) được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế (ví dụ, kết hợp với kháng nguyên O25B (hoặc phức hợp sinh học chứa kháng nguyên O25B)). Theo một phương án cụ thể, kháng nguyên O6 có công thức O6K2 (còn được gọi là O6Glc) dưới đây:



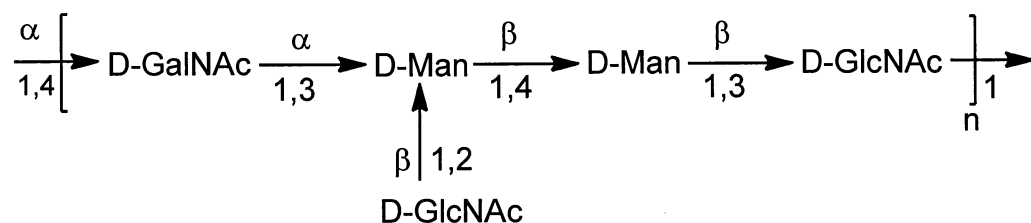
Theo một phương án cụ thể khác, kháng nguyên O6 có công thức O6K2' (còn được gọi là O6Glc') dưới đây:



Theo một phương án cụ thể khác, kháng nguyên O6 có công thức O6K54 (còn được gọi là O6GlcNAc) dưới đây:



Theo một phương án cụ thể khác, kháng nguyên O6 có công thức O6K54' (còn được gọi là O6GlcNAc') dưới đây:



Tế bào chủ

Sáng chế đề cập đến tế bào chủ, ví dụ, tế bào chủ không nhân, có khả năng sản xuất kháng nguyên O của *E.coli* và phức hợp sinh học chứa kháng nguyên O của *E.coli* này. Theo một số phương án, tế bào chủ theo sáng chế chứa (ví dụ, tự nhiên hoặc thông qua biến đổi gen) một hoặc nhiều của axit nucleic theo sáng chế. Xem mục “Axit nucleic và protein”. Theo một số phương án, tế bào chủ theo sáng chế tạo ra một hoặc nhiều của kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế, và/hoặc tạo ra phức hợp sinh học chứa một hoặc nhiều của kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế. Xem mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân chứa axit nucleic mã hóa enzym (ví dụ, glycosyltransferaza) có khả năng sản xuất polysacarit theo sáng chế, O25B của *E. coli*. Sáng chế còn đề cập đến tế bào chủ chứa axit nucleic mã hóa enzym (ví dụ, glycosyltransferaza) có khả năng sản xuất các kháng nguyên khác của *E. coli*, ví dụ, O25A, O1, O2, và O6, và các kiểu huyết thanh phụ của chúng (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”). Tế bào chủ theo sáng chế có thể biểu hiện một cách tự nhiên axit nucleic có khả năng sản xuất của kháng nguyên O liên quan, hoặc tế bào chủ có thể được tạo ra để biểu hiện axit nucleic này, cụ thể hơn, theo một số phương án axit nucleic này không tương đồng (khác loại) với tế bào chủ và được đưa vào trong tế bào chủ bằng cách sử dụng các kỹ thuật gen đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một số phương án, tế bào chủ theo sáng chế chứa axit nucleic mã hóa enzym khác có hoạt tính đối với quá trình N-glycosyl hóa của protein, ví dụ, tế bào chủ theo sáng chế có thể còn chứa axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza hoặc axit nucleic mã hóa glycosyltransferaza khác. Xem, ví dụ, mục “Bộ máy glycosyl hóa”. Theo một số phương án, tế bào chủ theo sáng chế chứa axit nucleic mã hóa protein mang, ví dụ, protein mà oligo- và polysacarit có thể được gắn vào để tạo ra phức hợp sinh học. Xem, ví dụ, mục “Protein mang” liên quan đến protein mang và mục “Phức hợp sinh học” liên quan đến phức hợp sinh học. Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Upec138 là chủng *E.coli* như được mô tả trong bản mô tả này thuộc kiểu huyết thanh O25B, và cụm gen *rfb* của chủng này (và chủng của kiểu huyết thanh

O25B nói chung) được mô tả trong bản mô tả này lần đầu tiên vì chứa gen mà tạo ra polysacarit *E.coli* mới, O25B. Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân chứa cụm gen *rfb*(upec138) của *E.coli* (SEQ ID NO:12), hoặc cụm gen mà tương đồng khoảng hoặc ít nhất là 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO:12. Theo một phương án cụ thể, cụm gen *rfb*(upec138) của *E.coli* (SEQ ID NO:12) được đưa vào trong tế bào chủ bằng kỹ thuật thao tác trên gen (ví dụ, cụm gen được biểu hiện trên plasmid hoặc plasmid hoặc được kết hợp vào trong hệ gen tế bào chủ (xem, ví dụ, đơn quốc tế số PCT/EP2013/068737). Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14) hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa hoặc Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể khác, một số hoặc tất cả của gen của cụm *rfb* không tương đồng với tế bào chủ. Theo một phương án cụ thể khác, oligosacaryl transferaza không tương đồng với tế bào chủ. Theo một phương án cụ thể khác, protein mang này không tương đồng với tế bào chủ. Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Upec163 là chủng *E.coli* như được mô tả trong bản mô tả này thuộc kiểu huyết thanh O25B, và cụm gen *rfb* của chủng (và chủng của kiểu huyết thanh O25B nói chung) được mô tả trong bản mô tả này lần đầu tiên vì chứa gen mà tạo ra polysacarit *E.coli* mới, O25B. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân chứa cụm gen *rfb*(upec163) của *E. coli*, hoặc cụm gen mà tương đồng khoảng hoặc ít nhất là 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% tương đồng với cụm gen *rfb*(upec163) của *E. coli*. Theo một phương án cụ thể, cụm gen *rfb*(upec163) của *E.coli* được đưa vào trong tế bào chủ bằng kỹ thuật thao tác trên gen (ví dụ, cụm gen được biểu hiện trên plasmid hoặc các plasmid hoặc được kết hợp vào trong hệ gen tế bào chủ (xem, ví dụ, đơn quốc tế số PCT/EP2013/068737)). Theo một phương án khác, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể

khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14) hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa hoặc Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể khác, một số hoặc tất cả của gen của cụm *rfb* không tương đồng với tế bào chủ. Theo một phương án cụ thể khác, oligosacaryl transferaza này không tương đồng với tế bào chủ. Theo một phương án cụ thể khác, protein mang này không tương đồng với tế bào chủ. Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Upec177 là chủng *E.coli* như được mô tả trong bản mô tả này thuộc kiểu huyết thanh O25B, và cụm gen *rfb* của chủng này (và chủng của kiểu huyết thanh O25B nói chung) được mô tả trong bản mô tả này lần đầu tiên vì chứa gen mà tạo ra polysacarit *E.coli* mới, O25B. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân chứa cụm gen *rfb*(upec177) của *E. coli*, hoặc cụm gen mà tương đồng khoảng hoặc ít nhất là 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% tương đồng với cụm gen *rfb*(upec177) của *E. coli*. Theo một phương án cụ thể, cụm gen *rfb*(upec177) của *E.coli* được đưa vào trong tế bào chủ bằng kỹ thuật thao tác trên gen (ví dụ, cụm gen được biểu hiện trên plasmid hoặc các plasmid hoặc được kết hợp vào trong hệ gen tế bào chủ (xem, ví dụ, đơn quốc tế số PCT/EP2013/068737). Theo một phương án khác, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14) hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa hoặc Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể khác, một số hoặc tất cả của gen của cụm *rfb* không tương đồng với tế bào chủ. Theo một phương án cụ thể khác, oligosacaryl transferaza này không tương đồng với tế bào chủ. Theo một phương án cụ thể khác, protein mang này không tương đồng với tế bào chủ. Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân (ví dụ, tế bào chủ không nhân được biến đổi tái tổ hợp) mà tạo ra O25B, trong đó tế bào chủ này chứa gen *rmlB*, *rmlD*, *rmlA*, *rmlC*, *wzx*, *wekA*, *wekB*, *wzy*, *wbbJ*, *wbbK*, và/hoặc *wbbL*. Tế bào chủ này có thể được biến đổi bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp để chứa một hoặc nhiều plasmid chứa gen *rmlB*, *rmlD*, *rmlA*, *rmlC*, *wzx*, *wekA*, *wekB*, *wzy*, *wbbJ*, *wbbK*, và/hoặc *wbbL*. Theo một số phương án, một hoặc nhiều plasmid này được kết hợp vào trong hệ gen tế bào chủ. Theo một phương án cụ thể, *rmlB* này chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO:1, hoặc giống hoặc tương đồng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:1. Theo một phương án cụ thể, *rmlD* này chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO:2, hoặc giống hoặc tương đồng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:2. Theo một phương án cụ thể, *rmlA* này chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO:3, hoặc giống hoặc tương đồng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:3. Theo một phương án cụ thể, *rmlC* này chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO:4, hoặc giống hoặc tương đồng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:4. Theo một phương án cụ thể, *wzx* này hoặc bao gồm SEQ ID NO:5, hoặc giống hoặc tương đồng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:5. Theo một phương án cụ thể, *wekA* này chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO:6, hoặc giống hoặc tương đồng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:6. Theo một phương án cụ thể, *wekB* này chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO:7, hoặc giống hoặc tương đồng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:7. Theo một phương án cụ thể, *wzy* này chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO:8, hoặc giống hoặc tương đồng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:8. Theo một phương án cụ thể, *wbbJ* chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO:9, hoặc giống hoặc tương đồng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:9. Theo một phương án cụ thể, *wbbK* này chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO:10, hoặc giống hoặc tương đồng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:10. Theo một phương án cụ thể, *wbbL* này chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO:11, hoặc giống hoặc tương đồng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID

NO:11. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14) hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa hoặc Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể khác, một số hoặc tất cả các gen, *rmlB*, *rmlD*, *rmlA*, *rmlC*, *wzx*, *wekA*, *wekB*, *wzy*, *wbbJ*, *wbbK*, và *wbbL*, không tương đồng với tế bào chủ. Theo một phương án cụ thể khác, oligosacaryl transferaza này không tương đồng với tế bào chủ. Theo một phương án cụ thể khác, protein mang này không tương đồng với tế bào chủ. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ là *E. coli*.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân (ví dụ, tế bào chủ không nhân được biến đổi tái tổ hợp) mà tạo ra O25B, trong đó tế bào chủ này chứa một, hai, ba, bốn, hoặc nhiều hơn, ví dụ tất cả, các gen sau đây (hoặc axit nucleic mà tương đồng khoảng hoặc ít nhất là 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% tương đồng với một trong số các gen sau đây, và tốt hơn là mã hóa protein với cùng chức năng) dưới đây: *rmlB* (SEQ ID NO:1), *rmlD* (SEQ ID NO:2), *rmlA* (SEQ ID NO:3), *rmlC* (SEQ ID NO:4), *wzx* (SEQ ID NO:5), *wekA* (SEQ ID NO:6), *wekB* (SEQ ID NO:7), *wzy* (SEQ ID NO:8), *wbbJ* (SEQ ID NO:9), *wbbK* (SEQ ID NO:10), và/hoặc *wbbL* (SEQ ID NO:11). Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ là *E. coli*.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân (ví dụ, tế bào chủ không nhân được biến đổi tái tổ hợp) có khả năng sản xuất

O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O của *E. coli*25B), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa trình tự axit nucleic của *rmlB* (SEQ ID NO:1). Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa trình tự nucleic mà mã hóa dTDP-Glucoza 4,6-dehydrataza, ví dụ, dTDP-Glucoza 4,6-dehydrataza được mã hóa bằng *rmlB*. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa axit nucleic mà khoảng hoặc ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với SEQ ID NO:1. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân (ví dụ, tế bào chủ không nhân được biến đổi tái tổ hợp) có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa trình tự axit nucleic của *rmlD* (SEQ ID NO:2). Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa trình tự nucleic mà mã hóa dTDP-6-Deoxy-D-Glucoza 3,5-epimeraza, ví dụ, dTDP-6-Deoxy-D-Glucoza 3,5-epimeraza được mã hóa bằng

rmlD. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa axit nucleic mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với SEQ ID NO:2. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân (ví dụ, tế bào chủ không nhân được biến đổi tái tổ hợp) có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa trình tự axit nucleic của *rmlA* (SEQ ID NO:3). Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa trình tự nucleic mà mã hóa Glucoza-1-phosphat thymidylyltransferaza, ví dụ, Glucoza-1-phosphat thymidylyltransferaza được mã hóa bằng *rmlA*. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa axit nucleic mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với SEQ ID NO:3. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân

còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân (ví dụ, tế bào chủ không nhân được biến đổi tái tổ hợp) có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa trình tự axit nucleic của *rmlC* (SEQ ID NO:4). Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa trình tự nucleic mà mã hóa dTDP-4-dehydrorhamnoza 3,5-epimeraza, ví dụ, dTDP-4-dehydrorhamnoza 3,5-epimeraza được mã hóa bằng *rmlC*. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa axit nucleic mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với SEQ ID NO:4. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân (ví dụ, tế bào chủ không nhân được biến đổi tái tổ hợp) có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết

với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa trình tự axit nucleic của *wzx* (SEQ ID NO:5). Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa trình tự nucleic mã hóa flippaza của kháng nguyên O, ví dụ, flippaza của kháng nguyên O được mã hóa bằng *wzx*. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa axit nucleic mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với SEQ ID NO:5. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân (ví dụ, tế bào chủ không nhân được biến đổi tái tổ hợp) có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa trình tự axit nucleic của *wekA* (SEQ ID NO:6). Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa trình tự nucleic mã hóa rhamnosyltransferaza, ví dụ, dTDP-Rha:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP α -1,3-rhamnosyltransferaza được mã hóa bằng *wekA*. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ

không nhân có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa axit nucleic mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với SEQ ID NO:6. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân (ví dụ, tế bào chủ không nhân được biến đổi tái tổ hợp) có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa trình tự axit nucleic của *wekB* (SEQ ID NO:7). Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa trình tự nucleic mã hóa *wekB* glucosyltransferaza, ví dụ, UDP-Glc:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP β -1,6- glucosyltransferaza được mã hóa bằng *wekB*. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa axit nucleic mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với SEQ ID NO:7. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-

Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân (ví dụ, tế bào chủ không nhân được biến đổi tái tổ hợp) có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa trình tự axit nucleic của *wzy* (SEQ ID NO:8). Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa trình tự nucleic mã hóa polymeraza của kháng nguyên O, ví dụ, polymeraza của kháng nguyên O được mã hóa bằng *wzy*. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa axit nucleic mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với SEQ ID NO:8. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân (ví dụ, tế bào chủ không nhân được biến đổi tái tổ hợp) có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc

được biến đổi để chứa trình tự axit nucleic của *wbbJ* (SEQ ID NO:9). Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa trình tự nucleic mà mã hóa anO-axetyl transferaza, ví dụ, anO-axetyl transferaza được mã hóa bằng *wbbJ*. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa axit nucleic mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với SEQ ID NO:9, Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân (ví dụ, tế bào chủ không nhân được biến đổi tái tổ hợp) có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa trình tự axit nucleic của *wbbK* (SEQ ID NO:10). Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa trình tự nucleic mà mã hóa glucosyltransferaza, ví dụ, UDP-Glc:Rha-GlcNAc-UPP α -1,3-glucosyltransferaza được mã hóa bằng *wbbK*. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein

mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa axit nucleic mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với SEQ ID NO:10. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân (ví dụ, tế bào chủ không nhân được biến đổi tái tổ hợp) có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa trình tự axit nucleic của *wbbL* (SEQ ID NO:11). Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa trình tự nucleic mã hóa rhamnosyl transferaza, ví dụ, dTDP-Rha:GlcNAc-UPP α -1,3-rhamnosyltransferaza được mã hóa bằng *wbbL*. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa axit nucleic mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với SEQ ID NO:11. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc protein mang

chứa trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân (ví dụ, tế bào chủ không nhân được biến đổi tái tổ hợp) có khả năng sản xuất O25B, và/hoặc phức hợp sinh học O25B (cụ thể hơn, protein mang được liên kết với kháng nguyên O25B của *E. coli*), trong đó bản thân tế bào chủ này chứa hoặc được biến đổi để chứa ít nhất một, hai, ba, bốn hoặc nhiều hơn, ví dụ tất cả, các thành phần sau đây: (i) trình tự axit nucleic mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với SEQ ID NO:1; (ii) trình tự axit nucleic mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với SEQ ID NO:2; (iii) trình tự axit nucleic mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với SEQ ID NO:3; (iv) trình tự axit nucleic mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với SEQ ID NO:4; (v) trình tự axit nucleic mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với SEQ ID NO:5; (vi) trình tự axit nucleic mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với SEQ ID NO:6; (vii) trình tự axit nucleic mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với SEQ ID NO:7; (viii) trình tự axit nucleic mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với SEQ ID NO:8; (ix) trình tự axit nucleic mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với SEQ ID NO:9; (x) trình tự axit nucleic mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với

SEQ ID NO:10; và/hoặc (xi) trình tự axit nucleic mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với SEQ ID NO:11. Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ này được biến đổi để chứa mỗi trong số các trình tự này, cụ thể hơn, các trình tự này không tương đồng với tế bào chủ này. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân (ví dụ, tế bào chủ không nhân được biến đổi tái tổ hợp) mà tạo ra O25B, trong đó tế bào chủ này chứa ít nhất hai trong số (i) *wbbJ* (SEQ ID NO:9) hoặc axit nucleic mà tương đồng khoảng hoặc ít nhất là 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:9; (ii) *wbbK* (SEQ ID NO:10) hoặc axit nucleic mà tương đồng khoảng hoặc ít nhất là 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:10; và/hoặc (iii) *wbbL* (SEQ ID NO:11) hoặc axit nucleic mà tương đồng khoảng hoặc ít nhất là 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:11. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân (ví dụ, tế bào chủ không nhân được biến đổi tái tổ hợp) mà tạo ra O25B, trong đó tế bào chủ này chứa mỗi trong số (i) *wbbJ* (SEQ ID NO:9) hoặc axit nucleic mà

tương đồng khoảng hoặc ít nhất là 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:9; (ii) *wbbK* (SEQ ID NO:10) hoặc axit nucleic mà tương đồng khoảng hoặc ít nhất là 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:10; và (iii) *wbbL* (SEQ ID NO:11) hoặc axit nucleic mà tương đồng khoảng hoặc ít nhất là 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO:11. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân (ví dụ, tế bào chủ không nhân được biến đổi tái tổ hợp) mà tạo ra O25B, trong đó tế bào chủ này chứa (i) dTDP-Glucoza 4,6-dehydrataza; (ii) dTDP-6-Deoxy-D-Glucoza 3,5-epimeraza; (iii) Glucoza-1-phosphat thymidyltransferaza; (iv) dTDP-4-dehydrorhamnoza 3,5-epimeraza; (v) flippaza kháng nguyên O; (vi) dTDP-Rha:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP α -1,3-rhamnosyltransferaza; (vii) UDP-Glc:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP β -1,6- glucosyltransferaza (viii) polymeraza của kháng nguyên O; (ix) O-axetyl transferaza; (x) UDP-Glc:Rha-GlcNAc-UPP α -1,3-glucosyltransferaza và/hoặc (xi) dTDP-Rha: GlcNAc-UPP α -1,3-rhamnosyltransferaza. Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14) hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa hoặc Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể khác, một số hoặc tất cả trong số (i) dTDP-Glucoza 4,6-dehydrataza; (ii) dTDP-6-Deoxy-D-Glucoza 3,5-epimeraza; (iii) Glucoza-1-phosphat

thymidylyltransferaza; (iv) dTDP-4-dehydrorhamnoza 3,5-epimeraza; (v) flippaza kháng nguyên O; (vi) dTDP-Rha:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP α -1,3-rhamnosyltransferaza; (vii) UDP-Glc:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP β -1,6-glucosyltransferaza (viii) polymeraza của kháng nguyên O; (ix) O-axetyl transferaza; (x) UDP-Glc:Rha-GlcNAc-UPP α -1,3-glucosyltransferaza và/hoặc (xi) dTDP-Rha: GlcNAc-UPP α -1,3-rhamnosyltransferaza không tương đồng với tế bào chủ. Theo một phương án cụ thể khác, oligosacaryl transferaza này không tương đồng với tế bào chủ. Theo một phương án cụ thể khác, protein mang này không tương đồng với tế bào chủ. Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân (ví dụ, tế bào chủ không nhân được biến đổi tái tổ hợp) mà tạo ra O25A của *E. coli*, cụ thể hơn, tế bào chủ này chứa enzym có khả năng tổng hợp O25A của *E.coli* (xem, ví dụ, Fig.3). Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân (ví dụ, tế bào chủ không nhân được biến đổi tái tổ hợp) mà tạo ra O1 của *E. coli*, cụ thể hơn, tế bào chủ này chứa enzym có khả năng tổng hợp O1 của *E.coli* (xem, ví dụ, Fig.12). Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến tế bào chủ mà tạo ra O1A của *E. coli*. Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến tế bào chủ mà tạo ra O1B của *E. coli*. Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến tế bào chủ mà tạo ra O1C của *E. coli*. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-

Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân (ví dụ, tế bào chủ không nhân được biến đổi tái tổ hợp) mà tạo ra O2 của *E. coli*, cụ thể hơn, tế bào chủ này chứa enzym có khả năng tổng hợp O2 của *E.coli* (xem, ví dụ, Fig.19). Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ không nhân (ví dụ, tế bào chủ không nhân được biến đổi tái tổ hợp) mà tạo ra O6 của *E. coli*, cụ thể hơn, tế bào chủ này chứa enzym có khả năng tổng hợp O6 của *E.coli* (xem, ví dụ, Fig.17). Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến tế bào chủ mà tạo ra O6 của *E.coli* chứa monosacarit Glc phân nhánh hoặc kháng nguyên O6 chứa monosacarit GlcNAc phân nhánh. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Sáng chế còn đề cập đến tế bào chủ không nhân (ví dụ, tế bào chủ không nhân được biến đổi tái tổ hợp) có khả năng sản xuất nhiều hơn một kiểu huyết thanh O của *E. coli*. Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến tế bào chủ có khả năng sản xuất ít nhất hai trong số các thành phần sau: O25B, O25A, O1 (ví dụ,

O1A, O1B, O1C), O2, và O6. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ có khả năng sản xuất O25B và một hoặc nhiều trong số O25A, O1 (ví dụ, O1A, O1B, O1C), O2, và O6. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân chứa trình tự axit nucleic mã hóa oligosacaryl transferaza. Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ không nhân còn chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là *E. coli*.

Nền di truyền

Tế bào chủ bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để tạo ra kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (ví dụ, O25B) và phức hợp sinh học chứa kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (ví dụ, O25B), bao gồm cổ khuẩn, tế bào chủ không nhân, và tế bào chủ có nhân. Ví dụ về tế bào chủ không nhân để sử dụng trong sự sản xuất kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế và phức hợp sinh học chứa kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, loài *Escherichia*, loài *Shigella*, loài *Klebsiella*, loài *Xantomonas*, loài *Salmonella*, loài *Yersinia*, loài *Lactococcus*, *LactoBacillus*, loài *Pseudomonas*, loài *Corynebacterium*, loài *Streptomyces*, loài *Streptococcus*, loài *Staphylococcus*, loài *Bacillus*, và loài *Clostridium*. Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ được sử dụng để tạo ra kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế và phức hợp sinh học chứa kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế *E. coli*.

Theo một số phương án, tế bào chủ được sử dụng để tạo ra kháng nguyên O của *E.coli* và phức hợp sinh học theo sáng chế được biến đổi để chứa axit nucleic không tương đồng (khác loại), ví dụ, axit nucleic không tương đồng mà mã hóa một hoặc nhiều protein mang và/hoặc axit nucleic không tương đồng mà mã hóa một hoặc nhiều protein, ví dụ, gen mã hóa một hoặc nhiều protein. Theo một phương án cụ thể, axit nucleic không tương đồng mà mã hóa protein tham gia vào con đường glycosyl hóa (ví dụ, con đường glycosyl hóa trong tế bào không nhân

và/hoặc có nhân) có thể là được đưa vào trong tế bào chủ theo sáng chế. Axit nucleic này có thể mã hóa protein bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, oligosacaryl transferaza và/hoặc glycosyltransferaza. Axit nucleic không tương đồng (ví dụ, axit nucleic mà mã hóa protein mang và/hoặc axit nucleic mà mã hóa protein khác, ví dụ, protein tham gia vào quá trình glycosyl hóa) có thể là được đưa vào trong tế bào chủ theo sáng chế bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, điện di, chuyển hóa hóa học bằng cách sốc nhiệt, chuyển hóa tự nhiên, tải nạp thể thực khuẩn, và tạo phức. Theo các phương án cụ thể, axit nucleic không tương đồng được đưa vào trong tế bào chủ theo sáng chế bằng cách sử dụng plasmit, ví dụ, axit nucleic không tương đồng được biểu hiện trong tế bào chủ bằng plasmit (ví dụ, vectơ biểu hiện). Theo một phương án cụ thể khác, axit nucleic không tương đồng được đưa vào trong tế bào chủ theo sáng chế bằng cách sử dụng phương pháp chèn được mô tả trong đơn quốc tế số PCT/EP2013/068737.

Theo một số phương án, các biến đổi khác có thể là được tạo ra (ví dụ, bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp) vào trong tế bào chủ theo sáng chế. Ví dụ, axit nucleic tế bào chủ (ví dụ, gen) mà mã hóa protein mà tham gia một phần và con đường glycosyl hóa can thiệp hoặc cạnh tranh có thể có (ví dụ, cạnh tranh hoặc can thiệp với một hoặc nhiều gen không tương đồng tham gia vào quá trình glycosyl hóa mà được đưa vào bằng cách tái tổ hợp trong tế bào chủ) có thể được loại bỏ hoặc được biến đổi trong nền tế bào chủ (hệ gen) theo cách mà làm chúng bất hoạt/rối loạn chức năng (cụ thể hơn, axit nucleic tế bào chủ mà được loại bỏ/được biến đổi không mã hóa protein chức năng hoặc không mã hóa protein bất kỳ). Theo một số phương án, khi axit nucleic được loại bỏ từ bộ gen của tế bào chủ theo sáng chế, chúng được thay thế bằng trình tự mong muốn, ví dụ, trình tự mã hữu dụng cho quá trình sản xuất glycoprotein.

Ví dụ về gen mà có thể được loại bỏ trong tế bào chủ (và, trong một số trường hợp, được thay thế bằng trình tự axit nucleic mong muốn khác) bao gồm gen của tế bào chủ tham gia vào quá trình sinh tổng hợp glycolipit, như *waaL* (xem, ví dụ, Feldman et al., 2005, PNAS USA 102:3016-3021), cụm sinh tổng hợp nhân lipit A (*waa*), cụm galactosa (*gal*), cụm arabinoza (*ara*), cụm axit colonic (*wc*),

cụm polysacarit bao vi khuẩn, gen sinh tổng hợp undecaprenol-p (ví dụ *uppS*, *uppP*), gen tái tuần hoàn und-P, enzym chuyển hóa tham gia vào quá trình sinh tổng hợp đường được hoạt hóa bằng nucleotit, cụm kháng nguyên phổ biến của vi khuẩn trong ruột, và cụm biến đổi kháng nguyên O tiền thực thể vi khuẩn như cụm *gtrABS*. Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ theo sáng chế được biến đổi sao cho chúng không tạo ra bất kỳ kháng nguyên O nào khác ngoài kháng nguyên O mong muốn từ ExPEC, ví dụ, O25B. Theo một phương án cụ thể, một hoặc nhiều trong số các gen *waaL*, gen *gtrA*, gen *gtrB*, gen *gtrS*, hoặc cụm gen *rfb* được loại bỏ hoặc làm bất hoạt chức năng từ bộ gen của tế bào chủ không nhân theo sáng chế. Theo một phương án, tế bào chủ được sử dụng theo sáng chế là *E.coli* mà tạo ra kháng nguyên O25B, trong đó gen *waaL*, gen *gtrA*, gen *gtrB*, và gen *gtrS* được loại bỏ hoặc làm bất hoạt chức năng từ bộ gen của tế bào chủ. Theo một phương án khác, tế bào chủ được sử dụng theo sáng chế là *E.coli* mà tạo ra kháng nguyên O25B, trong đó gen *waaL* và gen *gtrS* được loại bỏ hoặc làm bất hoạt chức năng từ bộ gen của tế bào chủ.

Theo một số phương án, tế bào chủ được biến đổi theo sáng chế có thể được sử dụng cho quá trình glycosyl hóa protein. Quá trình glycosyl hóa protein có thể được điều chỉnh để tạo ra phức hợp sinh học để sử dụng trong thành phần vaccin, ví dụ, vaccin mà chứa (các) kháng nguyên polysacarit của *E. coli*, ví dụ, O25 (ví dụ, O25B), O1, O2, và O6.

Protein mang

Protein mang bất kỳ thích hợp để sử dụng trong sự sản xuất phức hợp cho vaccin (ví dụ, phức hợp sinh học để sử dụng trong vaccin) có thể được sử dụng theo sáng chế, ví dụ, axit nucleic mã hóa protein mang có thể là được đưa vào trong tế bào chủ theo sáng chế cho quá trình sản xuất phức hợp sinh học chứa protein mang được liên kết với kháng nguyên ExPEC (ví dụ, O25B). Ví dụ về protein mang bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ngoại độc tố A được khử độc tính của *P. aeruginosa* (EPA; xem, ví dụ, Ihssen, et al., (2010) Microbial cell factories 9, 61), CRM197, protein gắn kết maltoza (MBP), giải độc tố bạch cầu, giải độc tố uốn ván, tan huyết tố được khử độc tính của *S. aureus*, yếu tố kết cụm A, yếu tố kết cụm B, FimH của *E. coli*, FimHC của *E. coli*, độc tố đường ruột không bền nhiệt

của *E. coli*, biến thể được khử độc tính của độc tố đường ruột không bền nhiệt của *E. coli*, tiểu đơn vị B của độc tố cholera (CTB), độc tố cholera, biến thể được khử độc tính của độc tố cholera, protein Sat của *E. coli*, vùng chờ của protein Sat của *E. coli*, Pneumolysin của *Streptococcus pneumoniae* và biến thể được khử độc tính của chúng, AcrA của *C. jejuni*, và glycoprotein tự nhiên của *C. jejuni*. Đối với EPA, các biến thể protein được khử độc tính khác nhau được mô tả trong tài liệu chuyên ngành và có thể được sử dụng làm protein mang.

Theo một số phương án, protein mang được sử dụng trong việc tạo ra phức hợp sinh học theo sáng chế được biến đổi, ví dụ, được biến đổi theo cách mà protein này ít độc hơn và/hoặc nhạy hơn với quá trình glycosyl hóa. Theo một phương án cụ thể, protein mang được sử dụng trong việc tạo ra phức hợp sinh học theo sáng chế được biến đổi sao cho số vị trí glycosyl hóa trong protein mang được tối ưu hóa theo cách mà cho phép sử dụng nồng độ thấp hơn của protein, ví dụ, trong chế phẩm gây miễn dịch, trong dạng phức hợp sinh học của nó.

Theo một số phương án, protein mang theo sáng chế được biến đổi để bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa hơn so với dạng bình thường cùng với protein mang (ví dụ, so với số vị trí glycosyl hóa cùng với protein mang ở trạng thái tự nhiên/vốn có của nó, ví dụ, trạng thái “kiểu tự nhiên”). Theo các phương án cụ thể, việc bổ sung vị trí glycosyl hóa được thực hiện bằng cách chèn trình tự điều hòa quá trình glycosyl hóa (ví dụ, Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987)) ở vị trí bất kỳ trong cấu trúc bậc một của protein. Việc bổ sung vị trí glycosyl hóa này có thể là được thực hiện bằng cách, ví dụ, bổ sung axit amin mới vào cấu trúc bậc một của protein (cụ thể hơn, vị trí glycosyl hóa được bổ sung, hoàn toàn hoặc một phần), hoặc bằng cách làm đột biến axit amin có mặt trong protein để tạo ra vị trí glycosyl hóa (cụ thể hơn, axit amin không được bổ sung vào protein, nhưng axit amin được chọn của protein được làm đột biến để tạo ra vị trí glycosyl hóa). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ xác định được rằng trình tự axit amin của protein có thể được biến đổi một cách dễ dàng bằng cách sử dụng kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực

kỹ thuật này, ví dụ, kỹ thuật tái tổ hợp mà bao gồm việc biến đổi của trình tự axit nucleic mã hóa protein. Theo các phương án cụ thể, trình tự điều hòa quá trình glycosyl hóa được đưa vào trong vùng đặc hiệu của protein mang, ví dụ, cấu trúc bề mặt của protein, ở đầu N hoặc C của protein, và/hoặc trong vòng mà được ổn định bằng cầu nối disulfua ở bazơ của protein. Theo một số phương án, trình tự điều hòa quá trình glycosyl hóa chứa 5 axit amin cổ điển có thể được kéo dài bằng gốc lysin để glycosyl hóa một cách hiệu quả hơn, và do đó trình tự điều hòa được chèn có thể mã hóa 5, 6, hoặc 7 axit amin mà tốt hơn là được chèn hoặc thay thế cho axit amin của protein nhận. Theo một phương án cụ thể protein mang là EPA được khử độc tính chứa 4 trình tự điều hòa quá trình glycosyl hóa Asp/Glu-X-Asn-Z-Ser/Thr (SEQ ID NO:15), và có trình tự axit amin như được mô tả trong SEQ ID NO: 13.

Theo một số phương án, protein mang được sử dụng trong việc tạo ra phức hợp sinh học theo sáng chế chứa “tag” (đánh dấu), cụ thể hơn, trình tự của axit amin mà giúp phân lập và/hoặc xác định protein mang. Ví dụ, bổ sung tag vào protein mang theo sáng chế có thể là hữu dụng trong việc tinh chế protein này và, do đó, việc tinh chế phức hợp cho vacxin chứa protein mang được đánh dấu (protein mang chứa tag). Ví dụ về tag mà có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Histidin tag (HIS) (ví dụ, hexa histidin-tag, hoặc 6XHis-Tag), FLAG-TAG, và HA tag. Theo một số phương án, tag được sử dụng theo sáng chế có thể được loại bỏ, ví dụ, loại bỏ bằng chất hóa học hoặc bằng phương pháp sử dụng enzym, nếu chúng không còn cần thiết, ví dụ, sau đó protein được tinh chế.

Theo một số phương án, protein mang theo sáng chế chứa trình tự đích mà hướng đích protein mang đến chu chất của tế bào chủ mà biểu hiện protein mang này. Theo một phương án cụ thể, trình tự đích là từ DsbA của *E. coli*, porin A lớp màng ngoài của *E.coli* (OmpA), protein gắn kết maltoza của *E.coli* (MalE), pectat lyaza của *Erwinia carotovora* (PelB), FlgI, NikA, hoặc endoxylanaza của *Bacillus sp.* (XynA), độc tố LTIIb đường ruột không bền nhiệt của *E. coli*, endoxylanaza XynA của *Bacillus*, hoặc flagellin của *E.coli* (FlgI).

Bộ máy glycosyl hóa

Tế bào chủ theo sáng chế chứa, và/hoặc có thể là được biến đổi để chứa, axit nucleic mà mã hóa bộ máy gen (ví dụ, glycosyltransferaza) có khả năng sản xuất kháng nguyên O từ ExPEC, ví dụ, các kháng nguyên O25 (ví dụ, O25B), O1, O2, và/hoặc O6. Xem mục “Axit nucleic và protein”.

Glycosyltransferaza

Tế bào chủ theo sáng chế chứa axit nucleic mà mã hóa glycosyltransferaza có khả năng sản xuất kháng nguyên O của ExPEC, ví dụ, kháng nguyên O từ *E.coli* có kiểu huyết thanh O25 (ví dụ, O25A hoặc O25B, xem Fig.3B), O1 (xem, Fig.12), O2 (xem, Fig.19), và O6 (ví dụ, kiểu huyết thanh O6 tạo ra kháng nguyên O6 chứa monosacarit Glc phân nhánh hoặc kháng nguyên O6 chứa monosacarit GlcNAc phân nhánh, xem Fig.17). Ví dụ về axit nucleic được mô tả trong mục “Axit nucleic và protein”. Theo một số phương án, một số hoặc tất cả của axit nucleic mà mã hóa glycosyltransferaza có khả năng sản xuất kháng nguyên O của ExPEC được biểu hiện một cách tự nhiên bằng tế bào chủ theo sáng chế (ví dụ, axit nucleic có trong nền “kiểu tự nhiên” của tế bào chủ). Theo một số phương án, một số hoặc tất cả của axit nucleic mà mã hóa glycosyltransferaza có khả năng sản xuất kháng nguyên O của ExPEC không được biểu hiện một cách tự nhiên bằng tế bào chủ theo sáng chế, cụ thể hơn, một số hoặc tất cả của axit nucleic không tương đồng với tế bào chủ. Tế bào chủ có thể được biến đổi để chứa axit nucleic cụ thể, ví dụ, axit nucleic được mô tả trong mục “Axit nucleic và protein”, bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, phương pháp được mô tả trong mục “Tế bào chủ”.

Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ theo sáng chế chứa axit nucleic mà mã hóa glycosyltransferaza có khả năng sản xuất kháng nguyên O của *E.coli* có kiểu huyết thanh O25B, cụ thể hơn, kháng nguyên O25B theo sáng chế. Theo một phương án cụ thể, axit nucleic này mã hóa cụm *rfb* từ upec138 (SEQ ID NO:12), hoặc cụm gen mà khoảng hoặc ít nhất 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% giống hoặc tương đồng với SEQ ID NO:12.

Theo một phương án cụ thể khác, axit nucleic này mã hóa cụm *rfb* từ upec163, hoặc cụm gen mà khoảng hoặc ít nhất 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% giống hoặc tương đồng với cụm *rfb* từ upec163. Theo một

phương án cụ thể khác, axit nucleic này mã hóa cụm *rfb* từ upec177, hoặc cụm gen mà khoảng hoặc ít nhất 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% giống hoặc tương đồng với cụm *rfb* từ upec177.

Theo một phương án cụ thể khác, axit nucleic này mã hóa glycosyltransferaza có khả năng sản xuất kháng nguyên O của *E.coli* có kiểu huyết thanh O25B là gen có kiểu huyết thanh O25B, trong đó gen này là *rmlB* (SEQ ID NO:1), *rmlD* (SEQ ID NO:2) *rmlA* (SEQ ID NO:3), *rmlC* (SEQ ID NO:4), *wzx* (SEQ ID NO:5), *wekA* (SEQ ID NO:6), *wekB* (SEQ ID NO:7), *wzy* (SEQ ID NO:8), *wbbJ* (SEQ ID NO:9), *wbbK* (SEQ ID NO:10), và *wbbL* (SEQ ID NO:11). Xem các bảng 3 và 9.

Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ theo sáng chế chứa axit nucleic mà mã hóa protein (ví dụ, glycosyltransferaza) có khả năng sản xuất kháng nguyên O của *E.coli* có kiểu huyết thanh O25A, cụ thể hơn, kháng nguyên O25A theo sáng chế. Theo một phương án cụ thể khác, axit nucleic này mã hóa protein (ví dụ, glycosyltransferaza) có khả năng sản xuất kháng nguyên O của *E.coli* có kiểu huyết thanh O25A là gen của kiểu huyết thanh O25, trong đó gen này là *rmlB*, *rmlD*, *rmlA*, *rmlC*, *wzx*, *wekA*, *wekB*, *wekC*, *wzy*, *fnlA*, *fnlB*, *fnlC*, *wbuB*, và/hoặc *wbuC*. Xem Wang, et al. (2010) J Clin Microbiol 48, 2066-2074; Ngân hàng dữ liệu gen GU014554; và bảng 2.

Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ theo sáng chế chứa axit nucleic mà mã hóa glycosyltransferaza có khả năng sản xuất kháng nguyên O của *E.coli* có kiểu huyết thanh O2. Theo một phương án cụ thể khác, axit nucleic này mã hóa glycosyltransferaza có khả năng sản xuất kháng nguyên O của *E.coli* có kiểu huyết thanh O2 là gen có kiểu huyết thanh O2, trong đó gen này là *rmlB*, *rmlD*, *rmlA*, *rmlC*, *wzx*, *wekP*, *wekQ*, *wekR*, *wzy*, *fdtA*, *fdtB*, và/hoặc *fdtC*. Xem Li, et al., (2010) J Microbiol Methods 82, 71-77; Fratamico, et al., 2010, Canadian Journal of Microbiology 56, 308-316; và bảng 5.

Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ theo sáng chế chứa axit nucleic mà mã hóa glycosyltransferaza có khả năng sản xuất kháng nguyên O của *E.coli* có kiểu huyết thanh O6. Xem Welch et al., 2002, PNAS USA 99(26):17020-17024; Jann et al., Carbohydr. Res. 263 (1994) 217-225, và Jansson et al., Carbohydr. Res.

131 (1984) 277-283. Theo một phương án cụ thể, kiểu huyết thanh O6 này chứa monosacarit Glc phân nhánh.

Theo một phương án cụ thể khác, tế bào chủ theo sáng chế chứa axit nucleic mà mã hóa glycosyltransferaza có khả năng sản xuất kháng nguyên O của *E.coli* có kiểu huyết thanh O1. Theo một phương án cụ thể, kiểu huyết thanh O1 này là O1A. Theo một phương án cụ thể khác, axit nucleic này mà mã hóa glycosyltransferaza có khả năng sản xuất kháng nguyên O của *E.coli* có kiểu huyết thanh O1 là gen có kiểu huyết thanh O1, trong đó gen này là *rmlB*, *rmlD*, *rmlA*, *rmlC*, *wzx*, *mnaA*, *wekM*, *wzy*, *wekN*, và/hoặc *wekO*.

Oligosacaryl Transferaza

Oligosacaryl transferaza chuyển oligosacarit được liên kết với lipit đến gốc asparagin của chuỗi polypeptit mới sinh mà chứa motif (đoạn trình tự nucleotit hoặc axit amin) điều hòa quá trình N-glycoxyl hóa, ví dụ, Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15) (xem, WO 2006/119987). Xem, ví dụ, WO 2003/074687 và WO 2006/119987, mà toàn bộ nội dung của chúng được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một số phương án, tế bào chủ theo sáng chế chứa axit nucleic mà mã hóa oligosacaryl transferaza. Axit nucleic mà mã hóa oligosacaryl transferaza có thể là tự nhiên đối với tế bào chủ, hoặc có thể được đưa vào trong tế bào chủ bằng cách sử dụng kỹ thuật gen, như được mô tả trên đây. Oligosacaryl transferaza có thể từ nguồn bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một phương án cụ thể, oligosacaryl transferaza là oligosacaryl transferaza từ *Campylobacter*. Theo một phương án cụ thể khác, oligosacaryl transferaza là oligosacaryl transferaza từ *Campylobacter jejuni* (cụ thể hơn, *pglB*; xem, ví dụ, Wacker et al., 2002, Science 298:1790-1793; ngoài ra, xem, ví dụ, NCBI Gen ID: 3231775, UniProt Accession No. O86154). Theo một phương án cụ thể khác, oligosacaryl transferaza là oligosacaryl transferaza từ *Campylobacter lari* (xem, ví dụ, NCBI Gen ID: 7410986).

Phức hợp sinh học

Theo một số phương án, tế bào chủ theo sáng chế có thể được sử dụng để tạo ra phức hợp sinh học chứa kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (ví dụ, O25B; xem mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”) được liên kết với protein mang. Phương pháp tạo ra phức hợp sinh học này bằng cách sử dụng tế bào chủ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, WO 2003/074687 và WO 2006/119987.

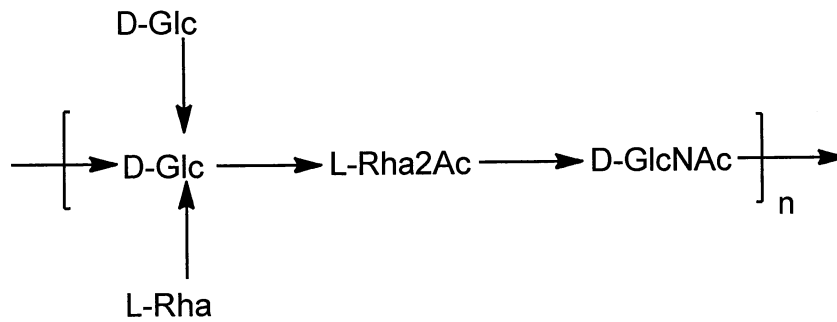
Theo một phương án khác, phức hợp glyco có thể được tạo ra bằng quá trình tổng hợp hóa học, cụ thể hơn, được tạo ra bên ngoài của tế bào chủ (in vitro). Ví dụ, kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế, ví dụ, O25B, có thể được tạo phức hợp với protein mang bằng cách sử dụng phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm, bằng cách sử dụng nhóm hoạt hóa dễ phản ứng trong polysacarit/oligosacarit cũng như chất mang protein. Xem, ví dụ, Pawlowski et al., 2000, Vaccine 18:1873-1885; và Robbins, et al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106:7974-7978), mà nội dung của nó được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Kỹ thuật này bao gồm kỹ thuật chiết polysacarit/oligosacarit của kháng nguyên từ tế bào chủ, tinh chế polysacarit/oligosacarit, hoạt hóa polysacarit/oligosacarit bằng hóa chất, và tạo phức polysacarit/ oligosacarit với protein mang.

Phức hợp sinh học, như theo sáng chế, có các đặc tính thuận lợi hơn phức hợp glyco, ví dụ, phức hợp sinh học này tiêu tốn ít hóa chất hơn trong quá trình sản xuất và tạo ra sản phẩm cuối ổn định hơn. Do đó, phức hợp sinh học được ưu tiên hơn so với phức hợp glyco được tạo ra theo phương pháp hóa học.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến phức hợp sinh học chứa protein mang được liên kết với kháng nguyên O của ExPEC theo sáng chế. Xem mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”.

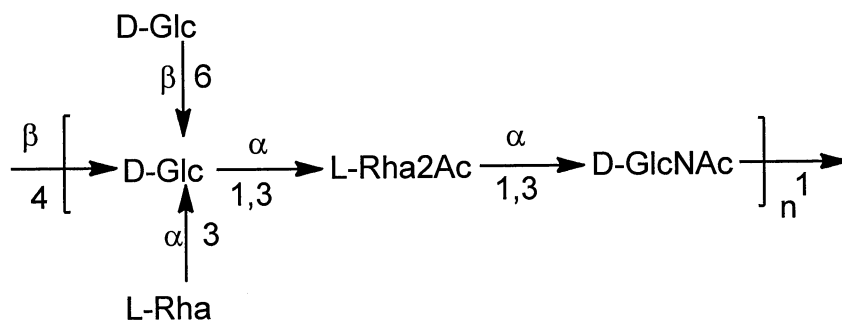
Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến phức hợp sinh học chứa protein mang (ví dụ, EPA) được tạo liên kết thông qua nguyên tử N với O25B của *E. coli*.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến phức hợp sinh học chứa protein mang (ví dụ, EPA) được liên kết với hợp chất có công thức O25B như được thể hiện dưới đây:



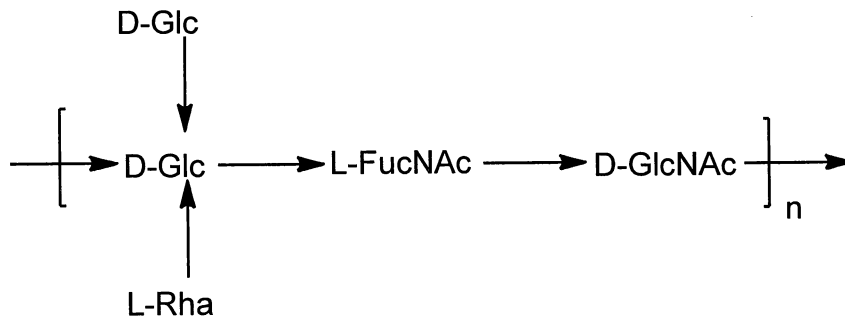
trong đó n là số nguyên có giá trị nằm trong khoảng từ 1 đến 30, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 5, 10 đến 30, 15 đến 30, 20 đến 30, 25 đến 30, 5 đến 25, 10 đến 25, 15 đến 25, 20 đến 25, 10 đến 20, hoặc 15 đến 20. Theo một phương án cụ thể, protein mang được tạo liên kết thông qua nguyên tử N với kháng nguyên O có công thức O25B, cụ thể hơn, O25B được liên kết với gốc Asn của protein mang chứa trình tự Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); hoặc protein mang chứa trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15).

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến phức hợp sinh học chứa protein mang (ví dụ, EPA) được liên kết với hợp chất có công thức O25B', như được thể hiện dưới đây:

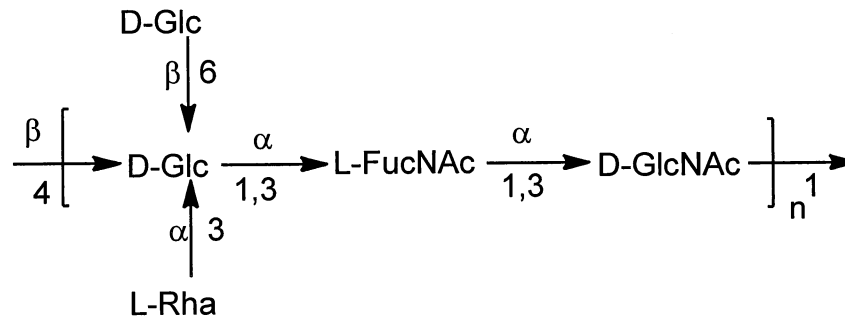


trong đó n là số nguyên có giá trị nằm trong khoảng từ 1 đến 30, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 5, 10 đến 30, 15 đến 30, 20 đến 30, 25 đến 30, 5 đến 25, 10 đến 25, 15 đến 25, 20 đến 25, 10 đến 20, hoặc 15 đến 20. Theo một phương án cụ thể, protein mang được tạo liên kết thông qua nguyên tử N với kháng nguyên O có công thức O25B'.

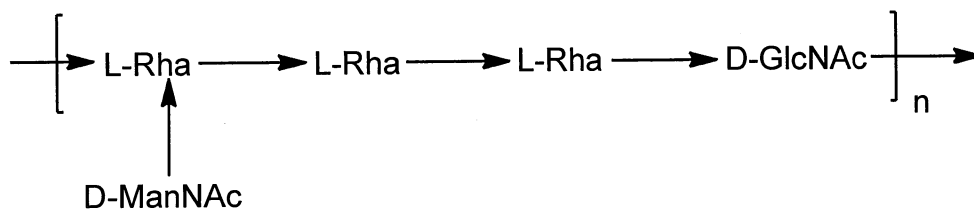
Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến phức hợp sinh học chứa protein mang (ví dụ, EPA) được liên kết với kháng nguyên O25A. Theo một phương án cụ thể, kháng nguyên O25A này có công thức O25A:



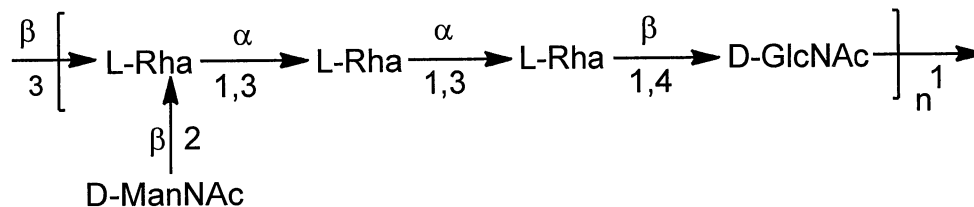
hoặc O25A':



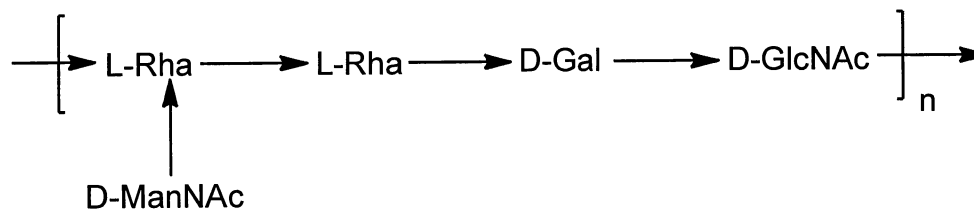
Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến phức hợp sinh học chứa protein mang (ví dụ, EPA) được liên kết với kháng nguyên O1. Theo một phương án cụ thể, kháng nguyên O1 này là O1A, ví dụ, kháng nguyên này có công thức O1A:



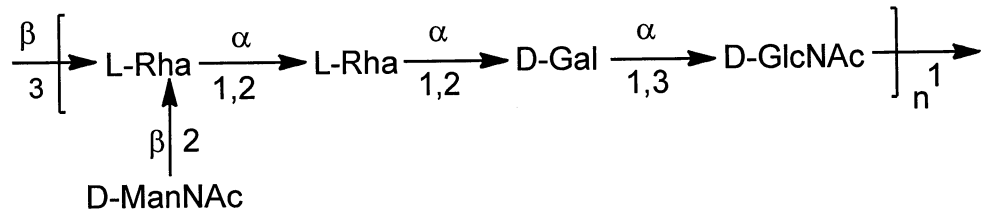
hoặc O1A':



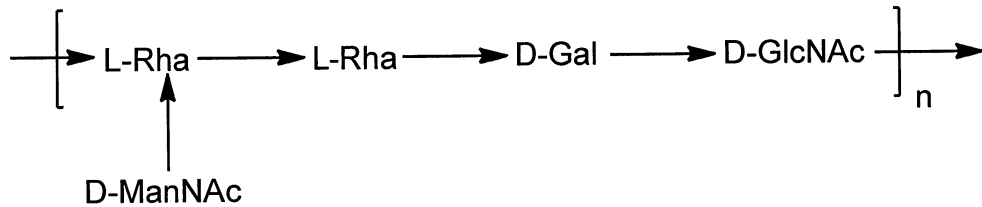
Theo một phương án cụ thể khác, kháng nguyên O1 này là O1B, ví dụ, kháng nguyên này có công thức O1B:



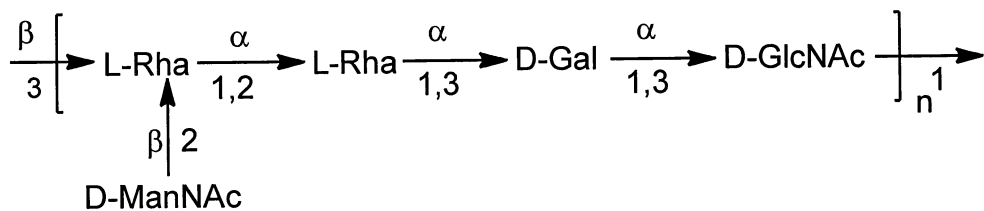
hoặc O1B':



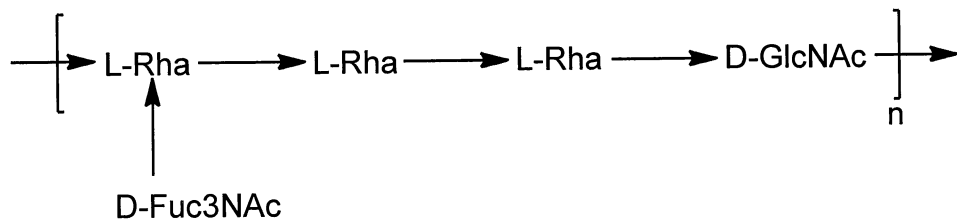
Theo một phương án cụ thể khác, kháng nguyên O1 này là O1C, ví dụ, kháng nguyên này có công thức O1C:



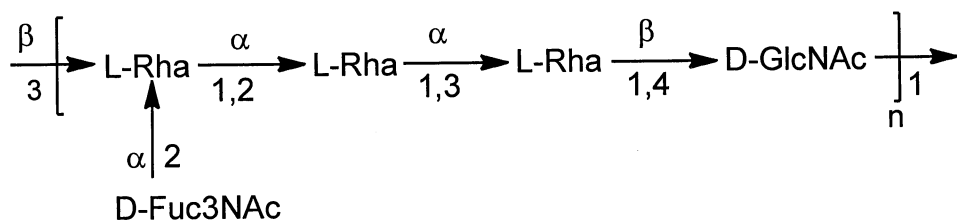
hoặc O1C':



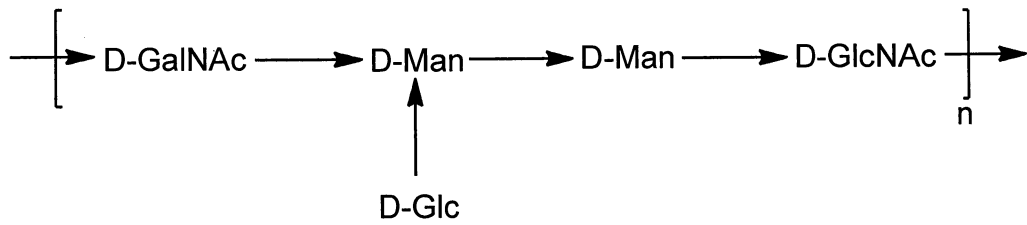
Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến phức hợp sinh học chứa protein mang (ví dụ, EPA) được liên kết với kháng nguyên O2. Theo một phương án cụ thể, kháng nguyên O2 này có công thức O2:



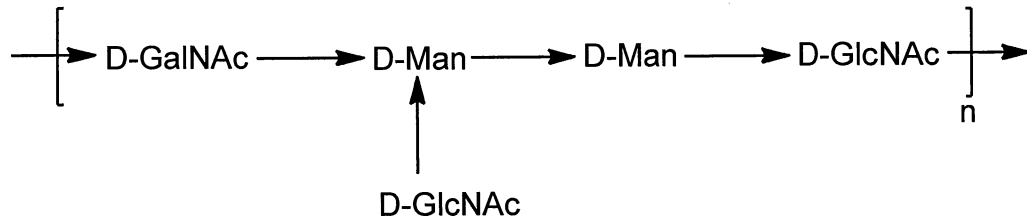
hoặc O2':



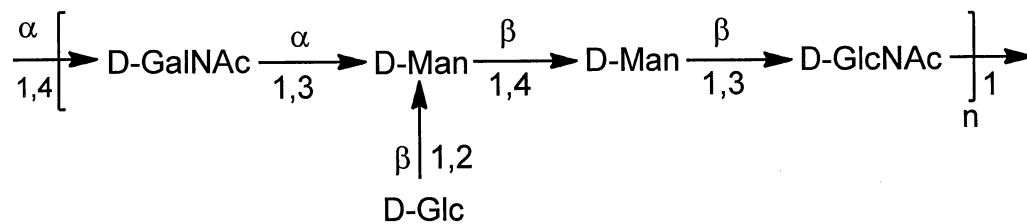
Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến phức hợp sinh học chứa protein mang (ví dụ, EPA) được liên kết với kháng nguyên O6. Theo một phương án cụ thể, kháng nguyên O6 này có công thức O6Glc:



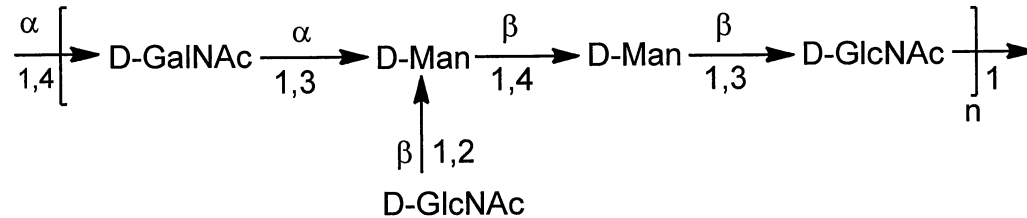
hoặc O6GlcNAc:



hoặc O6Glc':



hoặc O6GlcNAc':



Phức hợp sinh học theo sáng chế có thể được tinh chế bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này dùng cho việc tinh chế protein, ví dụ, bằng sắc ký (ví dụ, sắc ký trao đổi ion, trao đổi anion, ái lực, và sắc ký cột theo cỡ), ly tâm, sự khác nhau về độ tan, hoặc bằng kỹ thuật chuẩn bất kỳ khác dùng cho việc tinh chế protein. Xem, ví dụ, Saraswat et al., 2013, Biomed. Res. Int. ID#312709 (p. 1-18); xem, ngoài ra, phương pháp được mô tả trong WO 2009/104074. Ngoài ra, phức hợp sinh học có thể được dung hợp với trình tự polypeptit không tương đồng theo sáng chế hoặc theo cách khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để tạo thuận lợi cho việc tinh chế. Điều kiện cụ thể được sử dụng để tinh chế phức hợp sinh học cụ thể sẽ phụ thuộc, một phần, vào phương pháp tổng hợp (ví dụ, quá trình sản xuất tổng hợp so với quá trình sản xuất tái tổ hợp) và vào các yếu tố khác như điện tích toàn phần, tính kỵ nước, và/hoặc tính ưa nước của phức hợp sinh học, và

sẽ dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Kháng thể chống lại O25B

Kháng nguyên O25B theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”) và/hoặc phức hợp sinh học chứa kháng nguyên O25B theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”) có thể được sử dụng để tạo ra việc trung hòa kháng thể chống lại ExPEC. Theo một phương án cụ thể, kháng nguyên O25B theo sáng chế và/hoặc phức hợp sinh học chứa kháng nguyên O25B theo sáng chế có thể được sử dụng cho đối tượng (ví dụ, người, chuột nhắt, thỏ, chuột, chuột lang, v.v.) để tạo ra đáp ứng miễn dịch mà bao gồm sự sản xuất kháng thể. Kháng thể này có thể được phân lập bằng cách sử dụng kỹ thuật đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, sắc ký ái lực miễn dịch, ly tâm, kết tủa, v.v.).

Ngoài ra, kháng nguyên O25B theo sáng chế có thể được sử dụng để sàng lọc kháng thể từ thư viện kháng thể. Ví dụ, O25B được phân lập có thể được làm bất động đối với chất mang rắn (ví dụ, silica gel, nhựa, màng chất dẻo được biến đổi, hạt thủy tinh, cotton, hạt nhựa, hạt polystyren, gel nhôm oxit, hoặc polysaccharit, hạt từ tính), và được sàng lọc để gắn kết với kháng thể. Theo phương án khác, kháng thể cần được sàng lọc có thể được làm bất động đối với chất mang rắn và được sàng lọc để gắn kết với O25B. Thử nghiệm sàng lọc bất kỳ, như thử nghiệm quét, ELISA, công hưởng plasmon bề mặt, hoặc thử nghiệm sàng lọc kháng thể khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để sàng lọc kháng thể mà gắn kết với O25B. Thư viện kháng thể được sàng lọc có thể là thư viện kháng thể có bán trên thị trường, thư viện được tạo ra in vitro, hoặc thư viện thu được bằng cách xác định và tạo dòng hoặc phân lập kháng thể từ cá thể nhiễm EXPEC. Thư viện kháng thể có thể được tạo ra theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo phương án cụ thể, thư viện kháng thể được tạo ra bằng cách tạo dòng kháng thể và bằng cách sử dụng chúng trong thư viện hiển thị thể thực khuẩn hoặc thư viện hiển thị phagemit (một loại vector plasmid có mang các đoạn trình tự của thể thực khuẩn).

Kháng thể được xác định hoặc được tạo ra bằng cách sử dụng O25B và/hoặc phức hợp sinh học của O25B có thể bao gồm phân tử globulin miễn dịch và các

phần hoạt tính miễn dịch của phân tử globulin miễn dịch, cụ thể hơn, phân tử mà chứa vị trí gắn kết với kháng nguyên mà gắn kết đặc hiệu với O25B. Phân tử globulin miễn dịch có thể có kiểu bất kỳ (ví dụ, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA và IgY), nhóm (ví dụ, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ và IgA₂) hoặc tiểu nhóm của phân tử globulin miễn dịch. Kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa đặc hiệu, kháng thể người, kháng thể được làm giống kháng thể người, kháng thể khảm, Fvs đơn chuỗi (scFv), kháng thể đơn chuỗi, mảnh Fab, mảnh F(ab'), Fvs có cầu disulfua (sdFv), và kháng thể kháng idiotyp (kháng Id) (bao gồm, ví dụ, kháng thể kháng Id đối với kháng thể được tạo ra hoặc được xác định bằng cách sử dụng phương pháp theo sáng chế), và mảnh liên kết với epitop của kháng thể bất kỳ trên đây. Theo một phương án cụ thể, kháng thể được tạo ra hoặc được xác định bằng cách sử dụng O25B và/hoặc phức hợp sinh học của O25B ở người hoặc kháng thể đơn dòng được làm giống kháng thể người.

Kháng thể được tạo ra hoặc được xác định bằng cách sử dụng O25B và/hoặc phức hợp sinh học của O25B có thể được sử dụng để quan sát hiệu quả của phép trị liệu và/hoặc sự tiến triển của bệnh. Hệ thống thử nghiệm miễn dịch bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng cho mục đích này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hệ thống thử nghiệm cạnh tranh và không cạnh tranh bằng cách sử dụng kỹ thuật như miễn dịch phóng xạ, ELISA (thử nghiệm miễn dịch gắn enzym), thử nghiệm miễn dịch đặc hiệu “sandwich”, phản ứng precipitin, phản ứng precipitin khuếch tán gel, thử nghiệm miễn dịch khuếch tán, thử nghiệm định lượng miễn dịch phóng xạ, thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang, thử nghiệm miễn dịch protein A và thử nghiệm điện di miễn dịch.

Kháng thể được tạo ra hoặc được xác định bằng cách sử dụng O25B và/hoặc phức hợp sinh học của O25B có thể được sử dụng để phát hiện chủng O25B của *E. coli*, ví dụ, từ các chủng của *E. coli* và/hoặc để chẩn đoán sự nhiễm trùng bởi chủng O25B của *E. coli*.

Chế phẩm

Chế phẩm chứa tế bào chủ

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa tế bào chủ theo sáng chế. Chế phẩm này có thể được sử dụng trong phương pháp tạo ra phức hợp

sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), ví dụ, hỗn hợp thành phần chế phẩm có thể được nuôi cấy dưới các điều kiện thích hợp để sản xuất protein. Sau đó, phức hợp sinh học có thể được phân lập từ hỗn hợp thành phần này bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Chế phẩm chứa tế bào chủ theo sáng chế có thể chứa các thành phần thích hợp khác để duy trì và làm sống sót tế bào chủ theo sáng chế, và có thể còn chứa các thành phần khác cần thiết hoặc có lợi để sản xuất protein bằng tế bào chủ, ví dụ, chất cảm ứng cho trình tự khởi đầu cảm ứng, như arabinosa, IPTG.

Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm (ví dụ, chế phẩm được dụng, hay còn gọi là dược phẩm) chứa một hoặc nhiều kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”) và chế phẩm (ví dụ, dược phẩm) chứa một hoặc nhiều phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”). Theo một phương án cụ thể, chế phẩm theo sáng chế chứa một hoặc nhiều kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”). Theo một phương án cụ thể khác, chế phẩm theo sáng chế chứa một hoặc nhiều phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”). Theo một phương án cụ thể khác, chế phẩm theo sáng chế chứa một hoặc nhiều kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”) và một hoặc nhiều phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”). Chế phẩm theo sáng chế hữu dụng trong việc điều trị và ngăn ngừa sự nhiễm trùng cho đối tượng cần điều trị (ví dụ, người) với *E.coli* gây bệnh ngoài đường ruột (ExPEC). Xem mục “Trị liệu kết hợp” dưới đây.

Theo một số phương án, ngoài kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”) và/hoặc phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), chế phẩm (ví dụ, dược phẩm) theo sáng chế chứa chất mang dược dụng. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “dược dụng” nghĩa là được phê chuẩn bởi Cơ quan điều hành của Chính phủ hoặc Chính phủ liên bang hoặc được liệt kê trong Dược điển Mỹ hoặc dược điển thông dụng khác để sử dụng cho động vật, và cụ thể hơn cho người. Thuật ngữ “chất mang” trong bản mô tả này liên quan đến chất mang dược dụng, được dùng để chỉ chất pha loãng, chất phụ trợ,

tá được, hoặc chất dẫn thuốc được sử dụng trong chế phẩm. Ngoài ra, dung dịch nước muối và dung dịch glyxerol và dextroza chứa nước có thể được sử dụng làm chất mang lỏng, đặc biệt trong dung dịch tiêm. Tá dược thích hợp bao gồm tinh bột, glucoza, lactoza, sucroza, gelatin, mạch nha, gạo, bột mỳ, đá phấn, silica gel, natri stearat, glyxerol monostearat, đá talc, natri clorua, sữa khô được tách chất béo, glyxerol, propylen, glycol, nước, etanol và tá dược tương tự. Ví dụ về thích hợp chất mang được dùng được mô tả trong “Remington's Pharmaceutical Sciences” bởi E.W. Martin.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa protein mang (ví dụ, protein mang được mô tả trong mục “Protein mang”) được liên kết với kháng nguyên theo sáng chế, ví dụ, kháng nguyên O của ExPEC được mô tả trong mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”.

Theo một phương án cụ thể khác, chế phẩm theo sáng chế chứa protein mang (ví dụ, protein mang được mô tả trong mục “Protein mang”, ví dụ, EPA hoặc MBP) được liên kết với O25B của *E.coli* (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”).

Theo một phương án cụ thể khác, chế phẩm theo sáng chế chứa protein mang (ví dụ, protein mang được mô tả trong mục “Protein mang”, ví dụ, EPA hoặc MBP) được liên kết với O25A của *E.coli* (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”).

Theo một phương án cụ thể khác, chế phẩm theo sáng chế chứa protein mang (ví dụ, protein mang được mô tả trong mục “Protein mang”, ví dụ, EPA hoặc MBP) được liên kết với O1 của *E.coli* (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”). Theo một phương án cụ thể khác, đại phân tử O1 này là O1A. Theo một phương án cụ thể khác, đại phân tử O1 này là O1B. Theo một phương án cụ thể khác, đại phân tử O1 này là O1C.

Theo một phương án cụ thể khác, chế phẩm theo sáng chế chứa protein mang (ví dụ, protein mang được mô tả trong mục “Protein mang”, ví dụ, EPA hoặc MBP) được liên kết với O2 của *E.coli* (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”).

Theo một phương án cụ thể khác, chế phẩm theo sáng chế chứa protein mang (ví dụ, protein mang được mô tả trong mục “Protein mang”, ví dụ, EPA hoặc

MBP) được liên kết với O6 của *E.coli* (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”). Theo một phương án cụ thể, đại phân tử O6 này là đại phân tử O6 chứa monosacarit Glc phân nhánh.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ, được phẩm, chứa (i) đại phân tử O25 (ví dụ, O25A hoặc O25B), hoặc phức hợp sinh học chứa O25 (ví dụ, O25A hoặc O25B) và (ii) đại phân tử O1 hoặc phức hợp sinh học chứa O1. Xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”. Theo một phương án cụ thể, đại phân tử O25 này là đại phân tử O25B. Theo một phương án cụ thể khác, đại phân tử O1 này là O1A. Theo một phương án cụ thể khác, đại phân tử O1 này là O1B. Theo một phương án cụ thể khác, đại phân tử O1 này là O1C.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ, được phẩm, chứa (i) đại phân tử O25 (ví dụ, O25A hoặc O25B), hoặc phức hợp sinh học chứa O25 (ví dụ, O25A hoặc O25B) và (ii) đại phân tử O2 hoặc phức hợp sinh học chứa O2. Xem mục “Kháng nguyên O của *E. coli*” và “Phức hợp sinh học”. Theo một phương án cụ thể, đại phân tử O25 này là đại phân tử O25B.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ, được phẩm, chứa (i) đại phân tử O25 (ví dụ, O25A hoặc O25B), hoặc phức hợp sinh học chứa O25 (ví dụ, O25A hoặc O25B) và (ii) đại phân tử O6 (ví dụ, đại phân tử O6 chứa monosacarit Glc phân nhánh hoặc monosacarit GlcNAc phân nhánh) hoặc phức hợp sinh học chứa O6. Xem mục “Kháng nguyên O của *E. coli*” và “Phức hợp sinh học”. Theo một phương án cụ thể, đại phân tử O25 này là đại phân tử O25B. Theo một phương án cụ thể khác, đại phân tử O6 này là đại phân tử O6 chứa monosacarit Glc phân nhánh.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ, được phẩm, chứa O25B của *E.coli* (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”) hoặc phức hợp sinh học chứa O25 (xem, mục “Phức hợp sinh học”) và ít nhất một trong các thành phần sau đây: (i) O1 của *E.coli* hoặc phức hợp sinh học chứa O1 (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*” và “Phức hợp sinh học”); (ii) O2 của *E.coli* hoặc phức hợp sinh học chứa O2 (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*” và “Phức hợp sinh học”); và/hoặc (iii) O6 của *E.coli* hoặc phức hợp sinh học chứa O6 (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*” và “Phức hợp sinh học”). Theo một phương án

cụ thể khác, O1 này là O1A. Theo một phương án cụ thể khác, O1 này là O1B. Theo một phương án cụ thể khác, O1 này là O1C. Theo một phương án cụ thể khác, O6 này là O6 chứa monosacarit Glc phân nhánh.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ, được phẩm, chứa ít nhất hai trong số các thành phần sau: (i) đại phân tử O25 (ví dụ, O25A hoặc O25B) hoặc phức hợp sinh học chứa O25 (ví dụ, O25A hoặc O25B); (ii) đại phân tử O1 hoặc phức hợp sinh học chứa O1; (iii) đại phân tử O2 hoặc phức hợp sinh học chứa O2; và/hoặc (iv) đại phân tử O6 (ví dụ, đại phân tử O6 chứa monosacarit Glc phân nhánh hoặc monosacarit GlcNAc phân nhánh) hoặc phức hợp sinh học chứa O6. Theo một phương án cụ thể, đại phân tử O25 này là đại phân tử O25B. Theo một phương án cụ thể khác, đại phân tử O1 này là O1A. Theo một phương án cụ thể khác, đại phân tử O1 này là O1B. Theo một phương án cụ thể khác, đại phân tử O1 này là O1C. Theo một phương án cụ thể khác, đại phân tử O6 này là đại phân tử O6 chứa monosacarit Glc phân nhánh.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ, được phẩm, chứa phức hợp sinh học chứa O25B của *E.coli* và phức hợp sinh học chứa O1A của *E. coli*. Phức hợp sinh học này được mô tả trong mục “Phức hợp sinh học”.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ, được phẩm, chứa phức hợp sinh học chứa O25B của *E.coli* và phức hợp sinh học chứa O1B của *E. coli*. Phức hợp sinh học này được mô tả trong mục “Phức hợp sinh học”.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ, được phẩm, chứa phức hợp sinh học chứa O25B của *E.coli* và phức hợp sinh học chứa O1C của *E. coli*. Phức hợp sinh học này được mô tả trong mục “Phức hợp sinh học”.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ, được phẩm, chứa phức hợp sinh học chứa O25B của *E.coli* và phức hợp sinh học chứa O2 của *E. coli*. Phức hợp sinh học này được mô tả trong mục “Phức hợp sinh học”.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ, được phẩm, chứa phức hợp sinh học chứa O25B của *E.coli* và phức hợp sinh học chứa O6 của *E. coli*. Phức hợp sinh học này được mô tả trong mục “Phức hợp sinh học”.

Theo một phương án cụ thể khác, chế phẩm theo sáng chế chứa protein mang (ví dụ, protein mang được mô tả trong mục “Protein mang”, ví dụ, EPA hoặc MBP) được liên kết với O25B của *E.coli* (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), (ii) protein mang (ví dụ, protein mang được mô tả trong mục “Protein mang”, ví dụ, EPA hoặc MBP) được liên kết với kháng nguyên O của *E.coli* có kiểu huyết thanh O1, ví dụ, O1A (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), (iii) protein mang (ví dụ, protein mang được mô tả trong mục “Axit nucleic và protein”, ví dụ, EPA hoặc MBP) được liên kết với kháng nguyên O của *E.coli* có kiểu huyết thanh O2 (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), và (iv) protein mang (ví dụ, protein mang được mô tả trong mục “Protein mang”, ví dụ, EPA hoặc MBP) được liên kết với kháng nguyên O của *E.coli* có kiểu huyết thanh O6 (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”).

Theo một số phương án, chế phẩm trên đây chứa protein mang (ví dụ, protein mang được mô tả trong mục “Protein mang”, ví dụ, EPA hoặc MBP) được liên kết với kháng nguyên O của *E.coli* có kiểu huyết thanh của *E.coli* khác so với O1, O2, O6, hoặc O25. Các kiểu huyết thanh khác của *E.coli* hữu dụng được mô tả, ví dụ, trong ví dụ 1 và bảng 1 dưới đây.

Theo một phương án cụ thể khác, chế phẩm theo sáng chế chứa đại phân tử O25 (ví dụ, O25A hoặc O25B).

Theo một phương án cụ thể khác, chế phẩm theo sáng chế chứa đại phân tử O1 (ví dụ, O1A, O1B, hoặc O1C).

Theo một phương án cụ thể khác, chế phẩm theo sáng chế chứa đại phân tử O2.

Theo một phương án cụ thể khác, chế phẩm theo sáng chế chứa đại phân tử O6 (ví dụ, đại phân tử O6 chứa monosacarit Glc phân nhánh hoặc monosacarit GlcNAc phân nhánh).

Theo một phương án cụ thể khác, chế phẩm theo sáng chế chứa đại phân tử O25 (ví dụ, O25A hoặc O25B), đại phân tử O1, đại phân tử O2, và đại phân tử O6

(ví dụ, đại phân tử O6 chứa monosacarit Glc phân nhánh hoặc monosacarit GlcNAc phân nhánh). Theo một phương án cụ thể, đại phân tử O25 này là đại phân tử O25B. Theo một phương án cụ thể khác, đại phân tử O1 này là O1A. Theo một phương án cụ thể khác, đại phân tử O6 này là đại phân tử O6 chứa monosacarit Glc phân nhánh.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng để tạo ra đáp ứng miễn dịch trong vật chủ mà được cho sử dụng chế phẩm này, cụ thể hơn, chế phẩm gây miễn dịch. Do đó, chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng làm vacxin chống lại sự nhiễm trùng ExPEC, hoặc có thể được sử dụng trong việc điều trị nhiễm trùng ExPEC, và có thể được bào chế thành dược phẩm. Xem mục “Trị liệu kết hợp” dưới đây.

Chế phẩm chứa phức hợp sinh học và/hoặc đại phân tử theo sáng chế có thể chứa các thành phần bất kỳ thích hợp khác để sử dụng trong việc điều trị. Theo các phương án cụ thể, chế phẩm theo sáng chế là chế phẩm đơn chủng. Theo các phương án khác, chế phẩm theo sáng chế là chế phẩm đa chủng, ví dụ, chế phẩm hai chủng, ba chủng, và bốn chủng. Ví dụ, chế phẩm đa chủng chứa nhiều hơn một phức hợp sinh học hoặc kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế. Xem mục “Kháng nguyên O của *E. coli*” và “Phức hợp sinh học” lần lượt liên quan đến kháng nguyên O của *E.coli* và phức hợp sinh học. Theo một phương án cụ thể, chế phẩm theo sáng chế là chế phẩm bốn chủng chứa đại phân tử hoặc phức hợp sinh học, trong đó các chủng này là từ kháng nguyên O của *E.coli* có các kiểu huyết thanh/ kiểu huyết thanh phụ O1A, O6, và O2.

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế còn chứa chất bảo quản, ví dụ, dẫn xuất cơ thủy ngân thimerosal. Theo một phương án cụ thể, chế phẩm theo sáng chế chứa 0,001% đến 0,01% thimerosal. Theo các phương án khác, chế phẩm theo sáng chế không chứa chất bảo quản.

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế (ví dụ, chế phẩm gây miễn dịch) chứa, hoặc được sử dụng kết hợp với, chất phụ trợ. Chất phụ trợ dùng cho sử dụng kết hợp với chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng trước khi, đồng thời với, hoặc sau khi sử dụng chế phẩm này. Theo một số phương án, thuật ngữ “chất phụ trợ” được dùng để chỉ hợp chất mà khi được sử dụng kết hợp với hoặc ở dạng

thành phần của chế phẩm theo sáng chế sẽ làm tăng, nâng cao và/hoặc cải thiện đáp ứng miễn dịch cho phức hợp sinh học, nhưng khi hợp chất được sử dụng riêng rẽ không tạo ra đáp ứng miễn dịch cho phức hợp sinh học. Theo một số phương án, chất phụ trợ tạo ra đáp ứng miễn dịch đối với peptit của phức hợp sinh học và không tạo ra phản ứng phụ hoặc dị ứng khác. Chất phụ trợ có thể nâng cao đáp ứng miễn dịch bằng một số cơ chế bao gồm, ví dụ, tuyển mộ tế bào lympho, kích thích các tế bào B và/hoặc T, và kích thích đại thực bào.

Ví dụ cụ thể về chất phụ trợ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, muối nhôm (phèn) (như nhôm hydroxit, nhôm phosphat, và nhôm sulfat), 3 De-O-axylat monophosphoryl lipid (MPL) (xem, patent Anh số GB2220211), MF59 (Novartis), AS03 (GlaxoSmithKline), AS04 (GlaxoSmithKline), polysorbat 80 (Tween 80; ICL Americas, Inc.), hợp chất imidazopyridin (xem, đơn quốc tế số PCT/US2007/064857, công bố quốc tế tương ứng số WO2007/109812), hợp chất imidazoquinoxalin (xem, đơn quốc tế số PCT/US2007/064858, công bố quốc tế tương ứng số WO2007/109813) và saponin, như QS21 (xem, Kensil *et al.*, in Vaccine Design: Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); Patent Mỹ số US 5,057,540). Theo một số phương án, chất phụ trợ là chất phụ trợ Freund (đầy đủ hoặc chưa đầy đủ). Chất phụ trợ khác là nhũ tương dầu trong nước (như squalen hoặc dầu lạc), tùy ý kết hợp với chất kích thích miễn dịch, như monophosphoryl lipid (xem, Stoute *et al.*, N. Engl. J. Med. 336, 86-91 (1997)). Chất phụ trợ khác là CpG (Bioworld Today, Nov. 15, 1998).

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế được bào chế để thích hợp với con đường sử dụng để sử dụng cho đối tượng. Ví dụ, chế phẩm theo sáng chế có thể được bào chế để thích hợp cho sử dụng dưới da, ngoài ruột, đường miệng, trong da, áp da, đại trực tràng, trong bụng, và trực tràng. Theo một phương án cụ thể, chế phẩm có thể được bào chế để sử dụng trong tĩnh mạch, đường miệng, trong bụng, trong mũi, trong khí quản, dưới da, trong cơ, cục bộ, trong da, áp da hoặc trong phổi.

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế còn chứa một hoặc nhiều dung dịch đệm, ví dụ, dung dịch đệm phosphat và dung dịch đệm sucroza phosphat

glutamat. Theo các phương án khác, chế phẩm theo sáng chế không chứa dung dịch đệm.

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế còn chứa một hoặc nhiều muối, ví dụ, natri clorua, canxi clorua, natri phosphat, mononatri glutamat, và muối nhôm (ví dụ, nhôm hydroxit, nhôm phosphat, phèn (kali nhôm sulfat), hoặc hỗn hợp của muối nhôm này). Theo các phương án khác, chế phẩm theo sáng chế không chứa muối.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được chứa trong vật chứa, bao gói, hoặc thiết bị phân tán cùng với hướng dẫn sử dụng.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được lưu trữ trước khi sử dụng, ví dụ, chế phẩm có thể được lưu trữ đông lạnh (ví dụ, ở khoảng -20°C hoặc ở khoảng -70°C); được lưu trữ trong điều kiện được làm lạnh (ví dụ, ở khoảng 4°C); hoặc được lưu trữ ở nhiệt độ phòng.

Ứng dụng trong phòng ngừa và điều trị

Sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị và ngăn ngừa sự nhiễm trùng do *E.coli* gây bệnh ngoài đường ruột (ExPEC) cho đối tượng bao gồm bước sử dụng cho đối tượng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”). Theo một phương án cụ thể, chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) được sử dụng để ngăn ngừa sự nhiễm trùng cho đối tượng (ví dụ, người) do ExPEC gây ra, cụ thể hơn, chế phẩm theo sáng chế được sử dụng để tạo ra chủng ngừa cho đối tượng chống lại sự nhiễm trùng ExPEC. Theo một phương án cụ thể khác, chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) được sử dụng trong việc điều trị cho đối tượng mà bị nhiễm trùng do ExPEC gây ra.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp tạo ra đáp ứng miễn dịch cho đối tượng chống lại ExPEC, bao gồm bước sử dụng cho đối tượng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế

(xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”). Theo một phương án, đối tượng này bị nhiễm trùng ExPEC tại thời điểm sử dụng. Theo một phương án khác, đối tượng này không bị nhiễm trùng ExPEC tại thời điểm sử dụng.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp tạo ra sự sản xuất kháng thể thực bào opsonin chống lại ExPEC cho đối tượng, bao gồm bước sử dụng cho đối tượng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”). Theo một phương án, đối tượng này bị nhiễm trùng ExPEC tại thời điểm sử dụng. Theo một phương án khác, đối tượng này không bị nhiễm trùng ExPEC tại thời điểm sử dụng.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp ngăn ngừa sự nhiễm trùng *E.coli* (ví dụ, ExPEC) cho đối tượng, trong đó phương pháp này bao gồm bước sử dụng cho đối tượng cần điều trị lượng hữu hiệu của chế phẩm được mô tả trong mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”. Phương pháp ngăn ngừa sự nhiễm trùng ExPEC cho đối tượng theo sáng chế gây ra đáp ứng miễn dịch cho đối tượng bao gồm bước sử dụng cho đối tượng của chế phẩm được mô tả trong mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu được rằng phương pháp tạo ra đáp ứng miễn dịch cho đối tượng theo sáng chế tạo ra chủng ngừa cho đối tượng chống lại sự nhiễm trùng chủng ExPEC mà kháng nguyên O của nó có trong (các) chế phẩm theo sáng chế.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị sự nhiễm trùng *E.coli* (ví dụ, ExPEC) cho đối tượng, trong đó phương pháp này bao gồm bước sử dụng cho đối tượng cần điều trị lượng hữu hiệu của chế phẩm được mô tả trong mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”.

Theo một số phương án, đáp ứng miễn dịch được tạo ra bằng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) hữu hiệu để ngăn ngừa và/hoặc điều trị sự nhiễm trùng ExPEC gây ra bởi kiểu huyết

thanh, kiểu huyết thanh phụ, hoặc chủng của ExPEC bất kỳ. Theo một số phương án, đáp ứng miễn dịch được tạo ra bằng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) hữu hiệu để ngăn ngừa và/hoặc điều trị sự nhiễm trùng ExPEC nhiều hơn một kiểu huyết thanh của ExPEC.

Theo một phương án cụ thể, đáp ứng miễn dịch được tạo ra bằng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) hữu hiệu để ngăn ngừa và/hoặc điều trị sự nhiễm trùng gây ra bởi *E.coli* có kiểu huyết thanh O25. Theo một phương án cụ thể, kiểu huyết thanh O25 này là O25B. Theo một phương án cụ thể, kiểu huyết thanh O25 này là O25A.

Theo một phương án cụ thể, đáp ứng miễn dịch được tạo ra bằng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) hữu hiệu để ngăn ngừa và/hoặc điều trị sự nhiễm trùng gây ra bởi *E.coli* có kiểu huyết thanh O1. Theo một phương án cụ thể, kiểu huyết thanh O1 này là O1A. Theo một phương án cụ thể khác, kiểu huyết thanh O1 này là O1B. Theo một phương án cụ thể khác, kiểu huyết thanh O1 này là O1C.

Theo một phương án cụ thể, đáp ứng miễn dịch được tạo ra bằng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) hữu hiệu để ngăn ngừa và/hoặc điều trị sự nhiễm trùng gây ra bởi *E.coli* có kiểu huyết thanh O2.

Theo một phương án cụ thể, đáp ứng miễn dịch được tạo ra bằng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”).

học”) hữu hiệu để ngăn ngừa và/hoặc điều trị sự nhiễm trùng gây ra bởi *E.coli* có kiểu huyết thanh O6.

Theo một phương án cụ thể, đáp ứng miễn dịch được tạo ra bằng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) hữu hiệu để ngăn ngừa và/hoặc điều trị sự nhiễm trùng gây ra bởi hai hoặc nhiều hơn các kiểu huyết thanh *E.coli* sau: O25 (ví dụ, O25B và O25A), O1 (ví dụ, O1A, O1B, và O1C), O2, và/hoặc O6.

Theo một phương án cụ thể, đáp ứng miễn dịch được tạo ra bằng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) hữu hiệu để ngăn ngừa và/hoặc điều trị sự nhiễm trùng gây ra bởi mỗi trong số các kiểu huyết thanh *E.coli* sau: O25 (ví dụ, O25B và O25A), O1 (ví dụ, O1A, O1B, và O1C), O2, và O6.

Để điều trị cho đối tượng mắc phải sự nhiễm trùng ExPEC hoặc gây miễn dịch cho đối tượng chống lại sự nhiễm trùng ExPEC, đối tượng này có thể được sử dụng chế phẩm duy nhất theo sáng chế, trong đó chế phẩm này chứa một, hai, ba, bốn, hoặc nhiều hơn các kháng nguyên *E.coli* theo sáng chế. Xem mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”. Theo một phương án khác, để điều trị cho đối tượng mắc phải sự nhiễm trùng ExPEC hoặc gây miễn dịch cho đối tượng chống lại sự nhiễm trùng ExPEC, đối tượng này có thể được sử dụng các phức hợp sinh học theo sáng chế, ví dụ, đối tượng này có thể được sử dụng hai, ba, bốn, hoặc nhiều hơn phức hợp sinh học được mô tả trong mục “Phức hợp sinh học”. Theo một phương án khác, để điều trị cho đối tượng mắc phải sự nhiễm trùng ExPEC hoặc gây miễn dịch cho đối tượng chống lại sự nhiễm trùng ExPEC, đối tượng này có thể được sử dụng các chế phẩm theo sáng chế, ví dụ, đối tượng này có thể được sử dụng hai, ba, bốn, hoặc nhiều hơn các chế phẩm được mô tả trong mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”.

Theo một số phương án, đáp ứng miễn dịch được tạo ra cho đối tượng sau khi sử dụng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) hữu hiệu để làm giảm các triệu chứng gây ra do sự nhiễm trùng ExPEC. Các triệu chứng của sự nhiễm trùng ExPEC có thể thay đổi phụ thuộc vào bản chất của sự nhiễm trùng và có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: chứng khó tiểu tiện, đi tiểu liên miên hoặc muốn đi tiểu, mủ trong nước tiểu, tiểu tiện ra máu, đau lưng, đau khi tiểu tiện, sốt, cảm lạnh, và/hoặc buồn nôn (ví dụ, cho đối tượng bị nhiễm trùng đường niệu do ExPEC); sốt cao, đau đầu, cứng cổ, buồn nôn, nôn, cơn tai biến ngập máu, tình trạng buồn ngủ, và/hoặc mất ngủ với ánh sáng (ví dụ, cho đối tượng bị bệnh viêm màng não do ExPEC gây ra); sốt, tăng nhịp tim, tăng tần số hô hấp, giảm lượng nước tiểu, giảm lượng tiểu cầu, chứng đau bụng, khó thở, và/hoặc chức năng tim bất thường (ví dụ, cho đối tượng mắc phải sự nhiễm trùng ExPEC).

Theo một số phương án, đáp ứng miễn dịch được tạo ra cho đối tượng sau khi sử dụng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) hữu hiệu để làm giảm khả năng phải nhập viện điều trị cho đối tượng mắc phải sự nhiễm trùng ExPEC. Theo một số phương án, đáp ứng miễn dịch được tạo ra cho đối tượng sau khi sử dụng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) hữu hiệu để làm giảm thời gian của việc phải nhập viện điều trị cho đối tượng mắc phải sự nhiễm trùng ExPEC.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp ngăn ngừa và/hoặc điều trị sự nhiễm trùng ExPEC cho đối tượng gây ra bởi *E.coli* có kiểu huyết thanh O25B bằng cách sử dụng kháng thể theo sáng chế, cụ thể hơn, kháng

thể kháng O25B theo sáng chế. Theo phương án cụ thể, kháng thể trung hòa là kháng thể đơn dòng.

Trị liệu kết hợp

Theo một số phương án, kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) được sử dụng cho đối tượng kết hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu khác (ví dụ, chất kháng vi khuẩn hoặc điều hòa miễn dịch). Một hoặc nhiều chất trị liệu khác có thể là có lợi trong việc điều trị hoặc ngăn ngừa sự nhiễm trùng ExPEC hoặc có thể cải thiện triệu chứng hoặc tình trạng bệnh lý do sự nhiễm trùng ExPEC. Theo một số phương án, một hoặc nhiều chất trị liệu khác là chất giảm đau hoặc thuốc chống sốt. Theo một số phương án, chất trị liệu được sử dụng ít hơn 5 phút một cách riêng rẽ, ít hơn 30 phút một cách riêng rẽ, 1 giờ một cách riêng rẽ, ở khoảng 1 giờ một cách riêng rẽ, ở khoảng 1 đến khoảng 2 giờ một cách riêng rẽ, ở khoảng 2 giờ đến khoảng 3 giờ một cách riêng rẽ, ở khoảng 3 giờ đến khoảng 4 giờ một cách riêng rẽ, ở khoảng 4 giờ đến khoảng 5 giờ một cách riêng rẽ, ở khoảng 5 giờ đến khoảng 6 giờ một cách riêng rẽ, ở khoảng 6 giờ đến khoảng 7 giờ một cách riêng rẽ, ở khoảng 7 giờ đến khoảng 8 giờ một cách riêng rẽ, ở khoảng 8 giờ đến khoảng 9 giờ một cách riêng rẽ, ở khoảng 9 giờ đến khoảng 10 giờ một cách riêng rẽ, ở khoảng 10 giờ đến khoảng 11 giờ một cách riêng rẽ, ở khoảng 11 giờ đến khoảng 12 giờ một cách riêng rẽ, ở khoảng 12 giờ đến 18 giờ một cách riêng rẽ, 18 giờ đến 24 giờ một cách riêng rẽ, 24 giờ đến 36 giờ một cách riêng rẽ, 36 giờ đến 48 giờ một cách riêng rẽ, 48 giờ đến 52 giờ một cách riêng rẽ, 52 giờ đến 60 giờ một cách riêng rẽ, 60 giờ đến 72 giờ một cách riêng rẽ, 72 giờ đến 84 giờ một cách riêng rẽ, 84 giờ đến 96 giờ một cách riêng rẽ, hoặc 96 giờ đến 120 giờ một cách riêng rẽ.

Chất kháng vi khuẩn bất kỳ đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng kết hợp với kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”). Ví dụ về chất

kháng vi khuẩn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Amikacin, Amoxicillin, Amoxicillin-axit clavulanic, Amphotericin-B, Ampicillin, Ampicillin-sulbactam, Apramycin, Azithromycin, Aztreonam, Bacitracin, Benzylpenicillin, Caspofungin, Cefaclor, Cefadroxil, Cefalexin, Cefalothin, Cefazolin, Cefdinir, Cefepim, Cefixim, Cefmenoxim, Cefoperazon, Cefoperazon-sulbactam, Cefotaxim, Cefoxitin, Cefpirom, Cefpodoxim, Cefpodoxim-axit clavulanic, Cefpodoxim-sulbactam, Cefprozil, Cefquinom, Ceftazidim, Ceftibutin, Ceftiofur, Ceftobiprol, Ceftriaxon, Cefuroxim, Chloramphenicol, Florfenicol, Ciprofloxacin, Clarithromycin, Clinafloxacin, Clindamycin, Cloxacillin, Colistin, Cotrimoxazol (Trimethoprim/sulphamethoxazol), Dalbavancin, Dalfopristin/Quinopristin, Daptomycin, Dibekacin, Dicloxacillin, Doripenem, Doxycyclin, Enrofloxacin, Ertapenem, Erythromycin, Flucloxacillin, Fluconazol, Flucytosin, Fosfomycin, axit fusidic, Garenoxacin, Gatifloxacin, Gemifloxacin, Gentamicin, Imipenem, Itraconazol, Kanamycin, Ketoconazol, Levofloxacin, Lincomycin, Linezolid, Loracarbef, Mecillinam (Amdinocillin), Meropenem, Metronidazol, Meziocillin, Mezlocillin-sulbactam, Minocyclin, Moxifloxacin, Mupirocin, axit nalidixic, Neomycin, Netilmicin, Nitrofurantoin, Norfloxacin, Ofloxacin, Oxacillin, Pefloxacin, Penicillin V, Piperacillin, Piperacillin-sulbactam, Piperacillin-tazobactam, Rifampicin, Roxithromycin, Sparfloxacin, Spectinomycin, Spiramycin, Streptomycin, Sulbactam, Sulfamethoxazol, Teicoplanin, Telavancin, Telithromycin, Temocillin, Tetracyclin, Ticarcillin, Ticarcillin-axit clavulanic, Tigecyclin, Tobramycin, Trimethoprim, Trovafloxacin, Tylosin, Vancomycin, Virginiamycin, và Voriconazol.

Theo một số phương án, việc trị liệu kết hợp bao gồm sử dụng hai hoặc nhiều hơn kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), và/hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”).

Đối tượng điều trị

Theo một số phương án, kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục

“Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) được sử dụng cho đối tượng, cụ thể hơn, đối tượng mà không bị nhiễm trùng ExPEC hoặc không bị nhiễm trùng ExPEC trước đó. Theo một phương án, kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) được sử dụng cho đối tượng mà có nguy cơ bị nhiễm trùng ExPEC.

Theo một số phương án, kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) được sử dụng cho đối tượng người bị chẩn đoán mắc phải sự nhiễm trùng ExPEC. Theo một số phương án, kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) được sử dụng để đối tượng bị nhiễm trùng bởi ExPEC trước khi các triệu chứng bộc phát hoặc các triệu chứng trở nên trầm trọng (ví dụ, trước khi bệnh nhân cần phải nhập viện để điều trị).

Theo một số phương án, kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) được sử dụng cho đối tượng người bị chẩn đoán nhiễm trùng UPEC. Theo một số phương án, kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) được sử dụng cho đối tượng tái phát nhiễm trùng đường tiết niệu. Theo một số phương án, kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) được sử dụng cho đối tượng tái phát nhiễm trùng đường tiết niệu.

học”) được sử dụng cho đối tượng tái phát nhiễm trùng đường tiết niệu, nhưng khỏe mạnh tại thời điểm điều trị. Theo một số phương án, kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) được sử dụng cho đối tượng có hoặc có nguy cơ mắc phải sự nhiễm trùng huyết hoặc sự nhiễm trùng.

Theo một số phương án, đối tượng cần được sử dụng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) là động vật. Theo một số phương án, động vật là chim. Theo một số phương án, động vật là chó. Theo một số phương án, động vật là mèo. Theo một số phương án, động vật là ngựa. Theo một số phương án, động vật là bò cái. Theo một số phương án, động vật là động vật có vú, ví dụ, ngựa, lợn, chuột nhắt, hoặc động vật linh trưởng. Theo một phương án cụ thể, đối tượng là người.

Theo một số phương án, đối tượng cần được sử dụng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) là người trưởng thành. Theo một số phương án, đối tượng cần được sử dụng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) là người trưởng thành nhiều hơn 50 tuổi. Theo một số phương án, đối tượng cần được sử dụng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) là người già.

Theo một số phương án, đối tượng cần được sử dụng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học

theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) là trẻ em. Theo một số phương án, đối tượng cần được sử dụng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) là trẻ sơ sinh. Theo một số phương án, đối tượng cần được sử dụng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) là trẻ sơ sinh chưa trưởng thành. Theo một số phương án, đối tượng cần được sử dụng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) là trẻ mới biết đi. Theo một số phương án, đối tượng cần được sử dụng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) không phải là trẻ sơ sinh ít hơn 6 tháng tuổi.

Theo một số phương án, đối tượng cần được sử dụng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) là cá thể người có thai. Theo một số phương án, đối tượng cần được sử dụng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) là phụ nữ người sinh sớm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, hoặc 8 tuần.

Theo một số phương án, đối tượng cần được sử dụng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế

(xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) là cá thể có nguy cơ cao mắc phải ExPEC (ví dụ, cá thể thiếu hụt miễn dịch hoặc bị mất miễn dịch). Theo một số phương án, đối tượng cần được sử dụng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) là cá thể mà có mối quan hệ tiếp xúc gần gũi với cá thể có hoặc có nguy cơ cao mắc phải nhiễm trùng ExPEC.

Theo một số phương án, đối tượng cần được sử dụng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) là nhân viên chăm sóc sức khỏe (ví dụ, bác sỹ hoặc y tá). Theo một số phương án, đối tượng cần được sử dụng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) bị mất miễn dịch (ví dụ, do nhiễm HIV) hoặc bị suy giảm miễn dịch.

Theo một số phương án, đối tượng cần được sử dụng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) mắc bệnh tiêu đường. Theo một số phương án, đối tượng cần được sử dụng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) mắc bệnh xơ cứng.

Theo một số phương án, đối tượng cần được sử dụng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) có tình

trạng bệnh lý mà cần chúng để sử dụng ống thông đường tiêu. Theo một số phương án, đối tượng cần được sử dụng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) có sự tổn thương tùy sống.

Liều và tần suất sử dụng

Lượng kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) mà hữu hiệu trong việc điều trị và/hoặc ngăn ngừa sự nhiễm trùng ExPEC sẽ phụ thuộc vào bản chất của bệnh, và có thể được xác định bằng kỹ thuật lâm sàng chuẩn. Sử dụng khoáng nguyên O, phức hợp sinh học và/hoặc chế phẩm có thể được thực hiện thông qua các đường dùng khác nhau đã biết đối với thầy thuốc lâm sàng, ví dụ dưới da, ngoài ruột, trong tĩnh mạch, trong cơ, cục bộ, đường miệng, trong da, áp da, trong mũi, v.v.. Theo một phương án, sử dụng bằng cách tiêm trong cơ.

Ngoài ra, liều chính xác để được sử dụng trong chế phẩm sẽ phụ thuộc vào đường sử dụng, và mức độ nghiêm trọng của sự nhiễm trùng, và tốt hơn là được xác định theo quyết định của bác sỹ và tùy thuộc vào tình trạng của mỗi đối tượng. Ví dụ, liều hữu hiệu có thể thay đổi phụ thuộc vào sử dụng, vị trí đích, tình trạng sinh lý của bệnh nhân (bao gồm tuổi, thể trọng, sức khỏe), bệnh nhân là người hay động vật, các thuốc khác được sử dụng, và việc điều trị là phòng ngừa hoặc điều trị. Liều trị liệu được tùy ý chuẩn độ để làm tối ưu độ an toàn và hiệu quả.

Theo một số phương án, thử nghiệm in vitro được thực hiện để giúp xác định khoảng liều tối ưu. Xem mục “Thử nghiệm”. Liều hữu hiệu có thể được suy ra từ đường cong đáp ứng liều thu được từ hệ thử nghiệm mẫu động vật hoặc in vitro.

Theo một số phương án, ví dụ về liều cho vaccin trên cơ sở phức hợp glyco (ví dụ, chế phẩm chứa phức hợp sinh học) nằm trong khoảng từ 0,1 μg đến 400 μg của hydrat cacbon mỗi liều. Theo các phương án khác, ví dụ về liều cho vaccin trên cơ sở phức hợp glyco (ví dụ, chế phẩm chứa phức hợp sinh học) nằm trong khoảng từ 0,1 μg đến 4000 μg của (các) protein mỗi liều. Theo một số phương án, ví dụ về

liều cho vacxin trên cơ sở phức hợp glyco (ví dụ, chế phẩm chứa phức hợp sinh học) chứa 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, hoặc 50 μg của (các) hydrat cacbon mỗi liều. Theo một số phương án, ví dụ về liều cho vacxin trên cơ sở phức hợp glyco (ví dụ, chế phẩm chứa phức hợp sinh học) chứa 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, hoặc 100 μg của (các) protein mỗi liều. Theo một số phương án cụ thể, liều dùng cho sử dụng cho người tương ứng với 0,5ml chứa khoảng 1 đến 10, ví dụ khoảng 2 đến 6, ví dụ khoảng 4 μg của polysacarit cho mỗi trong số các phức hợp glyco có mặt.

Theo một số phương án, kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) được sử dụng cho đối tượng một lần ở dạng liều đơn. Theo một số phương án, kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) được sử dụng cho đối tượng ở dạng liều đơn sau liều thứ hai 3 đến 6 tuần. Theo các phương án này, việc tiêm chủng tăng cường có thể được thực hiện cho đối tượng ở khoảng 6 đến 12 tháng sau lần tiêm chủng thứ hai. Theo một số phương án, việc tiêm chủng tăng cường có thể sử dụng kháng nguyên O của *E. coli*, phức hợp sinh học, hoặc chế phẩm khác. Theo một số phương án, sử dụng cùng một kháng nguyên O của *E. coli*, phức hợp sinh học, hoặc chế phẩm có thể được thực hiện lặp lại và sử dụng có thể được thực hiện một cách riêng rẽ ít nhất 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày, 5 ngày, 7 ngày, 10 ngày, 15 ngày, 30 ngày, 45 ngày, 2 tháng, 75 ngày, 3 tháng, hoặc ít nhất 6 tháng. Theo một số phương án, kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) được sử dụng cho đối tượng ở dạng liều đơn một lần mỗi năm.

Theo một số phương án, kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục

“Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) được sử dụng cho đối tượng 2, 3, 4, 5 liều hoặc nhiều hơn ở 2 tuần, 3 tuần, 4 tuần, 5 tuần hoặc 6 tuần một cách riêng rẽ. Theo một số phương án, 2, 3, 4, 5 liều hoặc nhiều hơn của kháng nguyên O của *E.coli* theo sáng chế (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”), phức hợp sinh học theo sáng chế (xem, mục “Phức hợp sinh học”), hoặc chế phẩm theo sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”) được sử dụng cho đối tượng ở 2, 3, 4, 5 hoặc 6 tuần một cách riêng rẽ với liều 0,1 µg đến 0,5 mg, 0,1 µg đến 0,4 mg, 0,1 µg đến 0,3 mg, 0,1 µg đến 0,2 mg, hoặc 0,1 µg đến 0,1 mg lượng hydrat cacbon. Theo một số phương án, kháng nguyên O của *E. coli*, phức hợp sinh học, hoặc chế phẩm được sử dụng tại cùng mỗi thời điểm. Theo một số phương án, kháng nguyên O của *E. coli*, phức hợp sinh học, hoặc chế phẩm được sử dụng tại thời điểm khác nhau.

Đối với việc tạo miễn dịch thụ động bằng kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng O25B), liều có thể nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 100 mg kháng thể trên mỗi kg thể trọng, hoặc từ 0,01 đến 5 mg kháng thể trên mỗi kg thể trọng. Ví dụ, liều có thể là 1 mg/kg thể trọng hoặc 10 mg/kg thể trọng hoặc nằm trong khoảng từ 1 đến 10 mg/kg hoặc nói cách khác, 70 mg hoặc 700 mg hoặc nằm trong khoảng từ 70 đến 700 mg, tương ứng cho bệnh nhân 70 kg. Ví dụ về chế độ điều trị bao gồm sử dụng một lần mỗi hai tuần hoặc một lần một tháng hoặc một lần mỗi 3 đến 6 tháng trong khoảng thời gian một năm hoặc trong một số năm, hoặc trong khoảng thời gian một số năm. Khoảng thời gian có thể không theo quy tắc và được thay đổi phụ thuộc vào lượng kháng thể trong máu của bệnh nhân.

Thử nghiệm

Thử nghiệm đánh giá khả năng phức hợp sinh học tạo ra đáp ứng miễn dịch

Khả năng phức hợp sinh học/chế phẩm theo sáng chế tạo ra đáp ứng miễn dịch cho đối tượng này có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc theo sáng chế. Theo một số phương án, khả năng phức hợp sinh học tạo ra đáp ứng miễn dịch cho đối tượng này có thể được xác định bằng cách tạo miễn dịch cho đối tượng (ví dụ, chuột nhắt) hoặc nhóm đối tượng cần điều trị với phức hợp sinh học

theo sáng chế và tạo miễn dịch cho đối tượng khác (ví dụ, chuột nhắt) hoặc nhóm đối tượng cần điều trị với mẫu đối chứng (PBS). Đối tượng hoặc nhóm đối tượng cần điều trị sau đó có thể được cho thử thách với ExPEC và khả năng của ExPEC gây bệnh (ví dụ, UTI) cho đối tượng hoặc nhóm đối tượng cần điều trị có thể được xác định. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ xác định được rằng nếu đối tượng hoặc nhóm đối tượng cần điều trị được tạo miễn dịch bằng mẫu đối chứng mắc bệnh sau khi thử thách với ExPEC nhưng đối tượng hoặc nhóm đối tượng cần điều trị được tạo miễn dịch bằng (các) phức hợp sinh học hoặc chế phẩm của chúng theo sáng chế giảm thiểu khả năng mắc bệnh hoặc không mắc bệnh, thì phức hợp sinh học này có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch cho đối tượng. Khả năng của (các) phức hợp sinh học hoặc chế phẩm của chúng theo sáng chế tạo ra huyết thanh miễn dịch mà phản ứng chéo với kháng nguyên O từ ExPEC có thể được thử nghiệm bằng, ví dụ, thử nghiệm miễn dịch, như ELISA.

Thử nghiệm diệt khuẩn in vitro

Khả năng phức hợp sinh học theo sáng chế tạo ra đáp ứng miễn dịch cho đối tượng có thể được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm huyết thanh diệt khuẩn (Serum bactericidal assay - SBA) hoặc thử nghiệm tiêu diệt thể thực bào opsonin (Opsonophagocytotic killing - OPK), mà là phương pháp được xây dựng và chấp nhận sử dụng để phê chuẩn sử dụng vacxin trên cơ sở phức hợp glyco. Thử nghiệm này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và, nói chung, bao gồm bước tạo ra và phân lập kháng thể chống lại đích có liên quan (ví dụ, kháng nguyên O, ví dụ, O25B, của *E. coli*) bằng cách sử dụng cho đối tượng (ví dụ, chuột nhắt) hợp chất mà tạo ra kháng thể này. Sau đó, khả năng diệt khuẩn của kháng thể này có thể được xác định bằng, ví dụ, nuôi cấy vi khuẩn liên quan (ví dụ, *E. coli* có kiểu huyết thanh liên quan) với sự có mặt của kháng thể này và bổ thể và – phụ thuộc vào thử nghiệm - các tế bào ưa bạch cầu trung tính và thử nghiệm khả năng của kháng thể để tiêu diệt và/hoặc làm trung hòa vi khuẩn, ví dụ, bằng cách sử dụng kỹ thuật vi sinh vật học chuẩn.

Kit

Sáng chế đề cập đến bao gói dược phẩm hoặc kit dược phẩm chứa một hoặc nhiều vật chứa được nạp đầy bằng một hoặc nhiều thành phần của chế phẩm theo

sáng chế (xem, mục “Chế phẩm chứa kháng nguyên và/hoặc phức hợp sinh học”), như một hoặc nhiều các kháng nguyên *E.coli* (xem, mục “Kháng nguyên O của *E. coli*”) và/hoặc phức hợp sinh học (xem, mục “Phức hợp sinh học”) theo sáng chế. Tùy ý cùng với (các) vật chứa có thể là lưu ý ở dạng được kê đơn bởi cơ quan chính phủ kiểm soát quá trình sản xuất, sử dụng hoặc bán được phẩm hoặc các sản phẩm sinh học, mà lưu ý này phản ánh việc phê chuẩn sử dụng bởi cơ quan kiểm soát quá trình sản xuất, sử dụng hoặc bán cho người sử dụng. Kit theo sáng chế có thể được sử dụng trong phương pháp của việc điều trị và việc tạo miễn dịch cho đối tượng cần điều trị.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Phương pháp

Sự ngưng kết

Quá trình trong đó các tế bào hoặc khối tế bào được phân giải được trộn với huyết thanh miễn dịch chứa kháng thể đặc hiệu cho cấu trúc polyme, ví dụ kháng nguyên O. Các khối ngưng kết không tan có thể quan sát được tạo ra khi huyết thanh miễn dịch phát hiện cấu trúc tế bào. Phương pháp này thường được sử dụng để xác định các kiểu huyết thanh O, K, và H. Xem DebRoy, et al., (2011) *Animal health research reviews/Conference of Research Workers in Animal Diseases* 12, 169-185

Điều chế mẫu LPS cho phân tích bằng SDS PAGE

LPS của các tế bào Gram âm bao gồm bazơ lipit A, được biến đổi bằng lõi oligosacarit để gắn kết với kháng nguyên O. Để phân tích LPS của mẫu phân lập lâm sàng, các tế bào được phát triển trong môi trường LB chuẩn ở 37°C trong 24 giờ, và sinh chất tương ứng với 1ml môi trường nuôi cấy với 2 lần thể tích OD600 được thu gom và được phân giải một lần dung dịch đệm mẫu Lämmli và được ủ ở 95°C trong 10 phút. Các phần chiết còn được xử lý thêm trong 1 giờ ở 65°C để loại bỏ tín hiệu protein bất kỳ bằng cách sử dụng 1 g/l proteinaza K. Các phần chiết được xử lý được tách riêng bằng SDS PAGE và LPS được hiển thị hóa bằng sự nhuộm bằng bạc hoặc phương pháp Western Blot bằng cách sử dụng huyết thanh miễn dịch thích hợp.

Điều chế LPS để phủ đĩa ELISA

LPS được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả bởi Apicella, (2008) *Methods Mol Biol* 431, 3-13, và còn được tinh chế như được mô tả bởi Perdomo và Montero, (2006) *Biotecnología Aplicada* 23:124-129.

HPLC của 2AB OPS: 'Lấy dầu LLO'

Phương pháp này được sử dụng để phân tích cấu trúc của OPS liên kết với UPP.

Để chiết polysaccharit liên kết với UPP, tế bào *E.coli* được rửa bằng NaCl 0,9% và được làm đông khô. Các tế bào khô được chiết bằng dung môi hữu cơ (Metanol:Nước (M:W=17:3 đến 19:1, theo tỷ lệ về thể tích (v/v)), và/hoặc hỗn hợp Clorofom:Metanol:Nước với tỷ lệ tối ưu (ví dụ C:M:W = 10:10:3; v/v/v)). Các phần chiết được làm khô dưới dòng khí N₂, và được phân tán lại trong C:M:W=3:48:47. Để tinh chế glycolipit được chiết, thể huyền phù phân tán lại có tỷ lệ 3:48:47 được cho qua ống tC₁₈ Sep-PAK. Ống được vận hành với 10ml metanol, sau đó được làm cân bằng với 10ml hỗn hợp C:M:W tỷ lệ 3:48:47. Sau khi tải mẫu, ống được rửa bằng 10ml hỗn hợp C:M:W tỷ lệ 3:48:47 (sau đây, đôi khi được viết tắt là 3:48:47) và được rửa giải bằng 5ml metanol và 5ml hỗn hợp C:M:W tỷ lệ 10:10:3. Dịch rửa giải kết hợp được làm khô dưới N₂. Các mẫu glycolipit được thủy phân bằng cách hòa tan các mẫu được làm khô trong 2ml n-propanol:axit trifloaxetic 2M(1:1), gia nhiệt đến 50°C trong 15 phút, và sau đó làm bay hơi đến khô dưới N₂ (Glover, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(40): 14255-9). Các mẫu được làm khô lại được phân tán lại trong 3:48:47 và được cho qua ống tC₁₈, và dòng đi qua được làm khô dưới N₂. Việc đánh dấu bằng 2-AB và làm sạch polysaccharit được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp đĩa tròn (Bigge, et al., *Anal Biochem* 230(2): 229-38; Merry, et al., *Anal Biochem* 304(1): 91-9).

Polysaccharit được đánh dấu bằng 2-AB được tách riêng bằng HPLC bằng cách sử dụng cột pha thường GlycoSep-N theo tài liệu của Royle và các cộng sự nhưng được biến đổi thành hệ ba dung môi (Royle, et al., *Anal Biochem* 304(1): 70-90). Dung môi A là amoni format 10 mM, độ pH là 4,4 trong 80 % axetonitril. Dung môi B là amoni format 30 mM, độ pH là 4,4 trong 40 % axetonitril. Dung môi C là axit formic 0,5 %. Nhiệt độ cột là 30 °C và polysaccharit được đánh dấu bằng 2-AB được phát hiện bằng huỳnh quang (sự kích thích tại $\lambda_{ex} = 330$ nm, sự

phát xạ tại $\lambda_{em} = 420 \text{ nm}$). Điều kiện gradien là gradien tuyến tính của 100 % A đến 100 % B trong 160 phút ở tốc độ dòng là 0,4ml/phút, sau đó 100 % B đến 100 % C trong 2 phút, tăng tốc độ dòng đến 1ml/phút. Cột được rửa trong 5 phút với 100 % C, trở lại với 100 % A trong 2 phút và vận hành trong 15 phút với 100 % A ở tốc độ dòng là 1ml/phút, sau đó trở lại tốc độ dòng đến 0,4ml/phút cho 5 phút. Các mẫu được phun vào trong nước.

Thử nghiệm deacetyl hóa

Một đương lượng của polysacarit được đánh dấu bằng 2-AB được làm khô trong ở 30°C, được phân tán lại trong 50 μl nước với có (mẫu) hoặc không có (mẫu giả) NaOH 200 mM, độ pH là khoảng 14), và được ủ trong 25 giờ ở 37°C. Sau đó, dung dịch được đưa trở lại nhiệt độ phòng và được trung hòa bằng cách bổ sung dung dịch HCl 200 mM (độ pH là khoảng 1). Sau đó làm khô trong chân không ở 30°C, mẫu được đánh dấu lại bằng 2AB và phân tích bằng HPLC.

HPLC phân giải bằng hydrazin

Kỹ thuật HPLC pha thường giống như được mô tả trên đây được sử dụng để phân tách OPS được giải phóng từ phức hợp sinh học sau khi xử lý phân giải bằng hydrazin. Trước khi xử lý phân giải bằng hydrazin, phức hợp sinh học tương ứng với 1 mg protein được làm khô hoàn toàn dưới dòng khí N_2 . Sự giải phóng polysacarit được thực hiện bằng cách sử dụng kit xác định sự giải phóng polysacarit bằng cách phân giải bằng hydrazin Ludger Liberate (Ludger #LL-HYDRAZ-A2) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nói chung, 450 μl hydrazin được bổ sung vào các mẫu được làm khô dưới khí quyển N_2 và được ủ trong 16 giờ ở 85°C. Hydrazin được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới N_2 ở 45°C. Quá trình N-acetyl hóa lại polysacarit được thực hiện bằng cách ủ trong 471 μl anhydrit axetic 4,5% trong natri bicacbonat 1M trong hai giờ trong đá. Sau đó, 600 μl của dung dịch TFA 5% được bổ sung và các mẫu được thủy phân trong một giờ trong đá. Quá trình tinh chế được thực hiện trên cột EB20 bằng cách sử dụng dung dịch đệm EB20 và B tương ứng.

Polysacarit được giải phóng và tinh chế được đánh dấu bằng 2-AB và được phân tích bằng NP-HPLC như được mô tả cho các mẫu LLO. Các đỉnh liên quan thu được và được xác định bằng MS/MS.

Các đỉnh MS và MS/MS của HPLC

Để phân tích trình tự monosacarit của phân tử OPS liên quan, phân tích khối phổ được thực hiện. Các phân đoạn được thu gom và được làm khô tương ứng với các đỉnh HPLC đặc trưng được phân tán lại trong 5 μ l axetonitril (ACN) 10%, axit trifloaxetic (TFA) 0,1% và được trộn theo tỷ lệ 1:1 với dung dịch nền (40mg/ml DHB trong ACN 50%, TFA 0,1%) trên tấm mục tiêu. Dữ liệu MS và MS/MS thu được trong chế độ ion dương trên khối phổ kế Ultraflex-II MALDI-ToF/ToF (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). MS/MS thu được bằng cách sử dụng phương pháp LIFT. Hỗn hợp peptit chuẩn (Bruker Daltonik GmbH) được sử dụng để ngoại chuẩn. Quang phổ được ghi lại bằng cách sử dụng phần mềm phân tích Flex (Bruker Daltonik GmbH) và được phân tích bằng tay.

Tế bào chủ

Phức hợp sinh học được tạo ra bởi tế bào *E.coli* tái tổ hợp biểu hiện, thông qua (các) plasmit, (các) protein mang và oligosacaryl transferaza từ *C. jejuni* (PglB), và OPS từ vector plasmit hoặc thể đột biến chèn nhiễm sắc thể.

EPA được khử gen độc tính (ngoại độc tố từ *Pseudomonas aeruginosa* bao gồm các đột biến L552V, Δ E553) được sử dụng làm protein mang, và được biến đổi để chứa 2 hoặc 4 vị trí glycosyl hóa (lần lượt còn được gọi là 2S-EPA và 4S-EPA,) và HIS Tag có đầu cuối C, và được biểu hiện từ plasmit được cảm ứng bằng arabinosa, thu được từ pBR32 (xem, Ihssen, et al., (2010) Microbial cell factories 9, 61).

MBP (Protein gắn kết maltoza), protein chu chất tự nhiên của *E.coli* hòa tan, được biểu hiện từ pGVXN579, pGVXN579 là plasmit pMAL-p2X được biến đổi (New England Biolabs) mã hóa ba trình tự điều hòa quá trình N-glycosyl hóa của vi khuẩn theo chuỗi sau đó Myc-Tag được dung hợp đầu cuối C với protein gắn kết maltoza ORF được mã hóa trên plasmit. Điều này cho phép thực hiện quá trình tinh chế bằng ái lực của phức hợp sinh học MBP không phụ thuộc vào HIS-tag. Việc cảm ứng tạo ra sự biểu hiện được kiểm soát bằng trình tự khởi đầu phiên mã tac và cảm ứng bằng cách sử dụng IPTG.

Protein PglB được biểu hiện từ plasmit pEXT21 (mảnh *EcoRI/BamHI* từ pMAF10 (Feldman et al., 2005, PNAS USA 102(8):3016-3021)) được tạo dòng

trong pEXT21 với HA-tag được dung hợp đầu cuối C. Các biến thể của plasmit biểu hiện là việc làm tối ưu hóa codon (pGVXN939), việc làm tối ưu hóa codon (đơn vị mã) với việc loại bỏ vị trí glycosyl hóa (pGVXN948), và được loại bỏ HA-tag (pGVXN970) và việc làm tối ưu hóa codon và được loại bỏ HA-tag (pGVXN971).

Mẫu phân lập lâm sàng được phân tích về khả năng tổng hợp một số OPS bằng cách sử dụng kỹ thuật ngưng kết, kỹ thuật Western Blot, kỹ thuật nhuộm bằng bạc, lấy dấu LLO, phân loại kiểu huyết thanh PCR, hoặc kỹ thuật tương tự mà giúp xác định đặc trưng cấu trúc OPS, và kiểu hình kháng thuốc kháng sinh của chúng. Một số mẫu phân lập lâm sàng còn được loại bỏ nhiễm sắc thể đối với enzym ligaza, *WaaL*, để làm tăng khả năng OPS cho quá trình glycosyl hóa protein hoặc quá trình phân tích OPS.

Để tiếp tục phân tích mẫu phân lập lâm sàng, cụm *rfb* của chủng thí nghiệm W3110 được thay thế bằng cụm *rfb* được tạo dòng từ mẫu phân lập lâm sàng, và quá trình sinh tổng hợp OPS được phân tích. Gen *waaL* được loại bỏ để nâng cao hiệu quả của quá trình sản xuất phức hợp sinh học.

Sự trao đổi cụm và sự loại bỏ *waaL* được thực hiện bằng quá trình tái tổ hợp tương đồng bằng cách sử dụng phương pháp được tối ưu hóa (xem, đơn quốc tế số PCT/EP2013/068737) hoặc phương pháp được mô tả trong tài liệu (Datsenko và Wanner, (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97, 6640-6645). Đối với việc trao đổi cụm OPS, cụm *rfb* liên quan của mẫu phân lập lâm sàng được tạo dòng vào trong plasmit đếm chọn lọc pDOC-C, cùng với catxet kháng kháng sinh, dùng cho quá trình kết hợp sau đó vào trong vị trí *rfb* của chủng *E.coli* W3110 (Kuhlman and Cox, 2010, Nucleic acid research 38, e92; Lee et al, 2009, BMC Microbiol 9, 252). Quá trình tái tổ hợp tương đồng của cụm *rfb* lớn hơn được quan tâm đạt được bằng cách sử dụng ADN liên kề cụm *rfb* mã hóa trình tự của W3110 có chiều dài từ 0,5 đến 1,5 kilo bazơ (kb) và làm thẳng in vivo ADN chèn từ *rfb* mang plasmit. Chủng tạo thành nằm trong cụm *rfb* được thay thế (có và không có catxet kháng kháng sinh), cụ thể hơn cụm *rfb* của W3110 được thay thế cho phân tử ADN nằm giữa gen *gnd* và *galE* bằng cách kéo dài tương đồng được phân lập từ mẫu phân lập *E.coli* lâm sàng.

Trong một số thử nghiệm, chủng W3110 chứa cosmit mã hóa cụm *rfb* của kiểu huyết thanh *E.coli* xác định được sử dụng làm chủng vật chủ.

Đối với quá trình sản xuất phức hợp sinh học được biểu hiện tái tổ hợp trong chủng trên cơ sở W3110, gen mang W3110 mà gây trở ngại cho quá trình sản xuất OPS tái tổ hợp được loại bỏ. Ví dụ, đối với quá trình sản xuất tế bào chủ của phức hợp sinh học O25B, cụm *gtrABS* của W3110 được loại bỏ. Để thực hiện quá trình này, quá trình tái tổ hợp tương đồng theo phương pháp đã biết (Bloor AE, Cranenburgh RM. Appl Environ Microbiol. 2006 Apr;72(4):2520-5.) bằng cách sử dụng trình tự tương đồng liền kề trước gen *gtrA* và sau gen *gtrS*.

Để lắp ráp chủng sản xuất, chủng vật chủ được biến đổi bằng *pglB* và plasmit biểu hiện chất mang bằng quá trình biến nạp. Xem Wacker et al., 2002, Science 298:1790-1793.

Quá trình sản xuất phức hợp sinh học

Quá trình sản xuất phức hợp sinh học được thực hiện bằng cách phát triển tế bào chủ và tinh chế phức hợp sinh học được tạo ra trong chu chất. Sự phát triển được thực hiện trong bình lắc nuôi vi sinh vật hoặc trong quá trình lên men có bổ sung dinh dưỡng ở quy mô công nghiệp.

Quá trình nuôi cấy trong bình lắc được thực hiện ở 37°C, bằng cách sử dụng môi trường bao gồm thuốc kháng sinh thích hợp trong môi trường được làm giàu Terrific Broth, đôi khi được bổ sung với MgCl₂ 5 mM. Môi trường được ủ ở OD là 0,05 với việc nuôi cấy qua đêm từ các tế bào sản xuất mới được chuyển nạp, được phát triển đến pha giữa sau giai đoạn tăng sinh, được cảm ứng bằng 0,2% arabinoza và IPTG 1mM, còn được phát triển và được thu hoạch sau 20 giờ phát triển.

Quá trình lên men có bổ sung chất dinh dưỡng

Phân ước của ngân hàng dòng tế bào sản xuất được sử dụng để cấy mầm bình lắc chứa môi trường Soy LB với thuốc kháng sinh thích hợp. Bình lắc được ủ ở tốc độ khuấy 180 vòng/phút, 37°C trong khoảng 12 giờ. Môi trường nuôi cấy theo mẻ không có bổ thể được làm vô trùng trực tiếp bên trong thiết bị phản ứng sinh học (33 phút ở $\geq 121^\circ\text{C}$), được làm mát, và bổ thể được bổ sung. KOH 4M hoặc axit phosphoric 25% được gắn với chất lên men để điều chỉnh độ pH và độ pH được điều chỉnh đến độ pH là 7. Sự cấy mầm trong thiết bị phản ứng sinh học và

việc nuôi cấy theo mẻ trước khi nuôi cấy được thực hiện để tạo ra OD₆₀₀ ban đầu là 0,005. Độ pH được duy trì một cách ổn định bằng cách bổ sung KOH 4M hoặc axit phosphoric 25%. Lượng oxy hòa tan (Dissolved Oxygen - DO) được duy trì. Áp suất chung được duy trì ở 600 mbar (60 Kpa). Quá trình tạo ra sản phẩm được cảm ứng bằng L-Arabinosa (0,1%) và/hoặc IPTG (1 mM). Ngay say khi cảm ứng, nguyên liệu được cho bắt đầu bằng cách bổ sung môi trường cấp liệu chứa 2,5% Arabinosa và IPTG. 24±2 giờ sau khi cảm ứng, thiết bị phản ứng sinh học được làm mát đến 25°C, nguyên liệu được ngưng bổ sung và việc thu hoạch được thực hiện bằng cách lọc dòng tiếp tuyến hoặc ly tâm.

Sinh chất được phân giải trong 0,5% Triton X-100 bằng cách phá vỡ trong 4 chu trình làm đồng nhất ở áp suất cao ở 800 bar (80000 Kpa).

Phức hợp sinh học được tinh chế bằng cột sắc ký. Các kỹ thuật sắc ký khác nhau được sử dụng để điều chế phức hợp sinh học, chủ yếu là IMAC, trao đổi anion sắc ký trên cơ sở nhựa Q (Anionic exchange chromatography - AEC), và sắc ký theo loại cỡ (Size exclusion chromatography - SEC). Xem, ví dụ, Sarawat et al., 2013, Biomed. Res. Int. ID#312709 (trang 1 đến 18) và WO 2009/104074 liên quan đến kỹ thuật này.

Quá trình sản xuất phức hợp sinh học cho thử nghiệm tiền lâm sàng

Trước khi nuôi cấy, lượng xác định được chuyển vào thiết bị phản ứng sinh học chứa môi trường được làm giàu ở 35 ± 0,2°C. Độ pH và lượng oxy hòa tan được duy trì. Tốc độ khuấy được điều chỉnh đến 700 vòng/phút.

Khi mật độ tế bào được điều chỉnh đến OD₆₀₀ = 40 ± 5, quá trình tạo ra sản phẩm được cảm ứng bằng L-Arabinosa (0,1%) và IPTG (1 mM). Nguyên liệu được cho bắt đầu khoảng 24±2 giờ sau khi cảm ứng và thiết bị phản ứng sinh học được làm mát. Ngay khi nhiệt độ được điều chỉnh đến 25°C, nguyên liệu được ngưng bổ sung và các tế bào được thu gom.

Quá trình làm đồng nhất ở áp suất cao

Sinh chất tương ứng với 50 L khi thu hoạch được giã đông trong 1 ngày ở 2 đến 8°C. Sau đó, 2,5L của dung dịch đệm phân giải và làm sạch được bổ sung vào bình chứa. Triton X-100 được bổ sung để nồng độ cuối là 0,5% và các tế bào được giã đông một cách hoàn toàn được phá vỡ bằng 4 chu trình làm đồng nhất ở áp suất

cao ở 800 bar (80000 KPa). Các tế bào được thu hoạch và được rửa bằng cách sử dụng kỹ thuật chuẩn.

Quá trình phân tích thành phần monosacarit:

Phức hợp sinh học chứa khoảng 8 ug polysacarit được thủy phân trong sáu giờ trong 104µl TFA 3M ở 99°C. TFA được loại bỏ bằng cách làm bay hơi và các mẫu được rửa một lần với 500µl 2-propanol. Monosacarit tạo thành được phân tán trong 100µl hỗn hợp đánh dấu chứa 87,1 mg/ml 1-phenyl-3-metyl-5-pyrazolon (PMP), 50% MeOH và NaOH 150 mM. Việc đánh dấu được thực hiện trong 60 phút ở 70°C. Các mẫu được trung hòa bằng cách bổ sung 50µl HCl 300 mM và 20µl Tris/HCl 100 mM độ pH là 7,0. Monosacarit được đánh dấu bằng PMP được tinh chế bằng cách chiết, một lần với 1ml di-butyl ete và ba lần với 1ml CHCl₃.

Monosacarit được tạo dẫn xuất bằng PMP được tách riêng bằng RP-HPLC (Merck-Hitachi) trên cột C18 Inertsil ODS-3 (GL Sciences) có lắp đặt cột trước. Gradient hai bước từ 100% dung dịch đệm A (13% axetonitril, 87% H₂O (0,045% KH₂PO₄, 0,05% triethylamin, độ pH là 7,0) đến 50% dung dịch đệm A/50% dung dịch đệm B (21% axetonitril, 79% H₂O (0,045% KH₂PO₄, 0,05% triethylamin, độ pH là 7,0) trong 4 phút đến 100% dung dịch đệm B trong 47 phút được thực hiện ở 35°C và tốc độ dòng là 1ml/phút. Thể tích phun là 50 µl và quá trình rửa giải được quan sát bằng cách dò bằng UV trực tuyến ở 250 nm. Mỗi đỉnh được xác định theo sự chồng lấp với sắc ký đồ với các tiêu chuẩn đối với monosacarit có bán trên thị trường D-Glucoza (Sigma-Aldrich #G7528), L-rhamnoza (Sigma-Aldrich #R3875), N-axetyl-D-glucosamin (Sigma-Aldrich #A8625) và N-axetyl-L-fucosamine (Omicron Biochemicals #FUC-006).

Ví dụ 1: Dịch tế học

Để xác định sự phân bố kiểu huyết thanh của sự nhiễm trùng đường tiết niệu (Urinary tract infection - UTI) do *E.coli* gây ra, nghiên cứu dịch tế học được thực hiện. Hơn 1800 mẫu *E.coli* được phân lập từ các mẫu nước tiểu của người được thu gom từ đối tượng trong Thụy Sĩ và các kiểu huyết thanh của kháng nguyên O (OPS) từ mỗi mẫu được phân tích bằng cách sử dụng kỹ thuật ngưng kết truyền thống. Xem Fig.4.

Các mẫu nước tiểu được phân lập của người được phân tích để xác định tính đồng nhất của tác nhân gây bệnh của chúng và kiểu kháng kháng sinh của chúng. Mẫu *E.coli* được phân lập thu được từ các mẫu sau phân tích. Mẫu *E.coli* được phân lập được xác định bằng nguyên lý lựa chọn-loại trừ vi sinh vật học bao gồm sự phát triển trên crom (CPS3) và thạch MacConkey (MacConkey agar). Mẫu *E.coli* được phân lập còn được phân tích bằng cách sử dụng thử nghiệm ngưng kết để xác định kiểu huyết thanh của kháng nguyên O của chúng. Xem DebRoy et al. (2011) Animal health research reviews/Conference of Research Workers in Animal Disease 12, 169-185. Các mẫu phân lập từ các kiểu huyết thanh của cùng kháng nguyên O này còn được phân tích để xác định cấu trúc hóa học của chuỗi O từ mỗi mẫu phân lập. Xem, bảng 1A. Một số chủng *E.coli* được phân lập được xác định là kháng kháng sinh, bao gồm quá trình xác định chủng đề kháng floquinolon và chủng sản xuất beta-lactamaza phổ rộng (Extended-spectrum beta-lactamase - ESBL).

Bảng 1A: Sự phân bố của các kiểu huyết thanh *E.coli* thông dụng nhất liên quan đến UTI từ việc thu gom 1841 mẫu nước tiểu được thu gom ở Thụy Sĩ năm 2012. Bảng này thể hiện sự phân bố kiểu huyết thanh của các mẫu từ tiểu quần thể gồm 671 đối tượng liên quan, và sự phân bố của tất cả các mẫu **.

Các kiểu huyết thanh <i>E.coli</i> thông dụng nhất liên quan đến UTI			
Kiểu huyết thanh O	Nhóm người mắc UTI trong độ tuổi 18-70* (n=671)	Kiểu huyết thanh O	Nhóm người và UTI phải nhập viện ở tất cả các độ tuổi** (n=1871)
6	10,75%	2	8,75%
2	9,55%	6	8,47%
25	6,87%	25	8,37%
1	5,52%	75	4,56%
4	5,37%	1	4,29%
75	4,78%	8	3,86%
8	3,43%	18	3,53%

Các kiểu huyết thanh <i>E.coli</i> thông dụng nhất liên quan đến UTI			
18	3,28%	4	3,26%
15	3,28%	15	2,39%
73	2,24%	73	2,17%
16	2,24%	16	1,85%
7	1,94%	7	1,68%

Các kiểu huyết thanh O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O25, O73, và O75 được phân lập từ đối tượng không phụ thuộc vào vị trí, thời gian phân lập, các triệu chứng, và nhóm đối tượng đích, cho thấy các kiểu huyết thanh này chiếm ưu thế hơn các kiểu huyết thanh của *E.coli* gây bệnh viêm màng não (UPEC). Do đó, quá trình xác định các kiểu huyết thanh thông dụng nhất của kháng nguyên O cho thấy rằng vaccin đặc hiệu kháng nguyên O có thể chỉ giới hạn ở tập hợp con của các kiểu huyết thanh, cụ thể là các kiểu huyết thanh liên quan nhiều nhất đến bệnh, như được xác định trong nghiên cứu được mô tả trong ví dụ này.

Quá trình phân tích hồi cứu các kiểu huyết thanh UTI trong 1323 các mẫu phân lập từ ba thập kỷ đã qua ở Mỹ thu được từ Trung tâm Thông tin tham khảo về *E.coli* (*E.coli* Reference center - ECRC) cho phép thực hiện việc so sánh đầy đủ với tài liệu chuyên ngành và dữ liệu hiện có từ Thụy Sĩ. Tỷ lệ hiện hành của 20 kiểu huyết thanh thông dụng nhất được xác định một cách độc lập với nhau về vị trí, thời gian phân lập, các triệu chứng, hoặc đối tượng đích và cho phép xác định các kiểu huyết thanh thông dụng liên quan đến UPEC (xem, bảng 1B).

Bảng 1B: Tỷ lệ hiện hành của các kiểu huyết thanh thông dụng nhất liên quan đến UTI từ tài liệu chuyên ngành chọn lọc từ năm 1987 đến 2011 và từ dữ liệu được phân tích hồi cứu ở Mỹ từ năm 2000 đến 2011 (ECRC).

Chỉ dẫn	Tổng số nhiễm trùng đường tiết niệu	Viêm bàng quang	Bệnh viêm thận	Từ năm 2000-2010 ở Mỹ
	Dữ liệu hiện có từ 1860 mẫu phân lập	Dữ liệu hiện có từ 1089 mẫu phân lập	Dữ liệu hiện có từ 373 mẫu phân lập	315 (tất cả các mẫu UTI trừ phân, tất cả các độ tuổi, F+M) Số lượng không thể phân

				loại không có giá trị
Kiểu huyết thanh				
O1	4,8%	4,1%	5,4%	7,0%
O2	7,1%	4,9%	15,3%	14,0%
O4	7,8%	6,0%	3,2%	3,2%
O6	16,9%	16,3%	7,8%	18,7%
O7	3,3%	2,4%	2,4%	1,9%
O8	1,7%	3,2%	0,8%	3,5%
O15	0,6%	1,5%	0,8%	1,3%
O16	4,3%	3,2%	7,2%	1,9%
O18	7,0%	7,1%	6,7%	7,0%
O21	na	na	na	1,3%
O22	0,6%	0,6%	0,5%	0,0%
O25	3,0%	4,8%	0,5%	8,6%
O75	7,5%	6,0%	8,6%	3,8%
O83	1,9%	0,7%	0,5%	1,3%
O20				1,6%
O77				2,2%
O82				1,9%
Các kiểu khác và không thể phân loại/không có giá trị	33,3%	39,2%	40,2%	
Các kiểu huyết thanh O khác (NT không có giá trị)				21,0%

Các mẫu phân lập từ các kiểu huyết thanh được mô tả được xác định dưới dạng phần trăm (%) so với tổng số các mẫu phân lập (Andreu et al., 1997, *J Infect Dis* 176:464-469; Blanco et al., 1996, *Eur J Epidemiol* 12:191-198; Fathollahi et al., 2009, *Iranian Journal of Clinical Infectious Disease* 4:77-81; Johnson et al., 2005, *J Clin Microbiol* 43:6064-6072; Molina-Lopez et al., 2011, *Journal of Clinical Infection in developing countries* 5:840-849; Sandberg et al., 1988, *J Clin Microbiol* 26:1471-1476; K. L. 2007, *The Journal of infection* 55:8-18; Teraï et al., 1997, *Int J Urol* 4:289-294). Trong một số trường hợp, dữ liệu cụ thể không có thông tin; do đó số phần trăm có thể chỉ đưa ra chỉ dẫn về sự phân bố chung của kiểu huyết thanh từ các mẫu phân lập UTI khác nhau trong các nghiên cứu được mô tả và cần phải được lưu ý. Tuy nhiên, các kiểu huyết thanh khác được mô tả

được xác định ít liên quan hơn (O15, O20, O21, O22, O77 và O82) cũng được bao gồm.

Tất cả các thông tin từ dịch tễ học phân tích được xem xét cùng nhau, 10 kiểu huyết thanh chiếm ưu thế hơn có thể được xem là gây ra 60 đến 80% sự nhiễm trùng *E. coli*, với giả thiết bao gồm các tỷ lệ nhỏ của chủng không thể phân loại. Ngoài ra, dữ liệu thể hiện tầm quan trọng đáng ngạc nhiên của kiểu huyết thanh O25 trong nghiên cứu dịch tễ học từ Thụy Sĩ và, khi được so sánh với dữ liệu tài liệu chuyên ngành và dữ liệu gần đây từ Mỹ. Xem các bảng 1A và B.

Các kiểu huyết thanh của kháng nguyên O của *E.coli* thường bao gồm các kiểu phụ, mà khác biệt, nhưng tương tự về mặt cấu trúc và chức năng kháng nguyên. Để xác định các kiểu phụ chưa biết/chưa được thông báo trong số mẫu phân lập lâm sàng được thu gom, và để xác định các kiểu phụ của kháng nguyên O thông dụng nhất, cấu trúc hóa học của kháng nguyên O từ các kiểu huyết thanh thông dụng nhất được phân tích một cách cụ thể hơn.

Ví dụ 2: O25 của *E. coli*

Trong những năm gần đây, số lần xuất hiện gia tăng của chủng dương tính với O25 được quan sát (xem, George and Manges (2010) *Epidemiol Infect* 138, 1679-1690) và được chứng minh bằng nghiên cứu được mô tả trong Ví dụ 1, trong đó kiểu huyết thanh O25 được xác định là một trong số bốn các kiểu huyết thanh của *E.coli* thông dụng nhất xét về tỷ lệ xuất hiện.

O25A

Cấu trúc đơn vị lặp lại của kháng nguyên O của kiểu huyết thanh O25 của *E.coli* đã được mô tả trước đây (xem, Kenne et al., 1983, *Carbohydrate Research* 122, 249-256; và Fundin et al., 2003, *Magnetic Resonance in Chemistry* 41, 4) và được thể hiện trong Fig.2B. Cụm *rfb* liên quan đến kháng nguyên O O25 từ chủng *E.coli* E47a cũng đã được công bố (Ngân hàng dữ liệu gen GU014554), và được thể hiện trong Fig.2A. *E.coli* E47a được sử dụng làm chủng đối chứng để phân loại kiểu huyết thanh O25. Ngoài ra, thông tin về trình tự cụm *rfb* có thể thu được từ trình tự bộ gen của chủng tạo ra vi khuẩn có trong nước tiểu không gây ra các triệu chứng, *E.coli* 83972, (xem, Zdziarski et al., 2010, *PLoS Pathog* 6, e1001078). Mặc dù kiểu hình biểu hiện O25 chưa được xác định, tuy nhiên trình tự cụm *rfb* của

E.coli E47a và 83972 là tương đồng 99,49%, điều này cho thấy rằng chúng mã hóa cùng một kháng nguyên O.

Trong bản mô tả này, kháng nguyên O từ chủng *E.coli* 83972 và E47a còn được ký hiệu là “O25A” vì, như được mô tả sau đây, kháng nguyên O của *E.coli* mới, được ký hiệu là “O25B,” được xác định trên cơ sở phân tích mẫu phân lập lâm sàng thu được trong nghiên cứu dịch tễ học được mô tả trong ví dụ 1 trên đây.

Chức năng đối với sản phẩm gen được dự đoán của chủng *E.coli* 83972 và E47a cũng được đề xuất. Xem bảng 2; Ngân hàng dữ liệu gen GU014554; và Szijarto, et al. (2012) FEMS Microbiol Lett 332, 131-136.

Bảng 2. Các dự đoán gen kháng nguyên O O25A từ cụm *rfb* như được công bố bởi Wang, et al. (2010) J Clin Microbiol 48, 2066-2074; ngoài ra, xem: Ngân hàng dữ liệu gen GU014554.

Tên gọi gen	Chức năng được giả định	Tính tương đồng/Protein [sinh vật] có nghĩa nhất, sự nhận biết đặc hiệu, độ đồng nhất tối đa (BLAST)
<i>rmlB</i>	dTDP-Glucoza 4,6-dehydrataza	dTDP-Glucoza 4,6-dehydrataza (<i>E. Coli</i> IAI39), YP_002406996.1, 98%
<i>rmlD</i>	dTDP-6-Deoxy-D-Glucoza 3,5-epimeraza	dTDP-6-Deoxy-L-manozadehydrogenaza (<i>E. Coli</i>), ACA24825.1, 97%
<i>rmlA</i>	Glucoza-1-phosphat thymidyltransferaza	Glucoza-1-phosphat thymidyltransferaza (<i>E. Coli</i> IAI39), YP_002406998.1, 99%
<i>rmlC</i>	dTDP-4-dehydrorhamnoza 3,5-epimeraza	RmlC (<i>E. Coli</i>), ACA24796.1, 70%
<i>Wzx</i>	Flippaza của kháng nguyên O	O-kháng nguyên transporter (<i>E. Coli</i>), WP_000021239,1, 100%
<i>wekA</i>	Glycosyltransferaza	dTDP-Rha:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP α -1,3-rhamnosyltransferaza (<i>E. Coli</i>), WP_000639414,1, 99%
<i>wekB</i>	Glucosyltransferaza	WcmS;UDP-Glc:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-

Tên gọi gen	Chức năng được giả định	Tính tương đồng/Protein [sinh vật] có nghĩa nhất, sự nhận biết đặc hiệu, độ đồng nhất tối đa (BLAST)
		UPP β -1,6- glucosyltransferaza (<i>E. Coli</i> O158), ADN43874,1, 40%
<i>Wzy</i>	Polymeraza của kháng nguyên O	Wzy (<i>E. Coli</i>), ADR74237,1, 30%
<i>wekC</i>	Glycosyltransferaza	WfbF; UDP-Glc:FucNAc-GlcNAc-UPP α -1,3-glucosyltransferaza (<i>E. Coli</i>), ABG81807,1, 46%
<i>fnlA</i>	UDP-N-axetylglucosamin-4,6-dehydrataza/5-epimeraza	UDP-N-axetylglucosamin 4,6-dehydrataza/5-epimeraza (<i>E. Coli</i>), WP_001556096.1, 95%
<i>fnlB</i>	UDP-2-axetamido-2,6-dideoxy-beta-L-taloza 4-dehydrogenaza	FnlB (<i>E. Coli</i>), AAY28261,1, 97%
<i>fnlC</i>	UDP-N-axetylglucosamin 2-epimeraza	UDP-N-axetylglucosamin 2-epimeraza (<i>E. Coli</i>) WP_000734424,1, 98%
<i>wbuB</i>	Glycosyltransferaza	UDP-L-FucNAc: GlcNAc-UPP α -1,3-N-Axetylfucosaminyltransferaza (<i>E. Coli</i>)P12b, O26], YP_006169152,1, 73%
<i>wbuC</i>	Glycosyltransferaza bị cắt cụt	WbuC (<i>E. Coli</i>), AAV74548.1, 72%

Việc so sánh cấu trúc và cụm gen cho thấy rằng tất cả các chức năng cần cho sự lắp ráp của OPS O25A được mã hóa trong cụm *rfb* nằm trong *galE* và *gnd*.

Các chức năng của các enzym của cụm gen *rfb* (xem, Fig.2A) như sau:

RmlBDAC mã hóa enzym cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp của dTDP-L-Rhamnoza, mà là cơ chất trong việc bổ sung nhánh L-Rha cho đơn vị lắp lại OPS.

FnlABC mã hóa enzym cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp của UDP-L-FucNAc, mà là cơ chất cho trong việc bổ sung L-FucNAc cho đơn vị lặp lại OPS O25.

WekABC và wbuBC là các glycosyltransferaza theo phân tích về tính tương đồng. Tuy nhiên, wbuC dường như ngắn và bị cắt cụt và có thể không có chức năng. Do đó, phân giải thích về mặt chức năng có thể có nghĩa nhất cho thấy rằng có bốn glycosyltransferaza tạo ra bốn liên kết cho sự lắp ráp của đơn vị lặp lại.

Wzx và Wzy cần thiết cho quá trình đảo ngược của BRU đối với chu chất và quá trình polyme hóa của chúng trên Und-PP.

Tất cả các chức năng cần thiết để tổng hợp cấu trúc đơn vị lặp lại O25A đã biết được mã hóa bằng *E.coli* E47a và cụm *rfb* 83972. Do đó có thể cho rằng cụm *rfb* chịu trách nhiệm cho việc mã hóa OPS O25A.

O25B

Trong năm 2009, các mẫu phân lập *E.coli* lâm sàng từ các bệnh viện ở Tây Ban Nha được mô tả để xác định nhóm tạo dòng vô tính. Xem Blanco, et al. (2009) J Antimicrob Chemother 63, 1135-1141. Đặc trưng của a) kiểu ESBL, b) kiểu huyết thanh O, c) gen độc lực, d) phân giải trình tự gen nhiều vị trí (Multi-locus sequence typing -mlST), và e) phân giải bằng phương pháp điện di xung điện trường (Pulsed field gel electrophoresis - PFGE) được thực hiện. Kết quả cho thấy rằng khoảng 20% của tất cả các mẫu phân lập có thể được cho là tạo ra cùng một dòng vô tính: Kiểu huyết thanh và MLST O25:H4 ST131, kiểu ESBL CTX-M15, Nhóm phân loài B2, mã hóa các gen độc lực cụ thể. Quá trình phân tích các thành phần cụm *rfb* của mẫu phân lập lâm sàng tiêu biểu chỉ ra trình tự 3' chưa xác định khi được so sánh với trình tự chủng phân giải từ chủng E47a, và ngoài ra từ mẫu phân lập lâm sàng được xác định bằng phương pháp phân giải PCR đặc hiệu gen tương ứng (xem, Clermont et al., 2008, J Antimicrob Chemother. 61(5):1024-8.; Clermont et al., Diagn. Microbiol Infect Dis. 2007, 57(2):129-36.; và Li, et al., 2010, J Microbiol Methods 82, 71-77, Trong năm 2013, Phan và các cộng sự công bố trình tự hệ gen của dòng vô tính O25b:H4 ST131, giúp xác định rằng dòng vô tính được tạo ra từ K-12 phù hợp với cấu trúc của cụm gen *waa* của nó như đã được thông báo trước đây. Xem Phan et al., 2013, PLOS Genetics 9(10):1-18 (e1003834).

Bên cạnh đó, dữ liệu này cho phép xác định rằng dòng ngưng kết O25 mới có trong *E.coli* được phân lập trong bệnh viện, và dòng vô tính có các kiểu hình ESBL, mlST, và PFGE đặc hiệu và nằm trong cụm gen kháng nguyên O được biến đổi.

Phân giải PCR

Để xác định kiểu huyết thanh O25B có trong các chủng *E.coli* được phân lập được xác định trong nghiên cứu dịch tễ học được mô tả trong ví dụ 1, chủng dương tính với việc ngưng kết O25 được phân tích bằng cách phân giải PCR cho O25 và O25B. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các khuẩn lạc được chọn từ đĩa petri (đĩa cặn có nắp dùng để cấy vi khuẩn) làm nguồn ADN mẫu và các đoạn mồi oligonucleotit khác nhau. Các đoạn mồi đặc hiệu O25, phụ thuộc vào sự khuếch đại E47a O25 *wzy*, và được mô tả trong tài liệu Li, et al. (2010) J Microbiol Methods 82, 71-77 được sử dụng. Ngoài ra các đoạn mồi đặc hiệu O25B được sử dụng được mô tả trong tài liệu Blanco, et al. (2009) J Antimicrob Chemother 63, 1135-1141, mà đặc hiệu cho vị trí 3' chưa xác định của cụm *rfbI* của O25B (LNB220). Theo tài liệu của Phan *et al.*, 2013, cặp oligonucleotit đặc hiệu O25B này bắt cặp tại vị trí 3' của cụm *rfb* của O25B.

Trong số 24 mẫu phân lập lâm sàng được thử nghiệm với kiểu hình dương tính với việc ngưng kết O25, 20 mẫu được cho là có kiểu huyết thanh O25B bằng cách phân giải PCR, trong khi đó 4 mẫu còn lại được xác định thuộc kiểu huyết thanh O25A bằng cách phân giải PCR. Do đó, một cách tình cờ, chúng có kiểu huyết thanh O25B được xác định là nhiều hơn trong số các chủng được phân tích so với chủng có kiểu huyết thanh O25A.

Xác định trình tự cụm

Để phân tích gen của cụm *rfb* của O25B, cụm của chủng dương tính với O25B PCR, được ký hiệu là “upec138” được xác định trình tự. Gen được xác định và protein liên quan tương đồng nhất của chúng cùng với danh pháp (tên gọi) được đề xuất được liệt kê trong bảng 3 dưới đây. Gen đặc hiệu cho O25B và không có trong O25A được thể hiện bằng dấu hoa thị.

Bảng 3. Đề xuất về gen kháng nguyên O O25B từ cụm *rfb*

Tên gọi gen	Chức năng được giả định	Tính tương đồng/Protein [sinh vật] có nghĩa nhất, sự nhận biết đặc hiệu, độ đồng nhất tối đa (BLAST)
<i>rmlB</i>	dTDP-Glucoza 4,6-dehydrataza	sản phẩm gen rffG [<i>E. Coli</i> NA114], YP_006139244, 99%
<i>rmlD</i>	dTDP-6-Deoxy-D-Glucoza 3,5-epimeraza	dTDP-4-dehydrorhamnoza reductaza [<i>E. Coli</i> NA114], YP_006139243, 100%
<i>rmlA</i>	Glucoza-1-phosphat thymidyltransferaza	sản phẩm gen rffH2 [<i>E. Coli</i> NA114], YP_006139242, 100%
<i>rmlC</i>	dTDP-4-dehydrorhamnoza 3,5-epimeraza	dTDP-4-dehydrorhamnoza 3,5-epimeraza [<i>E. Coli</i> NA114], YP_006139241, 99%
<i>Wzx</i>	Wzx, flippaza của kháng nguyên O	Wzx [<i>E. Coli</i> chủng E47a], ADI43260, 99%
<i>wekA</i>	Glycosyltransferaza (GT)	dTDP-Rha:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP α -1,3-rhamnosyltransferaza [<i>E. Coli</i> 83972], ZP_04004894, 93%
<i>wekB</i>	Glucosyltransferaza (GT)	UDP-Glc:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP β -1,6- glucosyltransferaza [<i>E. Coli</i> 83972], YP_006106413, 93%
<i>Wzy</i>	Polymeraza của kháng nguyên O	protein màng [<i>E. Coli</i> 83972], YP_006106412, 94%
<i>wbbJ*</i>	O-axetyl transferaza	O-axetyl transferaza [<i>E. Coli</i> 83972], YP_006106411, 95%
<i>wbbK*</i>	Glycosyltransferaza (GT)	UDP-Glc:Rha-GlcNAc-UPP α -1,3-glucosyltransferaza [<i>E. Coli</i> K-12], AAB88407, 60%
<i>wbbL*</i>	Glucosyltransferaza (GT)	protein sinh tổng hợp lipopolysacarit, mảnh C-ter, protein bị cắt cụt [<i>E. Coli</i> DH1], YP_006129367, 62%; dTDP-Rha:GlcNAc-UPP α -1,3-

Tên gọi gen	Chức năng được giả định	Tính tương đồng/Protein [sinh vật] có nghĩa nhất, sự nhận biết đặc hiệu, độ đồng nhất tối đa (BLAST)
		rhamnosyltransferaza

Thành phần cụm *rfb* thể hiện sự khác nhau rất rõ đối với thành phần của cụm O25A. Các gen tại vị trí 5' của cụm là các gen rất tương đồng với nhau (*rmlD* đến *wzy*; *E.coli* E47a và 83972). Điều này là không bất ngờ đối với các gen *rml* mà tương đồng trong các chủng *E.coli* mà tổng hợp L-rhamnoza. Tính tương đồng của sản phẩm gen của O25A và B đạt được trong gen *wecC* (O25A), trước khi giảm đến mức thấp hơn 25 % tính đồng nhất, cho thấy sự không liên quan của các trình tự protein. Xem Fig.3B. Ngoài ra, có thể xác định được rằng các gen sinh tổng hợp UDP-N-acetylfucosamin của O25A không có trong chủng upec138 (O25B), vì chúng là hai glycosyltransferaza sau *fnlABC*. Xem Fig.3B. Việc xem xét dữ liệu này cho phép xác định rằng chủng O25B không thể tổng hợp UDP-L-FucNAc, trừ việc gen sinh tổng hợp L-FucNAc có thể được mã hóa bên ngoài cụm *rfb*. Tuy nhiên, không có bất kỳ trường hợp nào được ghi nhận cho vị trí *fnlABC* bên ngoài cụm *rfb* khi L-FucNAc có trong BRU của kháng nguyên O. Do đó rất ít khả năng chủng 138 có thể tổng hợp đơn vị lặp lại cơ sở O25A đã biết (BRU).

Gen được xác định trong cụm *rfb* của O25B mà không có trong cụm *rfb* có kiểu huyết thanh O25A mã hóa hai glycosyltransferaza và *O*-axetyltransferaza. Ba gen này có cùng một tổ chức và protein được mã hóa có tính tương đồng cao với gen *wbbJKL* được xác định và được mô tả trong chủng K-12 của *E.coli* có kiểu gen cụm O16 *rfb*. Xem Fig.3B. Theo sự liên quan về gen giữa các kiểu huyết thanh O25B và O16, danh pháp của gen O16 *rfb*, *wbbJKL*, được sử dụng cho gen tương đồng được xác định trong cụm *rfb* của O25B.

Cấu trúc của O16 BRU đã biết và gen chức năng của *wbbJKL* đã được xác định. Xem Steveneson et al., (1994) J Bacteriol. 176(13):4144-56. WbbJKL chịu trách nhiệm cho quá trình axetyl hóa của L-Rhamnoza, chuyển nhóm D-Glc đến L-Rha-D-Glc-UndPP, và chuyển L-Rha đến D-GlcNAc-UPP, mà được tạo ra bằng *wecA* từ cụm ECA. Phụ thuộc vào tính tương đồng với O16 WbbJKL, và chức

năng đã biết của O16 WbbJKL, cụm *rfb* của O25B được cho là tổng hợp cấu trúc chứa một phần thành phần của O16 cùng với O25A. Có lý do để cho rằng WbbJKL_{O25B} tổng hợp cùng một cấu trúc với WbbJKL_{O16}, cụ thể hơn α -D-Glc-1,3- α -L-Rha(2Ac)-1,3- α -D-GlcNAc. Cấu trúc trisacarit này giống với bộ khung “chính” không phân nhánh của O25A chỉ khác ở chỗ L-Rha(2Ac) thay thế cho L-FucNAc. Do đó, việc thay thế này sẽ là việc thay thế bảo toàn, vì cả hai D-FucNAc và L-RhaOAc đều là monosacarit với chức năng 6-deoxy và 2-axetyl. Sự khác nhau duy nhất là hình thể, vì fucoza liên quan đến galactoza, và rhamnoza đến mannoza, tạo ra sự định hướng khác nhau của nhóm OH ở vị trí 3 và nhóm methyl ở vị trí 5. Liên kết giữa monosacarit cũng giống nhau (đều là α -1,3), cho thấy rằng các cấu trúc sẽ tương tự về hình dạng và đặc tính hóa học. Tương tự, protein được mã hóa trong phần trước của cụm *rfb* của O25A và B (*rmlDCAB* và *wekAB*) phân nhánh BRU của O25A hoặc B bằng liên kết D-Glc và L-Rha phân nhánh với trisacarit của bộ khung “chính” bất kỳ. Điều này nghĩa là chúng chấp nhận bộ khung (với L-FucNAc hoặc L-Rha(2Ac)) làm cơ chất.

Sự có mặt của L-Rha làm monosacarit thứ hai từ đầu cuối khử của O25B BRU là nguyên nhân cho quá trình sinh tổng hợp L-FucNAc có thể không xảy ra trong O25B. UDP-L-FucNAc là không cần thiết, vì nó được thay thế bằng gen sinh tổng hợp dTDP-L-Rha mà có trong đầu cuối 5' của cụm này (*rmlDBAC*).

Tài liệu Phan *et al.*, 2013 mô tả quá trình phân tích gen tương tự trên mẫu phân lập lâm sàng O25B, nhưng đưa ra các kết luận khác nhau. Ngoài ra, toàn bộ hệ gen còn được xác định trình tự để nghiên cứu cho cụm gen sinh tổng hợp UDP-FucNAc; tuy nhiên, các tác giả này cho rằng không có bộ máy cho UDP-L-FucNAc trong chủng O25B:H4 ST131 EC958 không chỉ trong cụm *rfb* của O25B, mà còn trong toàn bộ chủng này. Tuy nhiên, Phan đưa ra kết luận rằng UDP-L-FucNAc phải được tổng hợp theo cách khác, với giả thiết rằng O25B:H4 ST131 EC958 tạo ra cùng cấu trúc kháng nguyên O như E47a, cụ thể hơn, O25A. Ngược lại, trường hợp hay gặp nhất theo sáng chế là chủng O25B không thể tạo ra L-FucNAc, nhưng thay vào đó, thay thế cho gốc thứ hai của BRU bằng gốc của L-rhamnoza được O-axetyl hóa, và các gen cần thiết cho sự biến đổi này chỉ được mã hóa trong cụm *rfb*.

Ngoài ra, sự có mặt của enzym *O*-axetyl transferaza tương đồng trong cụm O25B cho phép xác định quá trình *O*-axetyl hóa trong O25B BRU, sự biến đổi không có trong O25A. Do đó, có thể xác định được rằng cấu trúc của kháng nguyên O25 từ các kiểu huyết thanh O25A và O25B là khác nhau.

Phân tích cấu trúc O25B

Để xác định giả thiết về sự khác nhau trong cấu trúc kháng nguyên O25, thành phần hóa học và sự sắp xếp của các kháng nguyên O của mẫu phân lập lâm sàng O25 được mô tả trong ví dụ 1 được phân tích. Để xác định đặc trưng cấu trúc O25 OPS một cách cụ thể hơn, một số phương pháp được sử dụng.

Đầu tiên, cấu trúc kháng nguyên O được phân tích bằng SDS PAGE. Lipopolysaccharit (LPS) từ mẫu phân lập lâm sàng được phân tích về sự khác nhau về độ linh động điện di bằng cách sử dụng phương pháp nhuộm màu khác nhau, sau đó SDS PAGE. Để hiển thị hóa lượng LPS, phương pháp nhuộm bằng bạc và phương pháp Western Blot đặc hiệu kháng O25 được thực hiện. Xem Fig.5, mô tả kết quả của quá trình phân tích 10 mẫu phân lập. Dữ liệu cho thấy rằng cường độ tín hiệu tương tự thu được bằng phương pháp nhuộm bằng bạc của mẫu LPS khác nhau. Trái lại, việc lấy mẫu thăm dò với huyết thanh miễn dịch đặc hiệu cho thấy cường độ tín hiệu mạnh hơn trong 3 trong số 10 mẫu (các mẫu phân lập upec436, upec767, upec827). Điều này được cho là do có sự khác nhau về cường độ tín hiệu do sự khác nhau trong cấu trúc của OPS.

Để làm sáng tỏ cấu trúc O25B một cách chi tiết, phương pháp phân tích khác nhau được thực hiện. Mẫu phân lập lâm sàng upec138 dương tính với O25B bằng PCR, và có sự nhận dạng kém hơn bằng huyết thanh miễn dịch ngưng kết O25 so với chủng O25A. Xem Fig.5. Ngoài ra, chủng ESBL, nhưng nhạy với FOS, IPM, và TZP, và đề kháng với AM, CXM, NOR, và CIP. Mẫu phân lập lâm sàng khác, chủng upec436, âm tính với O25B bằng PCR, nhưng dương tính với O25 (O25A) bằng PCR. Ngoài ra, upec436 được xác định là phản ứng mạnh với huyết thanh miễn dịch ngưng kết O25 khi LPS của nó được phân tích bằng phương pháp Western Blot. Xem Fig.5. LLO từ hai chủng được chiết tách, được đánh dấu bằng 2AB và được phân tích bằng HPLC pha thường. Xem Fig.6; LLO của upec138 và upec436, 9,079 và 9,081). Mô hình rửa giải cho thấy sự khác nhau rất rõ giữa hai

phần chiết. Phân tích MS/MS đỉnh đặc trưng cho chủng được phát hiện các tín hiệu phù hợp với cấu trúc BRU mong muốn.

Các tín hiệu trong chủng upec436 (9,081): đỉnh ở thời điểm rửa giải 62 phút được phân tích bằng MS và được xác định là chứa khối lượng chính, phân tử với $m/z=1021$ Da, cụ thể hơn, phân tử tương ứng với khối lượng mong muốn của O25A OPS BRU hoàn chỉnh. MS/MS tạo ra mô hình phân mảnh phù hợp với trình tự monosacarit của O25A (Fig.7A; MS/MS có $m/z=1021$).

Các tín hiệu trong chủng upec138: khối lượng chính trong đỉnh tại thời điểm rửa giải 50 phút với m/z là 1022 Da, cụ thể hơn, một Da nhiều hơn đơn vị lặp lại O25A hoàn chỉnh. Phân tích MS/MS (Fig.7B; O25B MS/MS) cho thấy mô hình phân mảnh gần giống với đơn vị lặp lại O25A, và tạo ra sự chênh lệch 1 Da đối với monosacarit thứ hai từ đầu cuối khứ (được xác định bằng phân mảnh ion Y có $m/z=551$ trong O25A MS/MS, và $m/z=552$ trong chủng upec138). Đỉnh khác rửa giải ở 60 phút cho thấy phân mảnh tương tự, nhưng sự chênh lệch 42 Da về khối lượng ion gốc ($m/z=980$) mà tạo ra cho cùng một monosacarit ($m/z=510$), cụ thể hơn monosacarit thứ hai từ đầu cuối khứ. Việc giải thích cho các kết quả này được mô tả sau đây.

Việc chiết OPS, thủy phân và đánh dấu 2AB bao gồm việc xử lý bằng axit để loại bỏ Und-PP từ OPS. Có thể thấy rằng điều kiện xử lý ngăn ngừa một phần quá trình O-axetyl hóa, nhưng không ảnh hưởng đến quá trình N-axetyl hóa. Do đó, đỉnh ở 60 phút có thể là khối lượng BRU được deaxetyl hóa mà được tạo ra từ quá trình thủy phân hóa học của thành phần trong đỉnh ở 50 phút. Khi được xem xét cùng nhau, dữ liệu này cho thấy rằng có quá trình O-axetyl hóa trong O25B ở cùng một vị trí monosacarit vì có quá trình N-axetyl hóa trong L-FucNAc của O25A.

Để xác định bằng phương pháp hóa học rằng quá trình axetyl hóa ở gốc thứ hai từ đầu cuối khứ được liên kết thông qua O, thử nghiệm deaxetyl hóa được thực hiện. Đỉnh đặc hiệu O25B từ 2AB LLO HPLC tại thời điểm rửa giải 50 phút thu được từ chủng dương tính với O25B PCR và được xử lý bằng kiềm được mô tả trong mục “Phương pháp”. Việc phân tích lại bằng HPLC tạo ra đỉnh ở thời điểm rửa giải 60 phút như được xác định trong đỉnh O25B từ Fig.6, chứa khối lượng chính có $m/z=979$, với mô hình phân mảnh ion MS/MS phù hợp với O25B BRU

mà mất nhóm *O*-axetyl của nó. Nhóm *N*-axetyl ổn định với việc xử lý bằng kiềm như được thể hiện bởi việc bảo toàn nhóm *N*-axetyl trong đầu cuối khử D-GlcNAc trong cùng một phân tử.

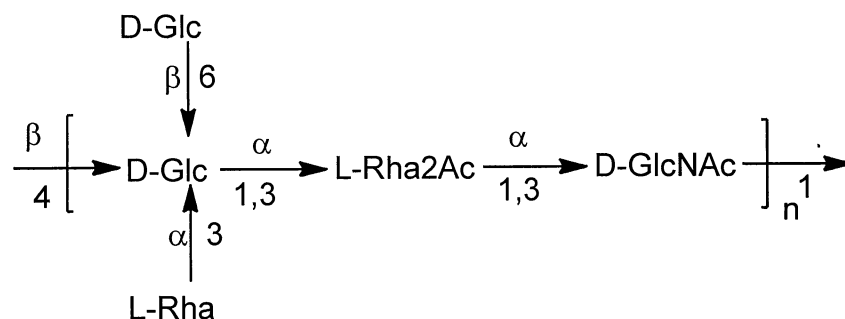
Tóm lại, có thể xác định được rằng chủng tiêu biểu O25B upec138 có liên quan về mặt kiểu gen và cấu trúc với O25A và O16 OPS (Fig.3A và B) từ *E. coli*. O25B khác so với O25A ở chỗ có cấu trúc đơn vị lặp lại chứa nhóm *O*-axetyl thay cho nhóm *N*-axetyl ở monosacarit thứ hai của đơn vị lặp lại, mà là gốc L-Rha và không phải là D-FucNAc. Các sự thay đổi này chủ yếu gây ra bởi sự thay thế bộ máy sinh tổng hợp UDP-FucNAc và D-FucNAc transferaza bằng đoạn kéo dài ADN mã hóa hai enzym glycosyltransferaza và *O*-axetyltransferaza. Các gen này liên quan đến cụm gen O16, trên cơ sở phân tích về tính tương đồng và chức năng. Cấu trúc cuối là khác, nhưng tương tự, điều này giải thích cho hoạt tính phản ứng chéo được quan sát với huyết thanh miễn dịch ngưng kết O25.

Như được mô tả trên đây, có thể kết luận và đưa ra đề xuất trên cơ sở quá trình phân tích cụm *rfb* của chúng rằng O25A OPS chứa L-FucNAc, ngược lại cấu trúc này không có trong O25B. Để nghiên cứu nếu FucNAc không có trong O25B, quá trình phân tích thành phần monosacarit của EPA phức hợp sinh học được tạo ra trong chủng O25A và O25B được thực hiện (Fig.9) bằng cách sử dụng phương pháp đánh dấu bằng PMP và phương pháp phân tích HPLC được mô tả trên đây. Để tạo ra phức hợp sinh học, các mẫu phân lập *E.coli* lâm sàng với các kiểu hình O25A và O25B được tạo ra, và được biến đổi để làm tối ưu hóa quá trình sản xuất phức hợp sinh học. Đối với một phần của sự biến đổi, gen *waaL* từ chủng upec_436 (O25A) và upec_138 (O25B) được loại bỏ như được mô tả trên đây (xem, Datsenko and Wanner, (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97, 6640-6645) được xác định bằng phương pháp dùng để xác định kiểu lỗi (xem, Amor, et al., (2000) Infect Immun 68, 1116-1124). Chủng tạo thành được biến đổi bằng plasmit biểu hiện cho 4S-EPA (pGVXN659) và oligosacaryl transferaza, PglB (pGVXN939), để sản xuất O25A; và với pGVXN114 và pGVXN539 (tạo ra 2S-EPA) dùng cho quá trình sản xuất phức hợp sinh học O25B. Phức hợp sinh học O25B được tạo ra trong bình lắc dung tích 2L với quá trình tinh chế ái lực được thực hiện sau đó từ các phần chiết chu chất bằng IMAC. Phức hợp O25A được tạo ra bởi quá trình lên men có bổ

sung cơ chất, và được tinh chế bằng quá trình tinh chế hai bước bắt đầu từ toàn bộ dịch tế bào đồng nhất được làm sạch được tạo ra bằng quá trình làm đồng nhất ở áp suất cao như được mô tả trong phương pháp trên đây. Quá trình phân tích thành phần monosacarit được thực hiện như được mô tả trên đây.

Kết quả xác định sự vắng mặt của tín hiệu đối với FucNAc trong phức hợp sinh học thu được từ O25B, ngược lại phức hợp sinh học chứa O25A cho thấy đỉnh ở thời điểm rửa giải mong muốn như được xác định bằng cách cho hỗn hợp của monosacarit tham gia quá trình xử lý mẫu làm mẫu đối chứng. Do đó, có thể xác định được rằng cấu trúc giả định của O25B là, như mong muốn trên cơ sở quá trình phân tích cụm *rfb*, ít L-FucNAc.

Cấu trúc hoàn chỉnh của đơn vị lặp lại (RU) của polysacarit kháng nguyên O (O-PS) từ kháng nguyên O O25B của *Escherichia coli* được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng từ hạt nhân cho phức hợp sinh học sau khi được thủy phân một phần bằng enzym đối với gốc của protein mang EPA. Việc phân tích xác định được rằng O25B O-PS bao gồm pentasacarit RU. Các tín hiệu ^1H và ^{13}C được xác định bằng kỹ thuật tương quan 2D NMR, giúp xác định được rằng cấu trúc của O-PS RU của O25B khác so với cấu trúc O-PS RU của O25A đã biết (Kenne, L., et al. 1983, Carbohydr. Res. 122:249-256; Fundin, J., et al. 2003, Magn. Reson. Chem. 41:202-205) bằng cách thế gốc α -3-FucpNAc bằng gốc α -3-Rhap, với nhiều hơn 90% của gốc này được O-acetyl hóa ở vị trí C2. O-PS RU của O25B hoàn chỉnh có công thức sau đây (O25B'):



Quá trình sản xuất phức hợp sinh học và xác định đặc trưng

Để tiếp tục phân tích kháng nguyên polysacarit O25A và O25B, các phức hợp sinh học khác được tạo ra. Đối với O25A, mẽ được tinh chế của O25A-EPA

trên đây còn được sử dụng cho thử nghiệm xác định đặc trưng. Đối với quá trình sản xuất O25B-EPA, chủng với cụm O25B được kết hợp về hệ gen được tạo cấu trúc: W3110 $\Delta waaL$ $\Delta gtrABS$ $\Delta rfbO16::rfb(upec138)$, với plasmit pGVXN1076 và pGVXN970, Chủng này được tạo cấu trúc bắt đầu từ W3110 bằng phương pháp của Datsenko và Wanner và kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng cho việc hướng đích vào vị trí của các đoạn chèn lớn vào trong nhiễm sắc thể của vi khuẩn (xem, đơn quốc tế số PCT/EP2013/071328).

Phức hợp sinh học O25B thu được được mô tả bằng cách sử dụng thử nghiệm giải phóng và xác định đặc trưng chuẩn. Phức hợp sinh học được tinh chế bằng cách sử dụng quy trình hai bước liên tiếp trao đổi anion và sắc ký theo loại cỡ, tạo ra các mẫu phức hợp sinh học O25A và O25B tinh khiết 97,2 và 98,1 %. Kỹ thuật định lượng SDS PAGE được sử dụng cho phân tích độ tinh khiết. Xem Fig.10 (O25A) và Fig.11 (O25B). Tỷ lệ đường so với protein được xác định trên cơ sở lượng đường bằng thử nghiệm bằng antron (xem tài liệu, Laurentin and Edwards, (2003) Anal Biochem 315, 143-145) và thử nghiệm BCA xác định nồng độ protein, tạo ra các phức hợp sinh học O25A và O25B với tỷ lệ 40,2 và 26,6 %. Sắc ký phân tích theo loại cỡ cho thấy trạng thái monome của các hạt phù hợp với bán kính thủy động học mong muốn của EPA với mạch polysacarit đính kèm.

Ứng dụng

Để xác định khả năng gây miễn dịch của cấu trúc O25B, một số thử nghiệm tiền lâm sàng bằng cách sử dụng phức hợp sinh học O25A và O25B được thực hiện. Như được thể hiện trong Fig.5, tất cả mẫu phân lập lâm sàng được xác định là dương tính với O25 trong ví dụ 1 (cụ thể hơn, cả hai mẫu phân lập O25A và O25B) dương tính với huyết thanh miễn dịch O25A thường được sử dụng để phát hiện các kiểu huyết thanh O25 (huyết thanh phân giải từ chủng O25A E47a) trong phương pháp Western Blot. Do đó, huyết thanh miễn dịch kháng O25A được cho là có hoạt tính chéo với LPS từ chủng O25B. Để phân tích đáp ứng kháng thể và hoạt tính chéo một cách chi tiết, phức hợp sinh học O25 được tạo ra. Protein gắn kết maltoza (MBP) được sử dụng làm protein mang, và protein mang được liên kết với O25A hoặc O25B. Bảng 4 mô tả chủng được sử dụng cho quá trình sản xuất protein. Được sử dụng chủng được xác định bằng PCR cho kiểu gen O25A hoặc B của

chúng. Sự biểu hiện được thực hiện trong môi trường TB và sản phẩm protein được tinh chế từ các phần chiết chu chất.

Bảng 4

Phức hợp sinh học	Chủng	Plasmid pglB	Plasmid chất mang	Quá trình tinh chế
MBP-O25A	upec436 <i>ΔwaaL::kanR</i>	pGVXN939	pGVXN659	Q, A
MBP-O25B	upec350 <i>ΔwaaL::clmR</i>	pGVXN939	pGVXN659	Q, A, S

Q: Quá trình tinh chế nguồn Q; A: Nhựa amyloza; S: Sắc ký theo loại cỡ

Việc tạo miễn dịch bằng cách sử dụng phức hợp sinh học thu được được thực hiện bằng cách sử dụng quy trình chuẩn tạo miễn dịch trên thỏ (quy trình nhanh trong 28 ngày Eurogentech). 50μg của polysaccharit được liên kết với MBP, được phun ở ngày 0, 7, 8, và 18 với hợp chất kích thích miễn dịch không Freund độc quyền. Huyết thanh miễn dịch trong máu cuối tạo thành thu được ở ngày 28 sau khi được tạo miễn dịch lần đầu được kiểm tra về độ đặc hiệu của chúng đối với LPS của O25A hoặc O25B. Fig.22 thể hiện sự so sánh về hoạt tính phản ứng của huyết thanh miễn dịch đối với LPS tương ứng (O25A hoặc O25B). LPS được tạo ra từ upec436 và upec138 bằng quá trình thủy phân proteinaza K đối với toàn bộ các mẫu tế bào trong dung dịch đệm SDS-PAGE Lämmli. Cùng một lượng của LPS được tải trong hai gel SDS-PAGE, sau đó điện di đến màng nitroxenluloza và phát hiện bằng cách sử dụng huyết thanh miễn dịch O25A và O25B. Kết quả cho thấy rằng huyết thanh miễn dịch O25A phát hiện LPS của O25A tốt hơn LPS của O25B, trong khi đó huyết thanh miễn dịch O25B phát hiện LPS của O25B tốt hơn LPS của O25A. Kết quả này cho thấy rằng kháng nguyên tự thân tạo ra kháng nguyên tốt hơn. Do đó, sử dụng kháng nguyên O25B vào trong vacxin sẽ tạo ra sự bảo vệ tốt hơn chống lại chủng lâm sàng O25B chiếm ưu thế trong nhóm O25 so với kháng nguyên O25A.

Ví dụ 3: O1 của *E.coli*

Dữ liệu cấu trúc mô tả các cấu trúc kiểu huyết thanh phụ khác nhau đối với O1 của *E. coli*. Cụ thể, O1A, O1A1, O1B, O1C. O1A và O1A1 là giống nhau về mặt cấu trúc và được cho là có liên quan đến bệnh, mặc dù O1B và C không được ghi nhận có khả năng gây bệnh (xem, Gupta, et al., (1992) J Bacteriol 174, 7963-7970), và chiếm lượng nhỏ trong số mẫu phân lập O1. Cấu trúc của O1A/O1A1, O1B, và O1C thể hiện trong Fig.12B. Để phân tích sự phân bố kiểu huyết thanh phụ O1 trong nghiên cứu dịch tễ học UPEC của ví dụ 1, cấu trúc kháng nguyên O của một số mẫu phân lập lâm sàng từ nghiên cứu được phân tích một cách chi tiết. Đầu tiên, cấu trúc LPS của 12 chủng được xác định là dương tính với O1 bằng thử nghiệm ngưng kết được phân tích bằng SDS PAGE. Xem Fig.13: sự nhuộm O1 bằng bạc và phương pháp Western Blot.

Sự nhuộm bằng bạc cho thấy các tín hiệu LPS tiêu biểu trong tất cả các làn chứa các phần chiết từ mẫu phân lập lâm sàng O1. Việc nhuộm màu mạnh ở độ linh động điện di khoảng 10-15 kDa cho thấy lõi lipit, và tín hiệu dạng bậc thang như các tín hiệu với độ linh động chậm hơn là lõi lipit được biến đổi bằng polyme hydrat cacbon bao gồm số lượng khác nhau của các đơn vị lặp lại kháng nguyên O. Khi LPS từ các mẫu phân lập khác nhau được so sánh, sự khác nhau là trong sự phân bố về loại chiều dài, độ linh động điện di có các dải riêng, và mẫu tín hiệu dạng bậc thang. Trên cơ sở các quan sát này, ba nhóm có thể được xác định: (i) hầu hết các mẫu phân lập (upec002, upec010, upec032, upec140, upec108, upec143, upec276, upec399, và upec425) có độ linh động điện di có các dải riêng không thể phân biệt được, khác nhau duy nhất là về cường độ tín hiệu và độ dài mạch trung bình (sự phân bố về loại chiều dài); (ii) hai mẫu phân lập (upec119 và upec256) dường như có độ linh động nhanh hơn một chút trong mỗi dải LPS của đơn vị lặp lại, điều này cho thấy cấu trúc khác, ví dụ sự biến đổi khác của lõi lipit; và (iii) các tín hiệu thu được từ mẫu phân lập upec1096 dường như là vết mà không phải là tín hiệu dạng bậc thang, cho thấy cấu trúc OPS khác. Xem Fig.13A.

Phân tích bằng phương pháp Western Blot và phát hiện bằng cách sử dụng huyết thanh miễn dịch kháng O1 cho thấy rằng LPS từ tất cả mẫu nhưng chỉ upec1096 được phát hiện bằng kháng thể O1 đặc hiệu, điều này cho thấy phân tử LPS có hoạt tính chéo. Điều này nghĩa là 11 trong số các mẫu phân lập là O1, và

upec1096 hầu như không phải là mẫu phân lập O1 (cụ thể hơn, nó không dương tính bằng thử nghiệm ngưng kết).

Để phân tích độ tương đồng về cấu trúc của các kháng nguyên O1 một cách chi tiết, việc đánh dấu 2AB của LLO và kỹ thuật HPLC pha thường phân giải cao được sử dụng như được mô tả trên đây. Fig.14A thể hiện sự chồng lấp thu được từ 5 trong số 11 mẫu phân lập lâm sàng. Vùng lấy vết của OPS dường như ở thời gian lưu trú là 110 đến 150 phút. Profin cho thấy rằng tất cả các mẫu có các tín hiệu dường như ở cùng một thời gian lưu trú, cho thấy cấu trúc phân tử là giống nhau. Sự khác nhau được quan sát là sự phân bố về cường độ, cụ thể hơn thời gian rửa giải của cường độ tín hiệu trung bình tối đa và cường độ tín hiệu chung. 6 phần chiết còn lại tạo ra các đỉnh ở cùng một thời gian rửa giải với sự khác nhau về cường độ. Duy nhất mẫu upec1096 là khác về mẫu hình đỉnh, giúp xác định sự khác nhau về cấu trúc như được lưu ý trên đây.

Quá trình phân tích MS/MS đối với thành phần mỗi đỉnh bằng phân tích MALDI-TOF/TOF được sử dụng để xác định trình tự của monosacarit trong các mẫu O1 (xem, Fig.14B). Quá trình phân tích MS được thực hiện cho các mẫu được chiết tách không phải từ mẫu phân lập lâm sàng mà từ chủng W3110 $\Delta waaL$ chứa cosmit với cụm *rfb* của upec032, các đỉnh rửa giải ở thời gian rửa giải 50, 80, 96, và 108 phút chứa khối lượng chính có $m/z=1021,4$, $1849,6$, $2693,9$, $3540,4$. Các phân mảnh ion thu được sau MS/MS phù hợp với 1, 2, 3, và 4 đơn vị lặp lại của HexNAc, ba deoxyhexoza, và HexNAc phân nhánh. Dữ liệu này chỉ có thể được giải thích bằng cấu trúc kiểu huyết thanh phụ O1A. Các đỉnh được mô tả là OPS của O1 gắn với UPP trong mẫu phân lập lâm sàng, và mỗi đỉnh sau đó khác với đỉnh trước đó bởi một đơn vị lặp lại.

Dữ liệu này khẳng định lại thông tin từ các tài liệu chuyên ngành rằng cấu trúc tiêu biểu cho kiểu huyết thanh O O1 của *E.coli* trong các mẫu phân lập UTI lâm sàng từ nghiên cứu được mô tả trong ví dụ 1 là kiểu phụ O1A.

Để tạo ra phức hợp sinh học mang O1A polysacarit, chủng W3110 *E.coli* được biến đổi để biểu hiện OPS của O1A. Chủng tạo thành W3110 $\Delta rfbO16::rfbO1 \Delta waaL$, chứa cụm *rfb* của mẫu phân lập lâm sàng dương tính với O1 (GU299791*, cụm nằm giữa *rmlB*-*wekO*). OPS của O1A biểu hiện chủng vật chủ được tạo cấu

trúc bằng quá trình tái tổ hợp tương đồng. Cụm *rfb* của mẫu phân lập lâm sàng O1A được khuếch đại bằng cách sử dụng oligonucleotit PCR bắt cặp trong ADN liền kề cụm *rfb*. Sau đó, ADN được khuếch đại được sử dụng để thay thế cho cụm kháng nguyên O nội sinh của chủng thí nghiệm W3110 bằng quá trình tái tổ hợp tương đồng được mô tả trong đơn quốc tế số PCT/EP2013/071328, plasmid biểu hiện cho protein mang pGVXN659 và cho PglB (pGVXN114, 939, 970, 971) được chèn bằng quá trình biến nạp và sự biểu hiện O1 được xác định (xem, Fig.15 và Fig.16).

Trong thử nghiệm khác, mẫu phân lập O1 lâm sàng upec032 được biến đổi để tạo ra phức hợp sinh học. Việc biến đổi cần kiểu hình nhạy kháng sinh của mẫu phân lập lâm sàng. upec032 $\Delta waaL$ được tạo cấu trúc và được biến đổi bằng pGVXN939 và pGVXN579 để sản xuất phức hợp sinh học bằng cách sử dụng MBP làm protein mang. Ưu điểm của sử dụng MBP và EPA làm protein mang là khả năng tạo ra huyết thanh miễn dịch mà có hoạt tính chéo đối với thành phần polysaccharit mà không phải là chất mang. Huyết thanh miễn dịch này là công cụ hữu ích để đánh giá thử nghiệm tiền lâm sàng, ví dụ, làm chất phủ để phát triển thử nghiệm ELISA đặc hiệu polysaccharit.

Ví dụ 4: O6 của *E. coli*

Kiểu huyết thanh O6 của *E.coli* là ExPEC hay gặp nhất được ghi nhận đến nay (George, D. B., and Manges, A. R. (2010) *Epidemiol Infect* 138, 1679-1690). Không những nghiên cứu được mô tả trong ví dụ 1, mà dữ liệu còn được thu gom từ tài liệu chuyên ngành giúp xác định rằng kiểu huyết thanh O6 trong số bốn kiểu huyết thanh hay gặp nhất trong các ExPEC gây ra sự biểu hiện (xem, Fig.4).

Hai cấu trúc của OPS của O6 đã được ghi nhận trong tài liệu chuyên ngành (xem, Jann et al., *Carbohydr. Res.* 263 (1994) 217-225, và Jansson et al., *Carbohydr. Res.* 131 (1984) 277-283). Cấu trúc của các kháng nguyên O6 được ghi nhận thể hiện trong Fig.17B. Chúng là giống nhau chỉ khác ở monosaccharit phân nhánh của mỗi cấu trúc, mà là Glc hoặc GlcNAc. Tuy nhiên, tài liệu chuyên ngành không xác định cấu trúc O6 chiếm ưu thế trong mẫu phân lập lâm sàng tham gia vào UTI.

Để chọn lựa cấu trúc tiêu biểu nhất của kháng nguyên O6 dùng cho vacxin, cấu trúc OPS của các mẫu phân lập *E.coli* lâm sàng dương tính (đáp ứng) với sự ngưng kết O6 từ nghiên cứu của ví dụ 1 được nghiên cứu bằng cách sử dụng cùng một phương pháp như được mô tả trên đây cho các kiểu huyết thanh O1. Sự nhuộm bằng bạc và phương pháp Western Blot bằng cách sử dụng huyết thanh miễn dịch kháng O6 xác định được một trong số 12 mẫu phân lập lâm sàng không đáp ứng với huyết thanh kháng O6, mặc dù LPS được nhuộm bằng bạc trong tất cả các mẫu (không được thể hiện), điều này cho thấy kết quả không đáp ứng với sự ngưng kết. Tuy nhiên, có khả năng là sự khác nhau về Glc hoặc GlcNAc sẽ không thể phát hiện bằng sự thay đổi về độ linh động điện di trên gel.

Để phân tích cấu trúc chi tiết hơn, phương pháp lấy dầu LLO được sử dụng. Để làm tham chiếu cho hai cấu trúc được ghi nhận, các phần chiết từ chủng với Glc (CCUG11309) và GlcNAc (CCUG11311) phân nhánh được ghi nhận được cho tham gia trong việc phân tích. Việc so sánh hai vết HPLC cho thấy các đỉnh rửa giải ở phút 70,8, 103,3, và 122,2 đối với các mẫu CCUG11309, và các đỉnh ở 68,8, 100,3, và 118,3 đối với các mẫu CCUG11311. Xem Fig.18A. Các đỉnh được phân tích bằng MS đối với khối lượng chính có trong các đỉnh và MS/MS đối với trình tự các monosacarit có các khối lượng chính này. Dữ liệu xác định cho phần chiết CCUG11311 thu được các đỉnh với $m/z=1094,4$, $2027,6$, và 2962 (MSO154), tương ứng với polyme có 1, 2, và 3 BRU được phân nhánh GlcNAc mong muốn. $M/z=1053,4$, $1945,7$, và $2836,9$ với Glc phân nhánh được xác định trên đây trong các phần chiết từ chủng W3110 biểu hiện cụm *rfb* của CFT được tạo dòng của mẫu phân lập lâm sàng O6, có thời gian rửa giải của đỉnh 2AB giống với CCUG11309 (MSO138). Khi sắc ký đồ thu được từ 12 mẫu phân lập lâm sàng được so sánh với chủng đối chứng, 11 tín hiệu chứa các đỉnh cho thấy OPS của O6 với gốc Glc phân nhánh. Năm trong số 11 sắc ký đồ được thể hiện trong Fig.18B. Một mẫu không tạo ra các tín hiệu ở thời gian rửa giải đặc hiệu O6 không phải là O6, cụ thể hơn hầu hết không đáp ứng với thử nghiệm ngưng kết. Do đó, OPS của O6 với nhánh Glc (Fig.17B, phần đỉnh) là cấu trúc tiêu biểu nhất trong số các kiểu huyết thanh O6 được phân lập từ nghiên cứu dịch tễ học được mô tả trong ví dụ 1.

Để tạo ra phức hợp sinh học mang polysacarit O6Glc, chủng *E.coli* W3110 được biến đổi để biểu hiện OPS của O6 bằng cách thay thế cụm W3110 *rfb* bằng cụm *rfb* từ chủng CCUG11309, xem các bảng 7 và 13. Chủng tạo thành W3110 $\Delta rfbO16::rfbCCUG11309 \Delta waaL$, chứa cụm *rfb* của chủng *E.coli* dương tính với O6 với nhánh Glv được ghi nhận trong BRU (xem, phần mô tả trên đây). Chủng vật chủ biểu hiện O6Glc OPS được tạo cấu trúc bằng quá trình tái tổ hợp tương đồng. Cụm *rfb* được khuếch đại bằng cách sử dụng oligonucleotit PCR bắt cặp trong ADN liền kề cụm *rfb*. Sau đó, ADN được khuếch đại được sử dụng để thay thế cho cụm kháng nguyên O nội sinh của chủng thí nghiệm W3110 bằng quá trình tái tổ hợp tương đồng được mô tả trong đơn quốc tế số PCT/EP2013/071328. Plasmid biểu hiện cho protein mang và cho PglB được chèn bằng quá trình biến nạp và sự biểu hiện của OPS mong muốn trên EPA xác định bằng phương pháp Western Blot.

Ví dụ 5: O2 của *E. coli*

Cấu trúc đơn vị lặp lại của polysacarit O2 là đã biết từ năm 1987 (Jansson, et al., (1987) Carbohydrate research 161, 273-279). Cấu trúc này được thể hiện trong Fig.19B. Hai trình tự cụm gen kháng nguyên O O2 có sẵn từ cơ sở dữ liệu công cộng (Ngân hàng dữ liệu gen Genbank EU549863 và GU299792). Việc phân tích so sánh đã được thực hiện và hoạt tính của glycosyltransferaza được đề xuất (bảng 5; Fratamico et al., 2010, Canadian journal of microbiology 56, 308-316; và Li, et al., (2010) J Microbiol Methods 82, 71-77).

Bảng 5. Giả định cụm gen kháng nguyên O O2 từ cụm *rfb* như được công bố bởi Li và cộng sự cũng như Fratamico và cộng sự được thể hiện trong dấu ngoặc.

Tên gọi gen	Chức năng được giả định	Tính tương đồng/Protein [sinh vật] có nghĩa nhất, sự nhận biết đặc hiệu, độ đồng nhất tối đa (BLAST)
<i>rmlB</i>	dTDP-Glucoza 4,6-dehydrataza	dTDP-Glucoza 4,6-dehydrataza (<i>E. Coli</i> IAI39), YP_002406996,1, 98%
<i>rmlD</i>	dTDP-6-Deoxy-D-Glucoza 3,5-epimeraza	dTDP-6-Deoxy-L-manozadehydrogenaza (<i>E. Coli</i>), ACA24825,1, 97%
<i>rmlA</i>	Glucoza-1-phosphat	Glucoza-1-phosphat

Tên gọi gen	Chức năng được giả định	Tính tương đồng/Protein [sinh vật] có nghĩa nhất, sự nhận biết đặc hiệu, độ đồng nhất tối đa (BLAST)
	thymidyltransferaza	thymidyltransferaza (<i>E. Coli</i> IAI39), YP_002406998,1, 99%
<i>fdtA</i>	NDP-hexoza isomeraza	NDP-hexoza isomeraza (<i>Yersinia intermedia</i> ATCC 29909), ZP_04635116,1, 67%
<i>fdtC</i>	Protein giống WxcM	Protein giả định PROVRETT_01740 (<i>Providencia rettgeri</i> DSM 1131), ZP_03638653,1, 71%
<i>fdtB</i>	Aminotransferaza	Protein WblQ (<i>Photobacterium luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> TTO1), NP_931971,1, 65%
<i>Wzx</i>	Flippaza của kháng nguyên O	Protein sinh tổng hợp polysacarit (<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> PC1), YP_003016888,1, 50%
<i>wekP</i> (<i>wegQ</i>)	Glycosyltransferaza (GT)	Protein giả định FIC_01940 (<i>Flavobacteriaceae bacterium</i> 3519-10), YP_003096444,1, 29%
<i>rmlC</i>	dTDP-4-dehydrorhamnoza 3,5-epimeraza	RmlC (<i>E. Coli</i>), ACA24796,1, 70%
<i>Wzy</i>	Polymeraza của kháng nguyên O	Protein giả định Gura_3055 (<i>Geobacter uraniireducens</i> Rf4), YP_001231799,1, 26%
<i>wekQ</i> (<i>wegR</i>)	Glycosyltransferaza	Glycosyl transferaza, giả định, gt2D (<i>Cellvibrio japonicus</i> Ueda107), ref YP_001983904,1, 31%
<i>wekR</i>	Glycosyltransferaza	Glycosyl transferaza, nhóm 1

Tên gọi gen	Chức năng được giả định	Tính tương đồng/Protein [sinh vật] có nghĩa nhất, sự nhận biết đặc hiệu, độ đồng nhất tối đa (BLAST)
		(<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400), YP_751504,1, 57%
<i>wekS</i> (<i>wegW</i>)	Sulfataza	Protein sulfataza xuyên màng giả định (<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a), YP_001970541,1, 39%

Sự so sánh về cấu trúc và độ tương đồng gen cho thấy rằng tất cả các chức năng cho quá trình sinh tổng hợp của polyme có:

rmlBDAC mã hóa enzyme cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp của dTDP-L-Rhamnoza, mà là cơ chất cho việc bổ sung L-Rha cho bộ khung bằng glycosyltransferaza *wekPOR*;

fdtABC tạo ra dTDP-D-Fuc3NAC cho glycosyltransferaza tạo nhánh;

sự tương đồng *wzy* và *wzx* chịu trách nhiệm cho việc đảo ngược của đơn vị lắp lại liên kết với Und-PP từ tế bào chất đến chu chất; và

wekPOR, là glycosyltransferaza giả định, và được cho là tạo ra liên kết glycosit của BRU của O2 (ba L-Rha và một L-FucNAc).

Gen *wekS* được xác định trong trình tự cụm *rfb* của O2 là sulfataza liên kết màng giả định, và do đó hầu như không tham gia vào sự tạo thành BRU. Điều này nghĩa là - nếu giả định nguyên tắc một enzyme một liên kết - thì một enzyme trong số nhóm của *wekPOR* phải có hai chức năng để tạo ra bốn liên kết glycosit.

Nguyên tắc một enzyme – một liên kết này không tuyệt đối được thể hiện trong các ví dụ trong đó số glycosyltransferaza là ít hơn số liên kết, ví dụ, trong *Shigella flexneri* Y, *S. flexneri* 6, *C. jejuni*, và O1A của *E. coli*. Trong các ví dụ này, các glycosyltransferaza đa chức năng chịu trách nhiệm cho sự tạo thành của nhiều hơn một liên kết glucosit, chúng là “hai” hoặc “đa chức năng”. Do đó, nó là một monosacarit mà được bổ sung nhiều lần. Gốc rhamnoza được lắp lại – như được xác định trong kiểu huyết thanh O2 - thường liên quan đến enzyme đa chức năng này.

Do sự có mặt của các phần tử chuyển vị bị cắt đứt liên kế trình tự *wekS*, nên vị trí *wekS* được cho là được chèn vào trong cụm *rfb* bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN (xem, Fratamico et al., 2010, Canadian journal of microbiology 56, 308-316). Việc chèn thông qua chuyển vị của vị trí *wekS* cho thấy rằng quá trình sinh tổng hợp OPS của O2 quả thực xảy ra mà không có sự có mặt *wekS* trước đó, và do đó *wekS* sẽ không cần thiết cho việc tổng hợp polyme OPS của O2. Để khẳng định giả thiết này, sự tạo thành OPS của O2 được tái cấu trúc trong hệ biểu hiện tái tổ hợp nền bộ gen “sạch”, chứa cụm *rfb* của O2 mà không có gen *wekS*. Để thực hiện quá trình này, cụm kháng nguyên O từ chủng W3110 được thay thế bằng cụm *rfb* từ chủng dương tính với O2 upec116 không có DNA *wekS*. Sự thay thế nhiễm sắc thể này được thực hiện bằng quá trình tái tổ hợp tương đồng như được mô tả trong đơn quốc tế số PCT/EP2013/071328. Chủng tạo thành là W3110 $\Delta waaL \Delta rfb$ W3110::*rfb*O2 $\Delta wekS$. OPS được tạo ra và được phân tích bằng cách đánh dấu bằng 2AB và HPLC pha thường và phát hiện bằng huỳnh quang như được thực hiện cho OPS của O6 và O1A (xem, phần mô trên đây) và được phân tích bằng HPLC pha thường (Fig.21) và được so sánh với các tín hiệu từ chủng tự nhiên CCUG25. Phân tích tạo ra các đỉnh chồng lấp nằm trong khoảng từ thời gian rửa giải là 40 và 140 phút.

Việc phân tích MS cho các đỉnh phụ thuộc vào cụm *rfb*O2 cho thấy các khối lượng chính với cùng một sự chênh lệch trong số các đỉnh liên tiếp (cụ thể hơn, của duy nhất RU của O2).

Việc phân tích MS cho các phân tử thu được từ các đỉnh tương ứng được thực hiện để phân tích cấu trúc của OPS. Các đỉnh thu được ở phút 43,5, 73,1, 81,4 và 90 thu được từ chủng tự nhiên CCUG25 được chọn và được phân tích bằng MS và MS/MS. Khối lượng và các phân mảnh ion Y phù hợp với phân tử OPS của O2 có 1, 2 và 3 đơn vị lặp lại mong muốn được xác định ($m/z = 989,4$ (Fig.23), 1817,8, 2646,1, tất cả sản phẩm cộng Na^+).

Để xác định OPS của O2 từ mẫu phân lập lâm sàng, 12 dòng vô tính được phân tích đối với cấu trúc OPS như được mô tả trên đây cho kiểu huyết thanh O1. Đầu tiên, LPS được tạo ra được phân tích bằng phương pháp nhuộm bằng bạc và phương pháp Western Blot. Kết quả được mô tả trong Fig.20, tất cả các mẫu được

cho thấy mô hình dải dạng giống bậc thang với hai độ dài tín hiệu dạng bậc thang trung bình khác nhau rõ ràng. Huyết thanh miễn dịch kháng O2 được phát hiện trong tất cả các mẫu LPS, điều này cho thấy rằng kỹ thuật ngưng kết xác định một cách chính xác cho tất cả các mẫu phân lập đối với các kiểu huyết thanh O2.

Để tạo ra phức hợp sinh học mang O2 polysacarit, W3110 $\Delta waaL \Delta rfb$ W3110::*rfb*O2 $\Delta wekS$ được sử dụng. Plasmit biểu hiện cho protein mang và cho PglB được chèn bằng quá trình biến nạp và sự biểu hiện của OPS mong muốn trên EPA xác định bằng phương pháp Western Blot. Xem các bảng 7 và 13 và phần mô tả trên đây.

Ví dụ 6: Phân tích miễn dịch của các kháng nguyên O khác

Để đánh giá khả năng miễn dịch của phức hợp sinh học chứa polysacarit kháng nguyên chọn lọc, nghiên cứu tiền lâm sàng được thực hiện. Phức hợp sinh học O1A-EPA, O2-EPA, O6Glc-EPA và O25B-EPA được tạo ra, được tinh chế, và được mô tả như được mô tả trên đây và trong mục “Phương pháp”.

Bảng 6. Tóm tắt về nghiên cứu tiền lâm sàng trên chuột, bao gồm số lượng nhóm vaccin, kích cỡ nhóm, vaccin được sử dụng, và chỉ dẫn về lượng của mẫu vaccin

Nhóm	Đường tiêm	Số lượng động vật	Việc điều trị [0,2µg PS]	Độ tinh khiết/ %	Tỷ lệ S/P/ %	Chủng sản xuất/(Chủng/plasmit/pl asmit)
1	Trong cơ (i.m.)	8	O1-EPA ^{tetra-pool} [0,2µg PS]	97	22	upec032 $\Delta waaL::kanR$ / pGVXN939/ pGVXN659
4	i.m.	8	O2-EPA ^{tetra-pool} [0,2µg PS]	90	34	W3110 $\Delta rfb::rfb(upec116)(\Delta w$ $ekS) \Delta waaL::clmR$ /pGVXN939/ pGVXN659
7	i.m.	8	O6-EPA ^{tetra-pool} [0,2µg PS]	84	38	W3110 $\Delta wzzE-$ $wecG \Delta waaL \Delta wbbIJK$ $\Delta gtrS \Delta wzxOI6$ / pGVXN348/ pGVXN114/ pGVXN659
9	i.m.	8	O25B-EPA ^{tetra-pool} [0,2µg PS]	85	21	upec163 $\Delta waaL$ pGVXN112 /pGVXN659

Nhóm	Đường tiêm	Số lượng động vật	Việc điều trị [0,2µg PS]	Độ tinh khiết/ %	Tỷ lệ S/P/ %	Chủng sản xuất/(Chủng/plasmit/pl asmit)
10	i.m.	8	EPA ^{tetra}			W3110 $\Delta waaL/pGV\text{XN}659$
11	i.m.	8	TBS			
12	i.m.	8	O1+O2+O25B+O6- EPA ^{tetra} [0,2µg PS/mỗi động vật]	89*	29*	Hỗn hợp từ các mẻ trên đây

* giá trị tính toán được

Phức hợp sinh học được tinh chế được sử dụng để gây miễn dịch cho chuột cái Sprague Dawley 9 tuần tuổi. 100 µl dung dịch của cùng một liều được tiêm trong cơ (i.m.) ở ngày 1, 22, và 43 vào trong chuột mà được lấy máu ở giai đoạn cuối và được làm chết nhân đạo ở ngày 56.

Các nhóm chuột khác nhau được nhận các vacxin khác nhau: khác nhau về thành phần, chứa phức hợp sinh học ở dạng riêng rẽ hoặc kết hợp như được thể hiện trong bảng 6. Đĩa ELISA được phủ bằng LPS cùng nguồn gốc được tạo ra trong chủng dương tính với *waaL* được sử dụng để xác định khả năng gây miễn dịch theo độ chuẩn ELISA của huyết thanh chuột ở thời điểm lấy máu cuối là 56 ngày sau lần tiêm đầu tiên (Figs. 25-28). Khi được xem xét cùng nhau, khả năng gây miễn dịch đáng kể về mặt thống kê được quan sát cho tất cả nhóm được tạo chủng ngừa được so sánh với các mẫu đối chứng (dung dịch đệm TBS hoặc EPA không được glycosyl hóa). Do đó, phức hợp sinh học được chọn lọc và tạo ra hợp chất có khả năng hữu dụng làm vacxin.

Đối với việc tất cả các phức hợp O-kháng nguyên EPA được kiểm tra, khả năng gây miễn dịch đáng kể về mặt thống kê được quan sát cho tất cả nhóm được tạo chủng ngừa được so sánh với mẫu đối chứng (dung dịch đệm TBS hoặc EPA không được glycosyl hóa). Do đó, phức hợp sinh học được chọn lọc và tạo ra là hợp chất có khả năng hữu dụng làm vacxin để tạo ra kháng thể đặc hiệu kháng nguyên O.

Ví dụ 7: Đặc trưng lý hóa của phức hợp sinh học

Bốn phức hợp sinh học được mô tả trong các ví dụ trên đây (kháng nguyên O của O25B, O1A, O2 và O6 lần lượt được tạo phức hợp với EPA dùng làm protein mang) được tạo ra dưới dạng các mẻ đơn chủng (các thành phần được dụng hoạt tính (active pharmaceutical ingredients – APIs)) hoặc được kết hợp trong chế phẩm duy nhất ở dạng vacxin đa chủng chống lại ExPEC. Các mẻ khác nhau được tạo ra: mẻ tiền lâm sàng, mẻ nghiên cứu độc tính, và mẻ lâm sàng. Bảng 7 thể hiện chủng vật chủ được sử dụng để sản xuất các phức hợp.

Bảng 7: Chủng vật chủ để sản xuất các mẽ tiền lâm sàng, mẽ nghiên cứu độc tính và mẽ lâm sàng

Sản phẩm	Chủng	Plasmit biểu hiện EPA	Plasmit biểu hiện PglB
EPA-O1A	W3110 $\Delta rfb::rfb(upec032)$ $\Delta waaL$	pGVXN1076	pGVXN970
EPA-O2	W3110 $\Delta rfb::rfb(upec116)$ $\Delta waaL$	pGVXN1076	pGVXN971
EPA-O6Glc	W3110 $\Delta rfb::rfb(CCUG11309)$ $\Delta waaL$	pGVXN659	pGVXN114
EPA-O25B	W3110 $\Delta rfb::rfb(upec138)$ $\Delta waaL$ $\Delta gtrABS$	pGVXN1076	pGVXN970

Do đó, bốn mẽ tiền GMP đơn chủng và tiêu chuẩn đối chứng EPA không được glycosyl hóa EPA được phân tích bằng sắc ký theo cỡ với việc tán xạ ánh sáng đa góc (SEC-MALS), để xác định mức độ quá trình mono- và diglycosyl hóa của từng phức hợp sinh học, và để xác định khối lượng phân tử (molecular mass - MW) của chất mang protein và O-PS được gắn với nó. Các mẫu được tách trên cột TSKgel-G3000 SWxl trong dung dịch đệm phosphat (độ pH là 7,0; NaCl 50 mM, natri phosphat 150 mM) và được quan sát bằng UV (214 và 280 nm), chỉ số khúc xạ (refractive index - RI) và tán xạ ánh sáng đa góc (multi angle light scattering - MALS).

Đối với protein mang EPA không được glycosyl hóa, MW là 63-67 kDa được xác định (MW lý thuyết là 70,5 kDa, trên cơ sở trình tự axit amin). Trong phức hợp sinh học, chỉ EPA được phát hiện ở 280 nm, cho phép xác định MW của nó từ MW tổng được đo bằng RI và MALS: trong phức hợp sinh học, MW được đo của gốc EPA là 65-71 kDa.

Việc phân tích về các tiêu chuẩn sản phẩm API tiền GMP được mô tả trong bảng 8, cho thấy sự có mặt của các phức hợp được mono- và di-glycosyl hóa, với MW lần lượt nằm trong khoảng 75-79 kDa và 87-91 kDa. Các phần O-PS thường có MW là 16-24 kDa đối với thành phần được di-glycosyl hóa, và 8-14 kDa đối với thành phần được mono-glycosyl hóa. Đối với MW có RU của mỗi kiểu huyết thanh, số lượng trung bình của RU trên mỗi chuỗi polysacarit được xác định là 10 đến 16, phù hợp với việc xử lý phân giải bằng hydrazin và dữ liệu MS.

Bảng 8: Việc phân tích SEC-MALS đối với các tiêu chuẩn sản phẩm API tiền GMP đơn chủng

Mẻ đơn chủng	Đỉnh 1			Đỉnh 2		
		MW tổng	O-PS MW		MW tổng	O-PS MW
EPA-O1A	15%	87 kDa	16 kDa	83%	75 kDa	8 kDa
EPA-O2	29%	88 kDa	19 kDa	70%	76 kDa	10 kDa
EPA-O6	47%	88 kDa	21 kDa	50%	78 kDa	12 kDa
EPA-O25B	56%	91 kDa	24 kDa	42%	79 kDa	14 kDa

Đỉnh 1: dạng được di-glycosyl hóa.

Đỉnh 2: dạng được mono-glycosyl hóa.

Việc phân tích quang phổ lưỡng sắc tròn (Circular dichroism - CD) cho mẻ phức hợp sinh học O25B được bào chế trong dung dịch nước muối đệm Tris (TBS), cho thấy rằng chế phẩm ở độ pH là 6,8 đến 7,4 có quang phổ tương tự đối với quang phổ của protein mang EPA không được glycosyl hóa, với hỗn hợp của cấu trúc xoắn alpha và cấu trúc tấm beta, như mong muốn trên cơ sở cấu trúc tinh thể đã biết của EPA. Do đó, trên cơ sở các phân tích CD này, quá trình glycosyl hóa với các chuỗi O25B O-PS dường như không ảnh hưởng đến cấu trúc thứ cấp của protein mang EPA.

Việc phân tích nhiệt quét vi sai (Differential scanning calorimetry - DSC) cho chế phẩm của mẻ phức hợp sinh học O25B trong TBS ở độ pH là 6,8 đến 7,4, và trong dung dịch nước muối đệm phosphat (PBS) ở độ pH là 7,1 đến 7,8, cho thấy đường cong nóng chảy có thể so với đường cong nóng chảy của EPA không được glycosyl hóa, với điểm nóng chảy khoảng 52°C. Kết quả này cho thấy rằng đặc tính sinh lý học của protein mang EPA không thay đổi do sự biến đổi bằng các chuỗi O25B O-PS.

Ví dụ 8: Độ ổn định của các mẫu đơn chủng và mẫu vaccin bốn chủng

Trước khi được sản xuất ở quy mô lớn, độ ổn định của quá trình sản xuất được đánh giá ở quy mô nhỏ. Độ ổn định của các mẻ được đánh giá trong các nghiên cứu sâu về độ ổn định mà bao gồm các điều kiện bảo quản nén và gia tăng

để xác định con đường phân hủy. Độ ổn định của bốn thành phần vacxin loại đơn trị liệu (APIs) được kiểm tra trong 3 tháng.

Quá trình phân tích dữ liệu về độ ổn định của APIs tiền lâm sàng cho thấy độ ổn định trong ít nhất 3 tháng khi được lưu trữ ở $-75 \pm 15^{\circ}\text{C}$ (điều kiện bảo quản bình thường). Không quan sát thấy sự thay đổi đáng kể về mặt thống kê nào ở điều kiện bảo quản này bằng phân tích hồi quy tuyến tính thống kê. Ngoài ra, điều kiện bảo quản nén ($+25 \pm 5^{\circ}\text{C}$) và gia tăng ($+5 \pm 3^{\circ}\text{C}$) sản phẩm ổn định trong ít nhất 3 tháng, như được chứng minh bởi sự biến đổi nhỏ về thông số thể hiện độ ổn định. Dữ liệu cho API tiền lâm sàng O1A được thể hiện trong bảng 9. Ba kiểu huyết thanh (O2, O6, O25B) khác được xác định là có dữ liệu tương tự về độ ổn định.

Bảng 9: Dữ liệu về độ ổn định của mẻ API tiền lâm sàng O1A

	S/P t0	S/P 3 tháng	Độ tinh khiết t0	Độ tinh khiết 3 tháng
$-75 \pm 15^{\circ}\text{C}$	19,3	19,8	98,1%	97,6%
$+5 \pm 3^{\circ}\text{C}$		20,9		98,6%
$+25 \pm 5^{\circ}\text{C}$		21,3		98,3%

S/P: tỷ lệ đường so với protein như được xác định lần lượt bằng thử nghiệm antron và BCA.

Độ tinh khiết: như được xác định bằng sắc ký lỏng pha đảo phân giải cao (RP-HPLC).

Độ ổn định của vacxin bốn chủng chế phẩm (Phức hợp sinh học O25B, O1A, O2 và O6) được kiểm tra trong 3 tháng. Nghiên cứu được thực hiện dưới các điều kiện lưu trữ bảo quản nén và gia tăng để xác định con đường phân hủy. Dữ liệu thu được được xem là có liên quan đến việc điều chỉnh ban đầu cho thời gian sử dụng GMP IMP (sản phẩm thuốc được nghiên cứu, chế phẩm vacxin bốn chủng ExPEC).

Việc phân tích độ ổn định dữ liệu của mẻ vacxin ExPEC tiền lâm sàng bốn chủng có độ ổn định trong ít nhất 3 tháng khi được lưu trữ ở $+5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (điều kiện bảo quản bình thường), như được thể hiện trong bảng 10. Không quan sát được bất kỳ sự thay đổi đáng kể về mặt thống kê nào ở điều kiện bảo quản này bằng phân tích hồi quy tuyến tính thống kê. Ngoài ra ở điều kiện bảo quản nén gia tăng ($+25$

$\pm 5^{\circ}\text{C}$), sản phẩm là ổn định, như được chứng minh bằng sự biến đổi nhỏ về thông số thể hiện độ ổn định.

Bảng 10: Dữ liệu về độ ổn định của mẻ vaccin tiền lâm sàng bốn chủng

	MW t0	MW 3 tháng	Độ tinh khiết t0	Độ tinh khiết 3 tháng
$5 \pm 3^{\circ}\text{C}$	302 và 192 kDa	294 và 188 kDa	98,3%	98,7%
$25 \pm 5^{\circ}\text{C}$		297 và 191 kDa		98,2%

MW (sự phân bố khối lượng): hai đỉnh sản phẩm chính (cụ thể hơn thành phần mono- và di- glycosyl hóa), như được xác định bằng sắc ký lỏng phân giải cao theo cỡ (SE-HPLC).

Độ tinh khiết: như được xác định bằng sắc ký lỏng pha đảo phân giải cao (RP-HPLC).

Bên cạnh đó, các nghiên cứu này xác định rằng APIs và chế phẩm vaccin ExPEC bốn chủng ổn định trong ít nhất ba tháng, và do đó là các chế phẩm vaccin thích hợp với độ ổn định.

Ví dụ 9: Nghiên cứu độc tính trên mẫu vaccin bốn chủng

Độc tính và khả năng dung nạp khu trú của mẫu vaccin bốn chủng (Phức hợp sinh học O25B, O1A, O2 và O6) sau hai lần sử dụng trong cơ (bốn cơ đầu đuôi được dùng cho việc điều trị) của chuột Sprague Dawley vào ngày 1 và 14 được dùng cho việc điều trị) của chuột Sprague Dawley vào ngày 1 và 14 được đánh giá. Khả năng phục hồi, thời gian duy trì, hoặc sự kéo dài biểu hiện của thay đổi bất kỳ được đánh giá sau thời gian phục hồi 14 ngày vào ngày 28. Việc kiểm tra tử thi của động vật trong các nhóm chính (10 chuột đực và 10 chuột cái cho cả hai nhóm đối chứng và nhóm được tạo chủng ngừa) được thực hiện vào ngày 17, và cho các nhóm phục hồi (5 chuột đực và 5 chuột cái cho cả hai nhóm đối chứng và nhóm được tạo chủng ngừa) vào ngày 28 (sau đó thời gian phục hồi 14 ngày). Nghiên cứu này không liên quan đến bất kỳ tác động nào dưới dạng bất lợi mà có thể do việc điều trị gây ra. Liều được sử dụng, cụ thể hơn liều hoàn chỉnh cho

người tương đương với 4 µg mỗi kháng nguyên O (16 µg tổng kháng nguyên O cho vacxin bốn chủng), như được sử dụng vào ngày 1 và 14, được xem là không quan sát được mức tác động bất lợi (no-observed-adverse-effect-level - NOAEL) cho vacxin ExPEC bốn chủng dưới điều kiện của nghiên cứu này. Ngoài ra, khả năng gây miễn dịch của vacxin ExPEC bốn chủng xác định ở cả hai ngày 17 và ngày 28, sau khi đã đánh giá các mẫu huyết thanh. Chuẩn độ cao hơn của kháng thể IgG kháng O1A, kháng O2, kháng O6 và kháng O25B được tạo ra trong nhóm được tạo chủng ngừa, được so sánh với các mẫu đối chứng mà chỉ nhận được chế phẩm dung dịch đệm (Tris 25 mM, NaCl 130 mM, KCl 2,7 mM, độ pH là 7,4).

Các dữ liệu này giúp xác định rằng vacxin ExPEC bốn chủng có profin độ tính thích hợp dùng làm vacxin, và tạo ra kháng thể cho ít nhất tất cả bốn kiểu huyết thanh của *E.coli* từ kháng nguyên O có trong vacxin (cụ thể hơn, O25B, O1A, O2 và O6).

Ví dụ 10: Dịch tễ học có các kiểu huyết thanh O cùng với sự nhiễm trùng huyết

Để xác định sự phân bố kiểu huyết thanh O trong *E.coli* gây bệnh ngoài đường ruột gây ra sự nhiễm trùng huyết trong đối tượng là người già, nghiên cứu dịch tễ học được thực hiện trên các mẫu máu phân lập của *E.coli* thu được từ các bệnh nhân nhiều hơn 60 tuổi. Tổng 860 các mẫu máu phân lập từ năm 2011 đến 2013 từ đối tượng ở Mỹ, Anh, Đức, Tây Ban Nha và Hà Lan, và được phân tích bằng kỹ thuật ngưng kết O cổ điển. Như được thể hiện trong bảng 11, sự phân bố kiểu huyết thanh O của các mẫu phân lập có sự nhiễm trùng huyết là giống với sự phân bố kiểu huyết thanh O được xác định trong các bệnh nhân mắc phải sự nhiễm trùng đường tiết niệu (UTI, xem bảng 1A). Kiểu huyết thanh O25 là thông dụng nhất trong các nhóm đối tượng có sự nhiễm trùng huyết được nghiên cứu; phân giải kiểu huyết thanh của 57 mẫu phân lập bằng PCR cho thấy rằng 56 (98%) có kiểu huyết thanh O25 có thể được phân loại dưới dạng O25B. Trong cả hai nhóm đối tượng đích (UTI và sự nhiễm trùng huyết), các kiểu huyết thanh O1, O2, O6, và O25 được xác định dưới dạng bốn kiểu huyết thanh thông dụng nhất. Nói chung, dữ liệu này giúp xác định rằng sự phân bố kiểu huyết thanh trong số cả hai mẫu phân lập có sự nhiễm trùng đường tiết niệu và sự nhiễm trùng huyết là rất tương tự nhau và không phụ thuộc vào vị trí địa lý, thời gian phân lập, và chỉ dẫn.

Bảng 11: Sự phân bố của các kiểu huyết thanh O của *E.coli* liên quan đến sự nhiễm trùng huyết thông dụng nhất từ việc thu gom 860 mẫu máu phân lập được thu gom ở Mỹ và Châu Âu trong giai đoạn từ năm 2011 đến 2013. Sự phân bố tương đối kiểu huyết thanh O của các mẫu được chỉ ra.

Kiểu huyết thanh O	Sự nhiễm trùng huyết trong đối tượng lớn hơn 60 tuổi ở Mỹ/Châu Âu từ năm 2011 đến 2013 (n=860)
25	19,2
2	8,8
6	8,3
1	7,8
75	3,3
4	2,8
16	2,7
18	2,7
15	2,3
8	2,0
153	1,6
73	1,6

Ví dụ 11: Sự tạo ra đáp ứng kháng thể chức năng

Chức năng của kháng thể được tạo ra sau khi tạo chủng ngừa với chế phẩm vaccin đơn chủng và bốn chủng được mô tả trên đây được nghiên cứu với thử nghiệm thực bào tiêu diệt in vitro (opsonophagocytic killing - OPK). Kiểu thử nghiệm này được chấp nhận sử dụng dưới dạng mối tương quan của sự bảo vệ cho vaccin phức hợp chống lại *Streptococcus pneumoniae* (Prevenar®). Thử nghiệm OPK xác định khả năng của huyết thanh trong việc tạo thuận lợi cho sự thực bào do opsonin gây ra và tiêu diệt của các kiểu huyết thanh của *E.coli* khác nhau. Trong các đĩa 96 giếng, mẫu huyết thanh được pha loãng đến mức cụ thể được ủ trong mỗi giếng, với: vi khuẩn từ một trong bốn kiểu huyết thanh của *E.coli* đặc hiệu vaccin, lượng xác định của các tế bào HL60, và bổ thể của thỏ con. Sau khi ủ, một phần của hỗn hợp được bổ sung vào môi trường thạch giàu dinh dưỡng Tryptic Soy Agar (TSA) và số lượng khuẩn lạc vi khuẩn được đếm. Khả năng của kháng thể gắn kết với các tế bào vi khuẩn và hoạt hóa quá trình tích tụ bổ thể và sự hấp thu trung gian và tiêu diệt vi khuẩn bằng các tế bào HL60 được thể hiện theo chuẩn độ opsonin. Chuẩn độ opsonin hoặc chỉ số opsonin (opsonization index - OI) tương

ứng với dung dịch loãng của huyết thanh tiêu diệt 50% các tế bào vi khuẩn. Chỉ số opsonin cho huyết thanh trước và sau khi tạo miễn dịch được đo. Sự gia tăng lớn hơn 4 lần về giá trị OI từ trước và sau khi tạo miễn dịch được xem là đáng kể. Các thử nghiệm OPK cho ba kiểu huyết thanh O2, O6Glc và O25B cũng được thực hiện.

Chức năng của đáp ứng kháng thể được tạo ra bằng vacxin đơn chủng

Để đánh giá hoạt tính chức năng của đáp ứng kháng thể được tạo ra bởi vacxin của phức hợp sinh học O25B, O1A, O2 và O6Glc, huyết thanh từ chuột được tạo chủng ngừa được phân tích bằng cách sử dụng thử nghiệm thực bào tiêu diệt (OPK), mà xác định sự thực bào và tiêu diệt vi khuẩn phụ thuộc vào bổ thể và kháng thể in vitro, ví dụ, *E. coli*. *E.coli* được opsonin hóa trước với các dung dịch loãng của huyết thanh từ chuột được tạo chủng ngừa, được ủ với bổ thể và thực bào (các tế bào HL60 được biệt hóa), và các đơn vị tạo ra cụm khuẩn (colony forming units - CFUs) được xác định. Sau đó, % tiêu diệt tối đa và chỉ số opsonin hóa (OI: dung dịch huyết thanh loãng tiêu diệt 50 % *E. coli*) được xác định. *E.coli* được chọn cho thử nghiệm OPK là OC 24453 (kiểu huyết thanh O2), OC 24781 (kiểu huyết thanh O6Glc) và OC 24176 (kiểu huyết thanh O25B). Như được thể hiện trong Fig.29, đáp ứng miễn dịch chức năng mạnh với O2-EPA (FIG.29A), O6Glc-EPA (FIG.29B) và O25B-EPA (FIG.29C) được quan sát.

Dữ liệu này cho thấy rằng các thành phần vacxin theo sáng chế tạo ra đáp ứng kháng thể chống lại các kiểu huyết thanh của *E.coli* mà kháng nguyên O của nó được sử dụng trong vacxin, và đáp ứng kháng thể này là chức năng trong việc tiêu diệt *E.coli* từ các kiểu huyết thanh này.

Chức năng của đáp ứng kháng thể được tạo ra bằng vacxin bốn chủng

Bảng 12 thể hiện độ chuẩn OI tổng cho các kháng nguyên O O2, O6Glc và O25B từ động vật được tạo miễn dịch bằng vacxin bốn chủng với 0,4 hoặc 4 µg mỗi kháng nguyên O. Độ chuẩn được xác định trong hai thử nghiệm riêng rẽ. Liều 0,4 µg tạo ra các giá trị OI đáng kể trong tất cả các động vật đối với các kiểu huyết thanh O2 và O6Glc. Đối với O25B, 3/8 động vật cho thấy sự gia tăng đáng kể về OI sau khi tạo miễn dịch với liều 0,4 µg. Khi được so sánh với liều 0,4 µg, liều 4 µg tạo ra giá trị OI tăng ít hơn đối với O2 trong tất cả động vật. 3/8 động vật có OI

tăng khi huyết thanh từ nhóm nhận liều 4 μg được kiểm tra đối với *E.coli* với O25B. Dữ liệu giúp xác định rằng vaccin bốn chủng có thể tạo ra kháng thể opsonin đặc hiệu kháng nguyên O chống lại O2, O6Glc và O25B.

Dữ liệu này giúp xác định rằng các thành phần vaccin theo sáng chế tạo ra đáp ứng kháng thể chống lại các kiểu huyết thanh của *E.coli* mà kháng nguyên O của nó có trong vaccin, và đáp ứng kháng thể này là chức năng trong việc tiêu diệt *E.coli* từ các kiểu huyết thanh này.

Bảng 12: Độ chuẩn OI đối với O2, O6 và O25 của *E. coli*. OI cho mỗi mẫu huyết thanh trước khi tạo chủng ngừa và sau 3 lần tạo chủng ngừa từ hai thử nghiệm riêng rẽ thể hiện cho tất cả động vật.

Tetravalent-EPA Rat Serum Opsonization Indices (OI)												
Animal No.	O 2 <i>E. coli</i>				O 6 <i>E. coli</i>				O 25 <i>E. coli</i>			
	0.4 μg Dose		4 μg Dose		0.4 μg Dose		4 μg Dose		0.4 μg Dose		4 μg Dose	
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
1: Pre-vacc	6	7	5	0	17	6	6	16	2'4 04	2'08 2	0	0
Post-vacc	>163 84	1'47 6	293	32	2 02	22 6	2'04 5	2'8 2 1	1'8 47	1'57 8	9	0
2: Pre-vacc	21	11	11	20	11	90	0	0	0	0	0	0
Post-vacc	11'14 8	>163 84	150	120	436	47 5	10'2 62	11'46 0	0	0	4	0
3: Pre-vacc	6	6	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0
Post-vacc	11'07 3	>163 84	46	19	98	37	7'95 9	8'59 7	6	0	355	197
4: Pre-vacc	5	5	5	6	23	17	0	0	0	0	0	0
Post-vacc	>163 84	63	57	45	108	116	2'18 9	4'48 8	0	0	70	26
5: Pre-vacc	7	0	0	4	30	8	8	7	0	0	0	0
Post-vacc	10'4 13	7'05 0	105	108	>16,3 84	12'67 2	3'10 7	7'56 4	0	0	105	69
6: Pre-vacc	8	0	8	7	299	164	5	0	269	154	0	0
Post-vacc	89	34	24	17	1'7 25	1'47 5	540	896	0	0	0	0
7: Pre-vacc	9	9	6	6	18	21	22	5	0	0	0	0
Post-vacc	>163 84	>163 84	109	92	1'24 9	1'86 3	160	143	1'13 0	630	9	8
8: Pre-vacc	4	6	6	5	26	22	0	0	0	0	0	0
Post-vacc	5'05 8	4'20 1	39	25	6'59 0	3'82 6	288	656	3'33 6	1'98 6	0	0
Pre-vacc Av	8	5	5	6	53	42	5	3	334	280	0	0
Post-vacc Av	10'86 7	7'74 7	103	57	3'34 9	2'58 6	3'31 9	4'57 8	790	524	69	37

trong đó:

Tetravalent-EPA Rat Serum Opsonization Indices (OI): Chỉ số opsonin (OI) của huyết thanh chuột với EPA bốn chủng;

0.4 μg Dose: liều 0,4 μg ;

Animal No.: động vật thử nghiệm số;

Exp.: thử nghiệm số;

Pre-vacc: trước khi tạo chủng ngừa;

Post-vacc: sau khi tạo chủng ngừa.

% tiêu diệt tối đa và chỉ số opsonin hóa (OI: dung dịch huyết thanh loãng tiêu diệt 50% *E. coli*) được xác định. *E.coli* được chọn lọc cho thử nghiệm OPK là OC 24453 (kiểu huyết thanh O2), OC 24781 (kiểu huyết thanh O6Glc) và OC

24176 (kiểu huyết thanh O25B). Đáp ứng miễn dịch chức năng mạnh với O2-EPA, O6Glc-EPA và O25B-EPA được quan sát.

Ví dụ 12: Đánh giá khả năng dùng làm vacxin chống lại *Escherichia coli* gây bệnh viêm màng não cho phụ nữ với tiền sử lâm sàng nhiễm trùng đường tiết niệu tái phát (RUTI)

Vacxin phức hợp sinh học *E.coli* được sử dụng trong nghiên cứu lâm sàng giai đoạn I. Vacxin chứa bốn phức hợp sinh học trong dung dịch nước muối đậm. Bốn phức hợp sinh học là: (i) O1A của *E.coli* được tạo phức hợp với protein mang EPA, (ii) O2 của *E.coli* được tạo phức hợp với protein mang EPA, (iii) O6 của *E.coliGlc* được tạo phức hợp với protein mang EPA, và (iv) O25B của *E.coli* được tạo phức hợp với protein mang EPA.

Nhóm đối tượng nghiên cứu bao gồm 194 phụ nữ khỏe mạnh, tuổi từ 18 đến 70, với tiền sử nhiễm trùng đường tiết niệu tái phát (RUTI), được xác định là ≥ 3 giai đoạn độc lập trong 12 tháng trước hoặc ≥ 2 giai đoạn trong 6 tháng gần đây. Ít nhất một trong số các giai đoạn nhiễm trùng đường tiết niệu (UTI) gây ra bởi *E.coli* (làm tác nhân gây bệnh duy nhất hoặc một phần của sự nhiễm đa trùng) và nguyên nhân được ghi nhận là do môi trường. Đối với mục đích nghiên cứu, UTI được xác định bằng sự có mặt của ít nhất một triệu chứng UTI đặc trưng (chứng khó tiểu tiện, tiểu gấp, tiểu thường xuyên, đau hông, đau và mẫn cảm ở bàng quang, đau trên mu, sốt, buồn nôn, nôn) với việc tiến hành đếm vi khuẩn (CFU) là $\geq 10^3$ CFU/ml vi sinh vật gây bệnh đường tiết niệu trong giữa dòng nước tiểu.

Nghiên cứu bao gồm hai nhánh: (i) khả năng dùng làm vacxin và (ii) giả dược. Nghiên cứu là nghiên cứu được thực hiện đan xen tại nhiều phòng nha, chọn lựa ngẫu nhiên, đối tượng tham gia hay bệnh nhân không biết mình thuộc nhóm nào (mù đơn), được kiểm soát bằng giả dược cho phụ nữ với tiền sử về RUTI.

Thời gian ước tính cho nghiên cứu là 4 tháng, sau đó là khoảng 9 tháng cho mỗi đối tượng.

Đối tượng của nghiên cứu là để đánh giá độ an toàn, khả năng gây miễn dịch, và hiệu quả của vacxin phức hợp sinh học *E. coli*.

Loại nghiên cứu

Đối tượng được theo dõi trong 9 tháng sau khi tiêm, và chỉ đối tượng được tiêm được theo dõi trong suốt khoảng thời gian nghiên cứu. Đối tượng được kiểm tra tổng là 5 lần: sàng lọc (lần kiểm tra thứ nhất), ngày 1 (lần kiểm tra thứ hai), ngày 7, ngày 30, và ngày 270. Đối tượng được gọi điện 4 lần vào ngày 2, ngày 90, ngày 150, và ngày 210.

Bất kỳ lần kiểm tra đột xuất nào do số lần xuất hiện của UTI bao gồm tiêu chuẩn chăm sóc với các lựa chọn phù hợp với việc điều trị. Nước tiểu và máu (nếu cần) được thu gom cho mục đích chẩn đoán và phân loại kiểu huyết thanh. Các biến cố bất lợi tự phát (AE) và biến cố bất lợi nghiêm trọng (SAE) được ghi lại trong thời gian nghiên cứu, ngược lại AE bất biến được ghi lại trong 7 ngày sau khi tiêm.

Ở mỗi lần kiểm tra thể bệnh mới được mô tả cho đối tượng và thể trước được nghiên cứu thảo luận.

Định liều và sử dụng

Ở lần kiểm tra thứ nhất, đối tượng phù hợp mà được xác định cần được sàng lọc và sự tuân thủ đối với các tiêu chuẩn lựa chọn/loại trừ được xác định. Máu được lấy và nước tiểu được thu gom.

Ở lần kiểm tra 2 (ngày 1), mỗi đối tượng sẽ được tiêm trong cơ 0,5ml của dung dịch (vacxin thử nghiệm hoặc giả dược) trong cơ vai tam giác (cơ delta). Liều nhỏ hơn của vacxin thử nghiệm sẽ chứa 1µg của mỗi polysacarit (tổng 4µg polysacarit). Liều đích của vacxin thử nghiệm sẽ chứa 4µg của mỗi polysacarit (tổng 16µg polysacarit).

Mục đích

Mục đích chính là để đánh giá số lần xuất hiện, cường độ, mối quan hệ, và thời gian của các biến cố bất biến và các biến cố bất lợi tự phát (AE) và các biến cố bất lợi nghiêm trọng (SAE) sau khi tiêm vacxin thử nghiệm được so sánh với nhóm giả dược trong suốt thời gian nghiên cứu.

Mục đích thứ hai là để (i) so sánh sự thay đổi về điểm cuối an toàn huyết học và sinh hóa học trước khi tiêm (vào thời điểm sàng lọc đầu tiên và ngày 1) và sau khi tiêm (vào ngày 7 và ngày 30) của vacxin thử nghiệm được so sánh với nhóm giả dược; (ii) đánh giá đáp ứng miễn dịch của vacxin thử nghiệm giữa các đường cơ sở (ngày 1) và sau khi tiêm (ngày 30 và ngày 270); (iii) so sánh số giai đoạn của

sự nhiễm trùng đường tiết niệu theo triệu chứng (UTI) gây ra bởi các kiểu huyết thanh - vaccin *E.coli* giữa hai nhánh nghiên cứu, được tiêm bằng vaccin thử nghiệm hoặc giả dược trong toàn bộ khoảng thời gian nghiên cứu dưới dạng điểm cuối hiệu quả liên quan nhất; (iv) đánh giá tỷ lệ số lần xuất hiện của vaccin-kiểu huyết thanh đặc hiệu *E.coli* UTI trong nhóm vaccin được so sánh với nhóm giả dược trong thời gian nghiên cứu; và (v) đánh giá cường độ và thời gian của các triệu chứng lâm sàng của vaccin-kiểu huyết thanh đặc hiệu *E.coli* UTI trong nhóm vaccin được so sánh với nhóm giả dược trong thời gian nghiên cứu.

Mục đích nghiên cứu là để (i) so sánh tỷ lệ số lần xuất hiện UTI gây ra bởi kiểu huyết thanh *E.coli* bất kỳ trong nhóm vaccin được so sánh với nhóm giả dược trong suốt thời gian nghiên cứu; và (ii) so sánh tỷ lệ số lần xuất hiện UTI gây ra bởi tác nhân gây bệnh bất kỳ trong nhóm vaccin được so sánh với nhóm giả dược trong suốt thời gian nghiên cứu.

Tiêu chuẩn lựa chọn

Tiêu chuẩn lựa chọn cho nghiên cứu như sau: (i) đối tượng nữ với tiền sử của UTI tái phát, mà được xác định là: ≥ 3 giai đoạn không phụ thuộc UTI trong 12 tháng trước hoặc ≥ 2 giai đoạn UTI trong 6 tháng gần đây; ít nhất một UTI trong 5 năm gần đây gây ra bởi *E.coli* (làm tác nhân gây bệnh duy nhất hoặc một phần của sự nhiễm đa trùng) và được ghi nhận và xác định do môi trường; (ii) tuổi ≥ 18 và ≤ 70 tuổi; (iii) đối tượng ở trạng thái sức khỏe không có sự khởi phát hoặc triệu chứng nghi ngờ UTI ở lần kiểm tra sàng lọc và vào ngày tiêm (lần kiểm tra 2); (iv) sức khỏe tốt, không có tiền sử lâm sàng đáng kể, các phát hiện qua kiểm tra sức khỏe hoặc biểu hiện lâm sàng bất thường theo kết luận lâm sàng của người kiểm tra; và (v) sẵn sàng tham gia trong nghiên cứu sau khi tất cả các khía cạnh của quy trình đã được kiểm tra và xác định rõ ràng, và có mẫu biên bản đồng thuận chấp nhận.

Tiêu chuẩn loại trừ

Tiêu chuẩn loại trừ cho nghiên cứu như sau: (i) tiền sử của nhiều hơn 10 UTI tái phát trong năm trước khi sàng lọc kiểm tra; (ii) sử dụng ống thông đường tiểu bất kỳ trong thời gian ngắn trong khoảng 7 ngày trước khi sàng lọc; (iii) sử dụng ống thông đường tiểu thường xuyên trong khoảng 30 ngày trước khi sàng lọc; (iv)

tiền sử của bệnh/biểu hiện bất thường bất kỳ về đường tiết niệu chưa được chữa khỏi; (v) biểu hiện của sự suy giảm chức năng miễn dịch; (vi) bệnh và/hoặc sự suy giảm tim mạch, gan, thận đáng kể; (vii) bệnh tiểu đường không kiểm soát; (viii) biểu hiện bất thường đáng kể trong sàng lọc kết quả về huyết học, hóa học huyết thanh hoặc xét nghiệm nước tiểu; (ix) dương tính với HIV, và/hoặc có biểu hiện của HBV hoặc HCV; (x) BMI >34; (xi) trị liệu kích thích miễn dịch trước đó để ngăn ngừa UTI (như Urovaxom®, Strovac® hoặc Urovac®) trong 3 tháng gần đây, hoặc dự định sử dụng trong khoảng thời gian nghiên cứu; (xii) đang sử dụng thuốc bất kỳ đã biết ảnh hưởng đến chức năng miễn dịch (ví dụ corticosteroid $\geq 0,5$ mg/kg BW/ngày); (xiii) sử dụng việc điều trị bằng estrogen đường âm đạo liên quan đến UTI mới được bắt đầu ít hơn 6 tháng trước khi tiêm và tiếp tục trong nghiên cứu hoặc dự định bắt đầu sử dụng trong khoảng thời gian nghiên cứu diễn ra; (xiv) sử dụng phép trị liệu kháng sinh bất kỳ trong khoảng 1 tuần trước khi tiêm; (xv) dự định sử dụng thuốc kháng sinh sau giao hợp để ngăn ngừa UTI trong thời gian nghiên cứu; (xvi) tạo chủng ngừa bất kỳ dự định trong khoảng 30 ngày trước khi và 30 ngày sau khi tiêm; (xvii) tham gia vào các thử nghiệm lâm sàng khác trong 60 ngày trước khi tham gia và trong thời gian nghiên cứu; (xviii) đã xử lý bằng globulin miễn dịch hoặc các sản phẩm có liên quan đến máu trong 3 tháng trước khi tiêm; (xix) quá nhạy với thành phần bất kỳ của vacxin; (xx) có tình trạng bệnh lý tâm thần hoặc do thuốc đáng kể mà theo ý kiến của người kiểm tra là không nên tham gia vào nghiên cứu; (xxi) ốm nặng ở thời điểm tiêm; (xxii) phụ nữ có khả năng mang thai mà dương tính với thử nghiệm mang thai hoặc từ chối sử dụng phương pháp ngừa thai hữu dụng; (xxiii) phụ nữ người hay chảy sữa ở thời điểm bất kỳ trong suốt thời gian nghiên cứu; (xxiv) đối tượng cần can thiệp giải phẫu không cấp thiết, dự định thực hiện trong thời gian nghiên cứu; và (xxv) có biểu hiện bất kỳ khác mà theo ý kiến của người kiểm tra sẽ làm tăng nguy cơ tạo ra hậu quả bất lợi nếu tham gia vào trong nghiên cứu.

Phân tích và phương pháp thống kê

Phần mô tả về mặt thống kê (n, giá trị trung bình, độ lệch chuẩn, số trung bình và khoảng cho các biến liên tiếp, tần suất và phần trăm cho các biến số) được tạo ra theo nhóm điều trị và/hoặc lần kiểm tra, nếu cần. Tất cả dữ liệu được liệt kê

theo đối tượng, việc điều trị nhóm và, nếu cần, lần kiểm tra. Tất cả đối tượng từ nhóm B nhận được giả dược được kết hợp để tạo ra nhóm điều trị bằng giả dược.

Ví dụ 13: Kết quả nghiên cứu lâm sàng giai đoạn I

Ví dụ này thể hiện một số kết quả phân tích tạm thời của nghiên cứu lâm sàng giai đoạn I được mô tả trong ví dụ 12.

Độ an toàn

Số lần xuất hiện của biến cố bất lợi và biến cố bất lợi nghiêm trọng có thể so sánh giữa nhóm giả dược và nhóm được tạo chủng ngừa. Mười biến cố bất lợi nghiêm trọng được ghi nhận, và không có bất kỳ biến cố nào liên quan đến thuốc nghiên cứu.

Khả năng gây miễn dịch

Để đánh giá khả năng gây miễn dịch của các thành phần vaccin, huyết thanh từ phụ nữ tham gia vào trong nghiên cứu lâm sàng được thu gom và được phân tích bằng ELISA để xác định IgG chống lại bốn kháng nguyên O khác nhau trong vaccin bốn chủng (*E. coli* O1, *E. coli* O2, *E. coli* O6, và *E. coli* O25B).

Huyết thanh từ phụ nữ được tạo chủng ngừa được ủ trong các đĩa được phủ bằng O1A, O2, O6Glc và O25B-LPS và EPA. Sau đó, các đĩa được ủ bằng kháng thể thứ hai được đánh dấu bằng HRP (kháng IgG người). Kháng thể gắn kết được phát hiện bằng cơ chất TMB và độ hấp thụ được đo. Giá trị EC50 được xác định bằng việc điều chỉnh 4PL.

Như được thể hiện trong Fig.30, đáp ứng miễn dịch mạnh với O1A-EPA, O2-EPA, O6Glc-EPA và O25B-EPA xảy ra trong phần lớn các phụ nữ được tạo chủng ngừa.

Dữ liệu này giúp xác định rằng khả năng gây miễn dịch của mỗi thành phần của vaccin bốn chủng.

Đáp ứng kháng thể chức năng

Các thử nghiệm OPK, mà xác định sự thực bào và tiêu diệt vi khuẩn *E.coli* phụ thuộc vào bổ thể và kháng thể in vitro, được sử dụng để đánh giá đáp ứng kháng thể chức năng của phụ nữ tham gia nghiên cứu lâm sàng.

Huyết thanh thu được từ các thành viên tham gia nghiên cứu. *E.coli* được opsonin hóa trước bằng dung dịch loãng của huyết thanh từ phụ nữ được tạo chủng

ngừa, được ủ với bổ thể và thực bào (các tế bào HL60 được biệt hóa), và các đơn vị tạo ra khuẩn lạc (CFUs) còn lại được xác định. Sau đó, phần trăm tiêu diệt tối đa và chỉ số opsonin hóa (OI: dung dịch huyết thanh loãng tiêu diệt 50% *E. coli*) được xác định. *E.coli* được chọn lọc cho thử nghiệm OPK là OC 24452 (kiểu huyết thanh O1A), OC 24453 (kiểu huyết thanh O2), OC 24454 (kiểu huyết thanh O6Glc), và OC 24176 (kiểu huyết thanh O25B).

Như được thể hiện trong Fig.31, đáp ứng miễn dịch chức năng mạnh với O1A-EPA (Fig.31A), O2-EPA (Fig.31B), O6Glc-EPA (Fig.31C), và O25B-EPA (Fig.31D) được quan sát.

Dữ liệu này giúp xác định rằng mỗi thành phần của vacxin bốn chủng tạo ra đáp ứng kháng thể đặc hiệu kiểu huyết thanh, và đáp ứng kháng thể này là chức năng trong việc tiêu diệt *E.coli* từ các kiểu huyết thanh này. Do đó, chế phẩm vacxin theo sáng chế có chức năng cho người.

Việc tạo miễn dịch với phức hợp kháng nguyên O bốn chủng chứa O25B-EPA tạo ra kháng thể IgG hoạt tính chéo O25A/O25B ở người

Để xác định mức hoạt tính chéo của kháng thể IgG huyết thanh được cảm ứng bằng vacxin đối với hai kiểu phụ huyết thanh O25 của *E.coli* đã biết, O25A và O25B, các dung dịch loãng của huyết thanh thu được từ đối tượng được tạo chủng ngừa được ủ với LPS của O25A, LPS của O25B được tinh chế, hoặc các tế bào vi khuẩn nguyên vẹn, và được kiểm tra bằng ELISA.

Như được thể hiện trong Fig.32, giá trị EC50 tương tự được quan sát khi hoạt tính đối với LPS của O25A (thanh màu đen) và LPS của O25B (thanh màu xám) ba mươi ngày sau khi tạo chủng ngừa được kiểm tra. Nói chung dữ liệu cho thấy rằng phức hợp sinh học O25B có hiệu quả cao đối với O25B và cho O25A, nhưng trong hầu hết các trường hợp/đối tượng O25B được kiểm tra có hiệu quả cao hơn một chút xét về đáp ứng kháng thể đối với O25B khi so với O25A. Kết quả này cho thấy rằng với sự xuất hiện của một số biến thể tự nhiên, vacxin bốn chủng tạo ra kháng thể mà nhận diện được cả hai LPS của O25A và O25B. Để kiểm tra việc kết quả là giống nhau cho toàn bộ các tế bào vi khuẩn và các chủng O25A/O25B, hoạt tính đối với các mẫu phân lập lâm sàng O25A hoặc O25B thu được từ máu hoặc nước tiểu còn được tiếp tục kiểm tra. Trong trường hợp này

chủng kiểu huyết thanh O75, kiểu huyết thanh không được thể hiện trong vacxin bốn chủng, được sử dụng làm mẫu đối chứng âm (đường chấm màu xám trong Fig.33). Như được minh họa trong Fig.33, kháng thể IgG huyết thanh được cảm ứng bằng vacxin cho thấy đáp ứng mạnh với mỗi chủng O25. Mặc dù việc biến đổi giữa chủng với chủng là rõ ràng, tuy nhiên hoạt tính đối với O25A (đường màu đen) và chủng O25B (đường màu xám) vẫn được quan sát. Dữ liệu này chứng minh rằng thành phần vacxin O25B của vacxin bốn chủng tạo ra kháng thể mà nhận diện được cả LPS được tinh chế O25A và O25B và chủng *E. coli* O25A và O25B.

Các bảng 13 và 14 dưới đây, thể hiện một cách chi tiết một số chủng và plasmit được sử dụng trong các ví dụ trên đây.

Bảng 13: Chủng

Tên gọi	Kiểu gen	Mô tả
upec032	wt	Mẫu phân lập lâm sàng O1A từ nghiên cứu dịch tễ học GVXN
upec436	wt	Mẫu phân lập lâm sàng O25A từ nghiên cứu dịch tễ học GVXN
upec138	wt	Mẫu phân lập lâm sàng O25B từ nghiên cứu dịch tễ học GVXN
upec116	wt	Mẫu phân lập lâm sàng O2 từ nghiên cứu dịch tễ học GVXN
upec163	wt	Mẫu phân lập lâm sàng O25B từ nghiên cứu dịch tễ học GVXN
upec177	wt	Mẫu phân lập lâm sàng O25B từ nghiên cứu dịch tễ học GVXN
W3110	F-, λ^- , <i>IN(rrnD-rrnE)1</i> , <i>rph-1</i>	Chủng thí nghiệm K-12 được sử dụng để tổng hợp chủng sản xuất, CGSC#: 4474
CCUG25	wt	Mẫu phân lập O2 thu được từ việc thu gom từ môi trường nuôi cấy, Đại học Göteborg (CCUG), Sweden (xem, Jansson, et al., (1987) Carbohydrate research 161, 273-27)

Tên gọi	Kiểu gen	Mô tả
CCUG11309	wt	Mẫu phân lập O6 từ CCUG, OPS với Glc phân nhánh (xem, Jann, et al., (1994) Carbohydrate research 263, 217-225)
CCUG11311	wt	Mẫu phân lập O6 từ CCUG, OPS với Glc phân nhánhNAc (xem, Jann, et al., (1994) Carbohydrate research 263, 217-225)

Bảng 14: Plasmit

Tên gọi	Mô tả	Lưu ý
pGVXN150	plasmit biểu hiện trên cơ sở pBR322 của EPA-his6 được khử độc tính gen mã hóa các vị trí 2-glycosyl hóa	Xem, Ihssen, et al., (2010) Microbial cell factories 9, 61
pGVXN659	plasmit biểu hiện trên cơ sở pBR322 của EPA được khử độc tính gen mã hóa các vị trí 4-glycosyl hóa	pGVXN150 được biến đổi để mã hóa vị trí glycosyl hóa đầu N và C khác
pGVXN1076	pGVXN659 $\Delta ampR::kanR$	
pGVXN579	vectơ trên cơ sở pMAL-p2X để biểu hiện MBP với liên kết linh động đầu C, sau trình tự có vị trí 3-glycosyl hóa và epitop myc	Giúp tinh chế nhanh phức hợp sinh học tránh được histag
pGVXN114	plasmit biểu hiện trên cơ sở pEXT21 cho PglB với tag HA	Xem, Ihssen, et al., (2010) Microbial cell factories 9, 61
pGVXN939	plasmit biểu hiện trên cơ sở pEXT21 cho PglB với tag HA, codon được tối ưu hóa	
pGVXN970	plasmit biểu hiện trên cơ sở pEXT21 cho PglB không có tag, codon được tối ưu hóa	
pGVXN539	plasmit biểu hiện trên cơ sở pACT3 cho EPA có Histag được khử độc tính gen, được tối ưu hóa sử dụng codon mã hóa vị trí 2-	được thay thế khả năng đề kháng chloramphenicol bằng kanamycin từ pGVXN161 (oligos:

Tên gọi	Mô tả	Lưu ý
	glycosyl hóa dưới dạng pGVXN150	#1399/#1400)
pGVXN161	pKD4	Xem, Datsenko và Wanner, (2000) Proc Natl Acad Sci U S 97, 6640-6645
pGVXN112	plasmid biểu hiện trên cơ sở pACT3 cho PglB với tag HA	

Bảng 15: Trình tự

Mô tả	Trình tự	SEQ ID NO.
<i>rmlB</i> (upec138)	GTGAAGATACTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTG GTTCTGCTGTTGTTTCGTCACATAATAAATAATACGCAA GATAGTGTTGTTAATGTCGATAAATTAACATACGCCG GAAACCTGGAATCACTTGCAGATGTTTCTGATTCTGA ACGCTATTTCTTTGAACATGCGGATATTTGTGATGCA GCTGCAATGGCACGGATTTTTGCTCAGCATCAGCCG GATGCAGTGATGCACCTGGCAGCTGAAAGCCATGTT GACCGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAA CCAATATTGTGGGTACTTATGTCCTTTTAGAAGCGGC TCGGAATTATTGGTCTGGTCTGGATGATGAAAAGAAA AAAAACTTCCGTTTTTCATCATATTTCTACTGATGAGGT GTATGGTGACTTACCCCATCCGGATGAAGTAAATAGC AATGAAACGTTGCCGCTATTTACGGAAACGACAGCAT ACGCGCCAAGTAGTCCATATTCTGCTTCTAAAGCTTCC AGCGATCATTTGGTTTCGCGCATGGAAACGTACTTATG GTTTACCGACCATTGTGACTAATTGCTCGAACAACAT GGTCCTTATCATTTCCCGGAAAAGCTTATTCCACTGG TTATTCTTAATTCCTGGAAGGTAAGGCATTACCTATT TATGGCAAAGGAGATCAGATCCGCGACTGGTTGTAT GTAGAGGATCATGCTCGAGCGTTATATACCGTCGTA ACCGAAGGTAAAGCGGGCGAAACTTATAACATTGGT GGACACAACGAAAAGAAAAACATCGACGTAGTGTTTC ACTATTTGTGATTTGTTGGATGAGATAGTCCCGAAAG AGAAATCTTACCGCGAGCAAATTACTTATGTTACCGA TCGTCCGGGACACGATCGCCGTTATGCGATTGATGCT GAGAAGATTGGTCGCGAATTGGGATGGAAACCACAG GAAACGTTTGAGAGTGGGATTCGTAAAACGGTGGA ATGGTACCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAATG TGAAAAGTGGTGCCTATCAATCGTGGATTGAACAG AACTATGAGGGCCGCCAGTAA	1

Mô tả	Trình tự	SEQ ID NO.
<i>rmlD</i> (upec138)	ATGAATATCCTCCTTTTTGGCAAAACAGGGCAGGTA GGTTGGGAACACAGCGTGCTCTGGCACCTCTGGGT AATTTGATTGCTCTTGATGTTCACTCCACTGATTACTG TGGTGATTTTAGTAATCCTGAAGGTGTAGCTGAAACC GTAAGAAGCATTTCGGCCTGATATTATTGTCAACGCA GCCGCTCACACCGCAGTAGACAAAGCAGAATCAGA ACCGAAGTTTGCACAATTACTGAACGCGACGAGTGT CGAAGCGATCGCGAAAGCAGCCAATGAAGTCGGCG CCTGGGTTATTCACTACTCTACTGACTACGTATTTCC GGGGACCGGTGAAATACCATGGCAGGAGGAGGATG CAACCGCACCGCTAAATGTTTACGGTGAAACCAAGT TAGCGGGAGAAAAAGCATTACAAGAGCATTGTGCG AAGCACCTTATTTTCCGGACCAGCTGGGTCTATGCA GGTAAAGGAAATAACTTCGCCAAAACAATGTTGCG TCTGGCAAAAGAGCGTGAAGAATTAGCCGTTATTAA TGATCAGTTTGGTGCGCCAACCTGGCGCAGAGTTACT GGCTGATTGTACGGCACATGCTATTCGTGTGGCACT GAATAAACCGGAAGTCGCAGGCTTGTACCATCTGGT AGCTAGTGGTACCACAACGTGGCACGATTATGCTG CGCTGGTTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGCATT CCCCTTGCACTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAAC AACAGCCTATCCTACACCAGCTCGTCGTCCACATA ACTCTCGCCTTAATACAGAAAAATTTACAGCAGAA CTTTGCGCTTGTCTTGCTGACTGGCAGGTTGGCG TGAAACGAATGCTTAACGAATTATTTACGACTACA GCAATTTAA	2
<i>rmlA</i> (upec138)	ATGAAAACGCGTAAAGGTATTATTTTGGCGGGTGG TTCTGGTACTCGTCTTTATCCTGTGACGATGGCCGTC AGTAAACAGCTGTTACCGATTTATGATAAACCGAT GATCTATTACCCGCTCTCTACACTGATGTTAGCGGG TATTCGCGATATTCTGATTATCAGTACACCACAGGA TACTCCTCGTTTTCAACAACCTGCTGGGTGACGGGAG CCAGTGGGGCCTGAATCTTCAGTACAAAGTGCAAC CGAGTCCGGATGGTCTTGCGCAGGCGTTTATTATCG GTGAAGAGTTTATTGGTGGTGATGATTGTGCTTTGG TACTTGGTGATAATATCTTCTACGGCCACGACCTGC CGAAGTTAATGGACGTAGCTGTTAACAAGAAAGT GGTGCAACGGTATTTGCCTATCACGTTAATGATCCT GAACGTTATGGTGTCTGAGTTTGATAATAACGG TACTGCAATTAGCCTGGAAGAAAAACCGCTGGAAC CAAAAAGTAACTATGCGGTTACTGGGCTTTATTTCTA TGACAATGACGTTGTGGAATGGCGAAAAACCTTA AGCCTTCTGCCCCGAGGTGAACTGGAAATTACCGATA TTAACCGTATTTATATGGAACAAGGACGTTTGTCTG TCGCTATGATGGGGCGTGGCTATGCATGGCTGGATA CAGGGACGCATCAAAGTCTTATTGAAGCAAGCAAC	3

Mô tả	Trình tự	SEQ ID NO.
	TTCATTGCCACCATTTGAAGAGCGCCAGGGACTAAAG GTTTCCTGTCCGGAAGAAATTGCTTATCGTAAAGGG TTTATTGATGCTGAGCAGGTAAAAGTATTAGCCGAA CCGTTGAAGAAAAATGCTTATGGTCAGTATCTGCTC AAAATGATTAAAGGTTATTAA	
<i>rmlC</i> (upec138)	ATGAACGTAATTA AAACTGAAATTCCTGATGTGCTG ATTTTTGAACCAAAAGTTTTTGGGGATGAACGTGGCT TCTTTTTTGAGAGTTTTTAATCAGAGGATTTTTGAAGA AGCAGTAGGTCGTAAGGTTGAGTTTGTTCAGGATAA CCATTCTAAGTCCAGTAAAGGTGTTTTACGTGGTCTT CATTATCAGTTAGAACCTTATGCTCAAGGAAAACCTGG TGCGCTGTGTTGTTGGCGAGGTTTTTGATGTTGCGGTT GATATTCGTAAATCGTCACCTACATTTGGGAAATGG GTTGGGGTGAATTTGTCTGCTGAGAATAAGCGTCAG TTGTGGATTCCCTGAGGGATTTGCACATGGTTTTTTGG TGCTGAGTGATTTAGCAGAAGTTTTATATAAAACGA ATCAATATTATGCTCCATCACATGAAAAAATATTAT ATGGAATGACCTCTTGCTTAATATTAAATGGCCGAGC ACAGCACTGATCACTCTGTCTGATAAGGATGCAAA TGGGGAAAGATTTGAACTAAGTGAGTTTTGA	4
<i>wzx</i> (upec138)	ATGTCTCTCTTAAACATAGTATATGGAATGTTGCGG GCTACTTTATACCAACATTAATTGCAATTCCCGCCTTT GGATTAATTGCGAGGAAAATTGGTGTAGAACTATTTG GTTTGTATACGTTAGCAATGATTTTTATAGGGTATGCA AGTATATTTGATGCTGGGTAAACAAGAGCTGTTGTGCG TGAAATAGCATTACTAAAAAACAGAGTGGACGATTGT AATACGATAATAGTAACTTCTATTATCGCTGTGATATT TTTAGGGTTTATCGGAGGCGGGGGAGTGTTTCTGCTTA AAGGCGATATTATTGAACTGTAAATATCTCACCAATA TATTACGCCGATTGATAAAGTCTCTAGTATTATTATCA TCTCTGATACCTGTATTCTTAGTCACGCAAATACTATTA GCAGAGCTTGAGGGTCGGGAATATTTTGGGATTCTAAA TATACAAAAAAGTGTAGGGAATTCTTTAATTGCAGGGT TACCTGCATTATTTGTTTTAATTAATCAAACGCTTTTTTC TGCAATTATTGGTGTAGCGATTGCAAGAGTTATATGCTT GTGGTTAAGCTACATTATGAGCAGGGAAAGAATAACTA TCGATATCTCATTTTTTTCAATAACTGTTTTAAAGCGGTT ATTTAGATATGGCGGGTGGGTA ACTATAAGTAACATAA TATCTCCTATATTAGCGAGTATGGATAGATTTATTCTATC CCATATCCAGGGAGCATCAAAAATATCATTCTATACAGT CCCTAATGAGCTGGTAACTAGGCTTGGAATAGTTCCAGG CTCTCTTGGGAAAGCTGTTTTTCCAAAATTAAGT CATGCAAGGAATTTTACAGCGTCATATGCAGAGCAAAA AAAAGCTTATATATTAATGACTGTCATTGTAATGCCTTT GGTTTTATTGTATATTATTACGCAAAGTTTATTTTAACA	5

Mô tả	Trình tự	SEQ ID NO.
	TTGTGGATGGGGGCTGAGTATGCAGGGATTTCGGTCGA AATATTACGGATTATGCTTATAGGGTATATTTTAACTGT TATTCACAAATCTCTTTTGCCAACATACAGGCCTTTGGA AAAGCAAAATACACTGCATACATCCATATGATGGAATT TATTCCTTATTTGATAATGTTATATATAATTTCAAAGGAA TATGGGGTTATTGGTGTTCGCTGGTTATGGACAATTTCGA GTAATAATTGATTTTTTTGATGCTTTTATATATGAGTTATC GTTGTAATAATCTTATGAAAAAAGGGTAG	
<i>wekA</i> (upec138)	ATGATATATATTGTGGTATTAAATTGGAATGGGGCTA TAGATACCATTAAATTGTGTAAAAAGTTTAAATGGATTT AAATGTTAGCGATTATAAAATTATCATTGTTGATAAC TGTTCTATGGATAACTCATATGATACTATAAAAGAAA ATCTTAATTCATTATATATTGCTGATAAAAGTATCATT GAGGTGAAGTATGAGGATAGAAATAAATATAAAACC TTAGAAAACGATAAAATCATATTAATACAATCTCCGC AAAATAATGGGTACGCAAGTGGTAATAATATTGGCAT AGAGTTCGCTCTTAATCAGGAGAATATGAAATACGTC TGGGTTCTGAATAATGATACTGAAGTGGATAAAGAGG CTTAACTCATTTAATTAGTAAATGTGATTCAGATAAA AGTATAGGGATTTGCGGTTCTCGTTTAGTCTATTTTGCC GACAGAGAGATGCAGCAAGGACTAGGTGGGGTGCATA ACAAATGGTTATGCACTACAAAAAATTATGAAATGGG AAGATTAGTTTCCAAAAAATATGATGATGAAGTCATTA GTAATGATATAGATTATATAATTGGCGCATCGATGTTTT TCTCTAGAGAATGTTTGGAAACAGTTGGATTGATGAAT GAAGAATATTTTTTATACTATGAAGAGTTAGATATTTGC CTCAGAGCAAAAGCAAAGAACTTTAAATTAGGTATTTG CTCAGAAAGTTTGGTTTATCATAAAATAGGTGCAAGTA CTGATGGGGGAAAGAGCATGATGGCTGATCTTTGCTCA ATAAAAAATAGGCTGGTCATTACAGAAAGGTTTTATCC CCAATATTATTGGACGGTATGGTTGTCACTTTTTGTTGTA GCATTAAACCGTGCTAGAAGAGGTGAGTTTAATAAGAT GAAAAGATGTTTGAATGTTATGTTTAACTTCAAACGAAA CAAAGGTAGCAAATGCCATTAG	6
<i>wekB</i> (upec138)	ATGAAAGTGGCTTTTTTATCTGCTTATGATCCACTATCTA CATCCAGTTGGTCTGGCACACCTTATTATATGCTAAAGG CATTATCGAAGAGAAATATTTCCATTGAAATATTAGGAC CGGTAAATAGCTATATGATATACATGTTAAAAGTATATA AATTAATATTAAGGTGTTTCGGAAAAGAATATGATTATA GTCATTCTGAAGTTGCTTTCCAGGTATTACGGTAGAATATT CGGTAGGAAATTAAAAAAATTGATGGTTTGGATTTTATT ATCGCACCTGCAGGTTCCCTCACAAATTGCTTTTTTAAAAA CAACCATACCAATAATATATCTATCGGATACAACATATG A TCAATTAAAAAGCTATTATCCGAATTAAATAAAAAAAC	7

Mô tả	Trình tự	SEQ ID NO.
	AATTATAAATGATGAGGATGCAAGTTTAATCGAACGCAA GGCTATTGAAAAAGCAACAGTAGTATCTTTCCCATCTAA A TGGGCAATGGATTTTTTGCAGGAATTATTACAGATTAGATT TTGATAAATTAGTTGAAATACCATGGGGGGGCTAATTT ATTTGATGATATTCACCTTTGCTAATAAAAAATATAATTC AAAAGAATAGTTATACTTGTCTTTTCTTGGGAGTTGAT TGGGAAAGAAAAGGTGGGAAAACAGCCTTGAAAGCA ATTGAATATGTAAGGCAGTTATATGGGATCGATGTTAG ACTAAAAATTTGTGGATGTACTCCGAATCAAAAGATTT TACCTACTTGGGTTGAATTAATTGATAAAGTAGATAAA AATAACGTTGACGAATATCAGAAATTCATCGATGTGTT ATCTAACGCTGATATACTTCTTTTACCAACCATTGCTGA ATGTTATGGAATGGTATTTTGTGAAGCTGCTGCTTTTGG ATTGCCTGTTGTCGCTACAGATACAGGTGGAGTCAGTT CTATAGTTATCAACGAAAGGACGGGGATATTAATTA GACCCGTTAGACTATAAGCACTTTGGAAATGCAATTCA TAAAATAATTAGTTCCGTAGAGACTTATCAAACTACTC CCAAAACGCAAGAATTAGATATAATAATATATTGCATTG GGACAATTGGGCTAAAAAGATAATTGAGATTATGTATG AGCATAAGAATAGAAGAATCAAATAG	
wzy (upec138)	ATGAGCATAAGAATAGAAGAATCAAATAGCACAAAAAG AATTATATGTTTATTTATACTTTTTCTTGTTTTCCCTGATTT TTTGTTTTATACATTAGGGGTTGATAATTTTAGCATTTC A CGATAATCTCAATTACATTGCTTTTTTGTTTTTTAAGAGCT AAAAATATTTGCAAAGATAATTTTCTAATAATAGTAGCG TTATTCATATTGTTGTGTTTTAACTGTTTGTTAAGTATGCT A TTTAATATTGAACAGGCTTTAACATTTAAAGTTGTACTTT C AATATATAGCATCTTAATAATGGCATACGTCTCCTCTTGT T ATGCACAGACGTTGTGGTTATGTTCTGAAGAAATACTTAA GAGATCCGTCTTTTATTTGTTTCGCATTTCTTTGCCTTATTG G CATTATAAGTATTCTTTTACAGAAGACTGAGATTATACAT G ATAAAAGTATGATTCTTTTTCTGAACCATCAGCATTTC A TTGGTTTTTATACCTATCTTTTCATTTTGTTTATACTATAC AA GAGGGGGGGGGGCTACTATTGCTCTATATATTATCTTTGGG T ATTGCGTTAGGTATCCAGAATTTAACAATGTTGGTAGGCA T	8

Mô tả	Trình tự	SEQ ID NO.
	TGTGATTAGTGTTTTTGTGATGAAAAAATAACTATAAGG C AAACTATTGTTATACTTTTGGGGGCATGGATTTTTTCCAT GA TATTAAGTGATTAGACATTTCTTACTATACATCGCGGCT TG ATTTTAAAAATACTACGAACCTATCAGTGCTTGTATATCT TT CAGGAATTGAAAGAGCTTTCTTGAATTTTATTACAAGTTA TG GTCTTGGTATTGGTTTTCAACAAATGGGAGTGAATGGGG AG ATAGGAATATATCAACAAATTTTAGCTGAACTTGATGCCC C TATGTTAAATATATACGATGGCTCATTTATTTCTTCTAAG TTAATATCTGAGTTTGGGGTTATTGGTGCATTAATGTGTA TT TTCTATTTTTTTTATTTTTCCCGATTTTATCTGCGTTTCAA AAAAAGTAAGAGATATTCACCGCAGTATATTTTAGCAT ATAGCTTCTACATGTGTTTCTTCATCCCTCTTTTTATACG TGGTGCTGGTTATATAAACCCCTATGTGTTTATGTTATTT TCATCAATATTTTTGTGCAAATATCACGCTAAAAATATCT TGATGAAATCTAATGTCCAGATAGCTATATAA	
<i>wbbJ</i> (upec138)	ATGTGCATTAAAAAAAACCTTAAGTTAATTAAACGATA TGGCCTTTATGGTGGTCTTAGGCTTCTTAAAGATATATTC TTAACAAAATTTTTATTTTGTTCAAATGTTAGGATTATTA GATTTCCATGTTATATTAGAAAAGATGGAAGTGTTAGTTT TGGAAAAGGTTTTACATCAGGTGTAGGATTACGAGTTGA TGCATTTATGGATGCCGTAGTTTCCATTGGAGAAAATGTT CAAATTAATGACTATGTTACATCGCGGCTATTAATAATG TCATTATTGGTAGAGATACATTAATAGCAAGTAAAGTATT TATTAGTGATCATAATCATGGTATTTTTTCTAAATCCGAT A TCCATAGTTCACCAACTATTATTCCTTCGTCTAGGCCCCCT GAATCTGCACCTGTGTATATTGGAGAGCGTGTGTGGATTG GCGAAAATGTGACAATATTACCAGGTGCGTGTATAGGTA A TGGTGTAGTTATTGGCGCAAACAGTGTTGTTTCGTGGTGAG ATTCCTAATAATGTGATCATTGCTGGTGTTCAGCTAAAA TTGTTAAAAAATATAACTATGAGCGTATGCAATGGGAAA GAATATAG	9
<i>wbbK</i> (upec138)	ATGGGAAAGAATATAGTTGTAATATCGGCTGTTAATTTT ACAACCGGAGGCCCTTTACCGTACTAAAAAATGTGCT TACAGCAACTAAAGATAGAGCCGAATGTAAATTTATTG CACTGGTTCATAGCTCTGCTGAACTAATGGAATTATTTT	10

Mô tả	Trình tự	SEQ ID NO.
	CGTGGGTTGAATTTATAGAGTATCCAGAAGTCAAGTCTT CGTGGGTTAAAAGATTATATTTTCGAATATATAACTTGCAA TAGATTATCTAAGGTGATTAAGGCAACTCATTGGGTATG CTTACATGATATTACAGCAAATGTTAGTGTACCCTATAG ATTTGTTTATTGCCACAATCCTGCACCGTTCTATAAATAT TTAAGCTATCGAGATATTATAGGAGAACCTAAATTTTAT CTTTTTTATCTTTTTTATGGGCTTTTATACAATATCAATAT AAAAAAGAACACAGCAGTTTTTGTTCAGCAGCAGTGGCT AAAAAAGAATTCGAAAAAAAAATATAAGTTAAAGAATG TTGTTGTTAGTCGCCCTGAAGATATTTGCCCTTTTGAAAG TGATGGTTTGGTAAGAAATAATAAAAAAGGATGTGAG GATATTTTACCCAGCAGTGCCCCGTATATTTAAAAACTTT GAAGTTATCATACGTGCTGCACAAATATTACAAGATAAA AATATTCATTTTTATCTTACTTTTGATGGTACTGAAAA TAAGTATGCAAAAAGAATATATAAATTAGCTTCCGA ACTGAAAAATGTACATTTCTCCTCGGTTACCTTAATGCA ACCGAGATGGTTAACTTTTATCAAGATTCAGATATTA TTTGTTTCCCATCGAACTAGAAACGTGGGGATTACC ATTATCAGAAGCTAAAACATACAAAAAATGGATATTT GCGGCAGACTTACCTTATGCTCATGAAGTTTATATAA CTATTCAAAAACCTAGATATTTTCCATTTGACGATGAG AAAATACTTGTTTCGCTACATATTAGAGTACACAAGTA AAAATATGCATGAAGATATAAAAAAATAGTAGGGTGA ATTTTAATAATGATGCATTGACTGGTTTTGAACAGTTTA TTGAATATATCCTCAAGGGGAACCTGA	
<i>wbbL</i> (upec138)	ATGATTATGAATAATGATTATTTTCTCTTTCTTAACCCC GATGTATTCATAACCAGTGAAAGTTTGATTAATTATGT TGATTATATAATTAGTAATGATTATAAGTTTAGCACAT TATGTCCTTATCGAGATTTTACTAAAAGCAAACATGAT TATTCAATACGGAGTTTTCCAACCTTATATGATTTTCTTT GTTCTTTTTTATTGGGGGTGAATAAAAGTAAATTAAG AAGGAAAATATACTTTCTGATACTGTAGTTGATTGGTG TGCTGGCTCATTTATGCTTATTCATGCTTTAAGTTTCTTA AATGTGAATGGTTTTGATCAAAAATATTTTATGTATTGT GAAGATATTGACCTTTGTATGCGTTTAAATTAAGTGG AGTAGATCTTTACTATACTCCCCATTTTGATGCTATTCA TTATGCGCAGCATGAAAATAGAAGAATATTTACTAAAG CATTTTCGATGGCATATAAGGAGTATTACGCGCTACATA TTACGGAAACCAATTCTTTCTTATAAAAACTATAGAAA AATTACATCCGAACCTGGTAAAGTGA	11
cụm gen <i>rfb</i> (upec138) của <i>E.coli</i>	GTGAAGATACTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTGGTT CTGCTGTTGTTTCGTCACATAATAAATAATACGCAAGATAG TGTTGTTAATGTCGATAAATTAACATACGCCGGAAACCTG GAATCACTTGCAGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATTTCT TTGAACATGCGGATATTTGTGATGCAGCTGCAATGGCAC	12

Mô tả	Trình tự	SEQ ID NO.
	GGATTTTGTGCTCAGCATCAGCCGGATGCAGTGATGCACCT GGCAGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTCAATTACAGGCCC TGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTGGGTACTTATGTC CTTTTAGAAGCGGCTCGGAATTATTGGTCTGGTCTGGATG ATGAAAAGAAAAAACTTCCGTTTTTCATCATATTTCTAC TGATGAGGTGTATGGTGACTTACCCCATCCGGATGAAGT AAATAGCAATGAAACGTTGCCGCTATTTACGGAAACGAC AGCATACGCGCCAAGTAGTCCATATTCTGCTTCTAAAGCT TCCAGCGATCATTTGGTTCGCGCATGGAAACGTAATTATG GTTTACCGACCATTGTGACTAATTGCTCGAACAACATATGG TCCTTATCATTTCCCGGAAAAGCTTATTCCACTGGTTATT CTTAATTCACTGGAAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCA AAGGAGATCAGATCCGCGACTGGTTGTATGTAGAGGATC ATGCTCGAGCGTTATATACCGTCGTAACCGAAGGTAAAG CGGGCGAACTTATAACATTGGTGGACACAACGAAAAGA AAACATCGACGTAGTGTTCCTACTATTTGTGATTTGTTGGA TGAGATAGTCCCGAAAGAGAAATCTTACCGCGAGCAAAT TACTTATGTTACCGATCGTCCGGGACACGATCGCCGTTAT GCGATTGATGCTGAGAAGATTGGTCGCGAATTGGGATGG AAACCACAGGAAACGTTTGAGAGTGGGATTCGTAAAACG GTGGAATGGTACCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAAT GTGAAAAGTGGTGCCTATCAATCGTGGATTGAACAGAAC TATGAGGGCCGCCAGTAATGAATATCCTCCTTTTTGGCAA AACAGGGCAGGTAGGTTGGGAACCTACAGCGTGCTCTGGC ACCTCTGGGTAATTTGATTGCTCTTGATGTTCACTCCACT GATTACTGTGGTGATTTTAGTAATCCTGAAGGTGTAGCTG AAACCGTAAGAAGCATTCCGGCCTGATATTATTGTCAACG CAGCCGCTCACACCGCAGTAGACAAAGCAGAATCAGAAC CGAAGTTTGCACAATTACTGAACGCGACGAGTGTGGAAG CGATCGCGAAAGCAGCCAATGAAGTCGGCGCCTGGGTGA TTCCTACTCTACTGACTACGTATTTCCGGGGACCGGTGA AATACCATGGCAGGAGGAGGATGCAACCGCACCGCTAAA TGTTTACGGTGAAACCAAGTTAGCGGGAGAAAAAGCATT ACAAGAGCATTGTGCGAAGCACCTTATTTTCCGGACCAG CTGGGTCTATGCAGGTAAAGGAAATAACTTCGCCAAAAC AATGTTGCGTCTGGCAAAAGAGCGTGAAGAATTAGCCGT TATTAATGATCAGTTTGGTGCGCCAACTGGCGCAGAGTTA CTGGCTGATTGTACGGCACATGCTATTCGTGTGGCACTGA ATAAACCGGAAGTCGCAGGCTTGTACCATCTGGTAGCTA GTGGTACCACAACGTGGCACGATTATGCTGCGCTGGTTTT TGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGCATTCCCCTTGCACTCAA CAAGCTCAACGCAGTACCAACAACAGCCTATCCTACACC AGCTCGTCGTCCACATAACTCTCGCCTTAATACAGAAAA ATTTAGCAGAACTTTGCGCTTGTCTTGCCTGACTGGCAG GTTGGCGTGAAACGAATGCTTAACGAATTATTTACGACT ACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTTCGTAATGGTG	

Mô tả	Trình tự	SEQ ID NO.
	GAGCAAGATGTATTAAAAGGAATGATGAAATGAAAACG CGTAAAGGTATTATTTTGGCGGGTGGTTCTGGTACTCGTC TTTATCCTGTGACGATGGCCGTCAGTAAACAGCTGTTACC GATTTATGATAAACCGATGATCTATTACCCGCTCTCTACA CTGATGTTAGCGGGTATTCGCGATATTCTGATTATCAGTA CACCACAGGATACTCCTCGTTTTCAACAACCTGCTGGGTGA CGGGAGCCAGTGGGGCCTGAATCTTCAGTACAAAGTGCA ACCGAGTCCGGATGGTCTTGCGCAGGCGTTTATTATCGGT GAAGAGTTTATTGGTGGTGATGATTGTGCTTTGGTACTTG GTGATAATATCTTCTACGGCCACGACCTGCCGAAGTTAAT GGACGTAGCTGTTAACAAAGAAAGTGGTGCAACGGTATT TGCCTATCACGTTAATGATCCTGAACGTTATGGTGTCTGTG GAGTTTGATAATAACGGTACTGCAATTAGCCTGGAAGAA AAACCGCTGGAACCAAAAAGTAACCTATGCGGTTACTGGG CTTTATTTCTATGACAATGACGTTGTGGAAATGGCGAAAA ACCTTAAGCCTTCTGCCCCGAGGTGAACTGGAAATTACCG ATATTAACCGTATTTATATGGAACAAGGACGTTTGTCTGT CGCTATGATGGGGCGTGGCTATGCATGGCTGGATACAGG GACGCATCAAAGTCTTATTGAAGCAAGCAACTTCATTGC CACCATTGAAGAGCGCCAGGGACTAAAGGTTTCCTGTCC GGAAGAAATTGCTTATCGTAAAGGGTTTATTGATGCTGA GCAGGTAAAAGTATTAGCCGAACCGTTGAAGAAAAATGC TTATGGTCAGTATCTGCTCAAAATGATTAAAGGTTATTAA TAAGATGAACGTAATTA AAAACTGAAATTCCTGATGTGCT GATTTTTGAACCAAAAAGTTTTTGGGGATGAACGTGGCTTC TTTTTTGAGAGTTTTAATCAGAGGATTTTTGAAGAAGCAG TAGGTCGTAAGGTTGAGTTTGTTCAGGATAACCATTCTAA GTCCAGTAAAGGTGTTTTACGTGGTCTTCATTATCAGTTA GAACCTTATGCTCAAGGAAAACCTGGTGCGCTGTGTTGTTG GCGAGGTTTTTGTGTTGCGGTTGATATTCGTAAATCGTC ACCTACATTTGGGAAATGGGTTGGGGTGAATTTGTCTGCT GAGAATAAGCGTCAGTTGTGGATTCCTGAGGGATTTGCA CATGGTTTTTTGGTGCTGAGTGATTTAGCAGAAGTTTTAT ATAAAACGAATCAATATTATGCTCCATCACATGAAAAAA ATATTATATGGAATGACCTCTTGCTTAATATTAAATGGCC GAGCACAGCACTGATCACTCTGTCTGATAAGGATGCAAA TGGGGAAAGATTTGAACTAAGTGAGTTTTGAAATGTCTCT CTTAAACATAGTATATGGAATGTTGCGGGCTACTTTATA CCAACATTAATTGCAATTCCCGCCTTTGGATTAATTGCGA GGA AAATTGGTGTAGAACTATTTGGTTTGTATACGTTAGC AATGATTTTTATAGGGTATGCAAGTATATTTGATGCTGGG TTAACAAGAGCTGTTGTGCGTGAAATAGCATTACTAAAA AACAGAGTGGACGATTGTAATACGATAATAGTAACTTCT ATTATCGCTGTGATATTTTTAGGGTTTATCGGAGGCGGGG GAGTGTCTCTGCTTAAAGGCGATATTATTGAACTGTTAAA TATCTCACCAATATATTACGCCGATTGATAAAGTCTCTA	

Mô tả	Trình tự	SEQ ID NO.
	GTATTATTATCATCTCTGATACCTGTATTCTTAGTCACGC AAATACTATTAGCAGAGCTTGAGGGTCGGGAATATTTTG GGATTCTAAATATACAAAAAAGTGTAGGGAATTCTTTAA TTGCAGGGTTACCTGCATTATTTGTTTTAATTAATCAAAC GCTTTTTTCTGCAATTATTGGTGTAGCGATTGCAAGAGTT ATATGCTTGTGGTTAAGCTACATTATGAGCAGGGAAAGA ATA ACTATCGATATCTCATTTTTTTTCAATAACTGTTTTAAA GCGGTTATTTAGATATGGCGGGTGGGTA ACTATAAGTAA CATAATATCTCCTATATTAGCGAGTATGGATAGATTTATT CTATCCCATATCCAGGGAGCATCAAAAATATCATTCTATA CAGTCCCTAATGAGCTGGTA ACTAGGCTTGGAATAGTTCC AGGCTCTCTTGGGAAAGCTGTTTTTCCAAAATTAAGTCAT GCAAGGAATTTTACAGCGTCATATGCAGAGCAAAAAAAA GCTTATATATTAATGACTGTCATTGTAATGCCTTTGGTTTT ATTTGTATATTATTACGCAAAGTTTATTTTAA CATTGTGG ATGGGGGCTGAGTATGCAGGGATTTCGGTCGAAATATTA CGGATTATGCTTATAGGGTATATTTTTTAACTGTTATTCAC AAATCTCTTTTGCCAACATACAGGCCTTTGGAAAAGCAA AATACACTGCATACATCCATATGATGGAATTTATTCCTTA TTTGATAATGTTATATATAATTTCAAAGGAATATGGGGTT ATTGGTGTTCGTGGTTATGGACAATTCGAGTAATAATTG ATTTTTTGATGCTTTTATATATGAGTTATCGTTGTAATAAT CTTATGAAAAAAGGGTAGCCTGATGATATATATTGTGGT ATTAAATTGGAATGGGGCTATAGATACCATTAATTGTGTT AAAAGTTTAATGGATTTAAATGTTAGCGATTATAAAATTA TCATTGTTGATAACTGTTCTATGGATAACTCATATGATAC TATAAAAGAAAATCTTAATTCATTATATATTGCTGATAAA AGTATCATTGAGGTGAAGTATGAGGATAGAAATAAATAT AAAACCTTAGAAAACGATAAAAATCATATTAATACAATCT CCGCAAAATAATGGGTACGCAAGTGGTAATAATATTGGC ATAGAGTTCGCTCTTAATCAGGAGAATATGAAATACGTC TGGGTTCTGAATAATGATACTGAAGTGGATAAAGAGGCT TTA ACTCATTTAATTAGTAAATGTGATT CAGATAAAAGTA TAGGGATTTGCGGTTCTCGTTTAGTCTATTTTGCCGACAG AGAGATGCAGCAAGGACTAGGTGGGGTGCATAACAAAT GGTTATGCACTACAAAAAATTATGAAATGGGAAGATTAG TTTCCAAAAAATATGATGATGAAGTCATTAGTAATGATAT AGATTATATAATTGGCGCATCGATGTTTTTCTCTAGAGAA TGTTTGGAACAGTTGGATTGATGAATGAAGAATATTTTT TATACTATGAAGAGTTAGATATTTGCCTCAGAGCAAAAG CAAAGAACTTTAAATTAGGTATTTGCTCAGAAAGTTTGGT TTATCATAAAATAGGTGCAAGTACTGATGGGGGAAAGAG CATGATGGCTGATCTTTGCTCAATAAAAAAATAGGCTGGTC ATTACAGAAAGGTTTTATCCCAATATTATTGGACGGTAT GGTTGTCACTTTTTGTGTAGCATTTAACCGTGCTAGAAG AGGTGAGTTTAATAAGATGAAAAGATGTTTGAATGTTAT	

Mô tả	Trình tự	SEQ ID NO.
	GTTTAACTTCAAACGAAACAAAGGTTAGCAAATGCCATTA GAATATGCACTTAATCATGGTGTAAATAAATCTATAGTTT GATATGTTATTAAAGGGTATTTAATGAAAGTGGCTTTTTT ATCTGCTTATGATCCACTATCTACATCCAGTTGGTCTGGC ACACCTTATTATATGCTAAAGGCATTATCGAAGAGAAAT ATTTCCATTGAAATATTAGGACCGGTAAATAGCTATATGA TATACATGTAAAGATATATAAATTAATATTAAGGTGTTT CGGAAAAGAATATGATTATAGTCATTTCGAAGTTGCTTTCC AGGTATTACGGTAGAATATTCGGTAGGAAATTAACAAAAA ATTGATGGTTTGGATTTTATTATCGCACCTGCAGGTTCCCT CACAAATTGCTTTTTTTAAAAACAACCATACCAATAATATA TCTATCGGATACAACATATGATCAATTAACAAAGCTATTAT CCGAATTTAAATAAAAAACAATTATAAATGATGAGGAT GCAAGTTTAATCGAACGCAAGGCTATTGAAAAAGCAACA GTAGTATCTTTCCCATCTAAATGGGCAATGGATTTTTGCA GGAATTATTACAGATTAGATTTTGATAAATTAGTTGAAAT ACCATGGGGGGCTAATTTATTTGATGATATTCACCTTTGCT AATAAAAATATAATTCAAAAGAATAGTTATACTTGTCTTT TCTTGGGAGTTGATTGGGAAAGAAAAGGTGGGAAAACAG CCTTGAAAGCAATTGAATATGTAAGGCAGTTATATGGGA TCGATGTTAGACTAAAAATTTGTGGATGTACTCCGAATCA AAAGATTTTACCTACTTGGGTGAATTAATTGATAAAGTA GATAAAAATAACGTTGACGAATATCAGAAATTCATCGAT GTGTTATCTAACGCTGATATACTTCTTTTACCAACCATTG CTGAATGTTATGGAATGGTATTTTGTGAAGCTGCTGCTTT TGGATTGCCTGTTGTGCTACAGATACAGGTGGAGTCAGT TCTATAGTTATCAACGAAAGGACGGGGATATTAATTAAA GACCCGTTAGACTATAAGCACTTTGGAAATGCAATTCAT AAAATAATTAGTTCCGTAGAGACTTATCAAACTACTCCC AAAACGCAAGAATTAGATATAATAATATATTGCATTGGG ACAATTGGGCTAAAAAGATAATTGAGATTATGTATGAGC ATAAGAATAGAAGAATCAAATAGCACAAAAAGAATTAT ATGTTTATTTATACTTTTTCTTGTTTTCCCTGATTTTTTGT TTATACATTAGGGGTTGATAATTTTAGCATTTCACGATA ATCTCAATTACATTGCTTTTTTGTTTTTTAAAGAGCTAAAA ATATTTGCAAAGATAATTTTCTAATAATAGTAGCGTTATT CATATTGTTGTGTTTTAACTGTTTGTTAAGTATGCTATTTA ATATTGAACAGGCTTTAACATTTAAAGTTGTACTTTCAAT ATATAGCATCTTAATAATGGCATAACGTCTCCTCTTGTTAT GCACAGACGTTGTGGTTATGTTCTGAAGAAATACTTAAG AGATCCGCTTTTTATTTGTTTCGCATTTCTTTGCCTTATTGG CATTATAAGTATTCTTTTACAGAAGACTGAGATTATACAT GATAAAAGTATGATTCTTTTTCTGAACCATCAGCATTTG CATTGGTTTTTATACCTATCTTTTCATTTTGTTTATACTAT ACAAGAGGGGGGGGGGCTACTATTGCTCTATATATTATCTT TGGGTATTGCGTTAGGTATCCAGAATTTAACAATGTTGGT	

Mô tả	Trình tự	SEQ ID NO.
	AGGCATTGTGATTAGTGTTTTTTGTGATGAAAAAATAACT ATAAGGCAAACCTATTGTTATACTTTTGGGGGCATGGATTT TTCCATGATATTAAGTGATTTAGACATTTCTTACTATAC ATCGCGGCTTGATTTTAAAAATACTACGAACCTATCAGTG CTTGATATATCTTTCAGGAATTGAAAGAGCTTTCTTGAATT TTATTACAAGTTATGGTCTTGGTATTGGTTTTTCAACAAAT GGGAGTGAATGGGGAGATAGGAATATATCAACAAATTTT AGCTGAACTTGATGCCCCTATGTTAAATATATACGATGGC TCATTTATTTCTTCTAAGTTAATATCTGAGTTTGGGGTTAT TGGTGCATTAATGTGTATTTTCTATTTTTTTTATTTTTCCC GATTTTATCTGCGTTTCAAAAAAAGTAAGAGATATTCACC GCAGTATATTTTAGCATATAGCTTCTACATGTGTTTCTTC ATCCCTCTTTTTTATACGTGGTGCTGGTTATATAAACCCCT ATGTGTTTATGTTATTTTCATCAATATTTTTGTGCAAATAT CACGCTAAAAATATCTTGATGAAATCTAATGTCCAGATA GCTATATAATAGTAGATTATATTATCATTATCACGTAAAT TACATATTAATAGCATATATGATAACTAGGACATAAATA ATGTGCATTAAAAAAAACCTTAAGTTAATTAAACGATAT GGCCTTTATGGTGGTCTTAGGCTTCTTAAAGATATATTCT TAACAAAATTTTTATTTTGTTCAAATGTTAGGATTATTAG ATTTCCATGTTATATTAGAAAAGATGGAAGTGTTAGTTTT GGAAAAGGTTTTACATCAGGTGTAGGATTACGAGTTGAT GCATTTATGGATGCCGTAGTTTCCATTGGAGAAAATGTTC AAATTAATGACTATGTTTACATCGCGGCTATTAATAATGT CATTATTGGTAGAGATACATTAATAGCAAGTAAAGTATTT ATTAGTGATCATAATCATGGTATTTTTTTCTAAATCCGATA TCCATAGTTCACCAACTATTATTCCTTCGTCTAGGCCCTT GAATCTGCACCTGTGTATATTGGAGAGCGTGTGTGGATTG GCGAAAATGTGACAATATTACCAGGTGCGTGTATAGGTA ATGGTGTAGTTATTGGCGCAAACAGTGTTGTTTCGTGGTGA GATTCCTAATAATGTGATCATTGCTGGTGTTCAGCTAAA ATTGTTAAAAAATATAACTATGAGCGTATGCAATGGGAA AGAATATAGTTGTAATATCGGCTGTTAATTTTACAACCGG AGGCCCTTTACCGTACTAAAAAATGTGCTTACAGCAACT AAAGATAGAGCCGAATGTAAATTTATTGCACTGGTTCAT AGCTCTGCTGAACTAATGGAATTATTTCCGTGGGTGAAT TTATAGAGTATCCAGAAGTCAAGTCTTCGTGGGTAAAA GATTATATTTTGAATATATAACTTGCAATAGATTATCTAA GGTGATTAAGGCAACTCATTGGGTATGCTTACATGATATT ACAGCAAATGTTAGTGTACCCTATAGATTTGTTTATTGCC ACAATCCTGCACCGTTCTATAAATATTTAAGCTATCGAGA TATTATAGGAGAACCTAAATTTTATCTTTTTTATCTTTTTT ATGGGCTTTTATACAATATCAATATAAAAAAGAACACAG CAGTTTTTGTTCAGCAGCAGTGGCTAAAAAAGAATTTCG AAAAAAAATATAAGTTAAAGAATGTTGTTGTTAGTCGCC CTGAAGATATTTGCCCTTTTGAAGTGATGGTTTGGTAAG	

Mô tả	Trình tự	SEQ ID NO.
	AAATAATAATAAAAAAGGATGTGAGGATATTTTACCCAGC AGTGCCCCGTATATTTAAAAACTTTGAAGTTATCATACGT GCTGCACAAATATTACAAGATAAAAAATATTCATTTTTATC TTACTTTTGATGGTACTGAAAATAAGTATGCAAAAAGAA TATATAAATTAGCTTCCGAAGTAAAAATGTACATTTCCCT CGGTTACCTTAATGCAACCGAGATGGTTAACTTTTATCAA GATTCAGATATTATTTGTTTCCCATCGAAACTAGAAACGT GGGGATTACCATTATCAGAAGCTAAAACATACAAAAAAT GGATATTTGCGGCAGACTTACCTTATGCTCATGAAGTTTT ATATAACTATTCAAAAAGTAGATATTTTCCATTTGACGAT GAGAAAATACTTGTTTCGCTACATATTAGAGTACACAAGT AAAAATATGCATGAAGATATAAAAAATAGTAGGGTGAAT TTTAATAATGATGCATTGACTGGTTTTGAACAGTTTATTG AATATATCCTCAAGGGGAAGTACGTTGGTTTATATTATAA TCGTTTCACATGGCCATGATGACTATATAGAAAATCTTTT ATTAAATTTAAAGTTGCCCTCTGGAAGATTTAAAATAATA GTTTCGTGATAACAAAAGTTCAATGGTTTTAAAAAAAACA TGCGAAAAAAATTGCGTAACCTATTTGCATGGAGGGCAA TATGGATTTGGACATAATAAACATAGCAGTGTGCATAT ATAATTAATAACTTCATGATTATGAATAATGATTATTTTC TCTTTCTTAACCCCGATGTATTCATAACCAGTGAAAGTTT GATTAATTATGTTGATTATATAATTAGTAATGATTATAAG TTAGCACATTATGTCTTTATCGAGATTTTACTAAAAGCA AACATGATTATTCAATACGGAGTTTTCCAAGTTTATATGA TTTTCTTTGTTCTTTTTTATTGGGGGTGAATAAAAGTAAA ATTAAGAAGGAAAATATACTTTCTGATACTGTAGTTGATT GGTGTGCTGGCTCATTTATGCTTATTCATGCTTTAAGTTTC TTAAATGTGAATGGTTTTGATCAAAAATATTTTATGTATT GTGAAGATATTGACCTTTGTATGCGTTTAAAATTAAGTGG AGTAGATCTTTACTATACTCCCCATTTTGATGCTATTCATT ATGCGCAGCATGAAAATAGAAGAATATTTACTAAAGCAT TTCGATGGCATATAAGGAGTATTACGCGCTACATATTACG GAAACCAATTCTTTCTTATAAAAACTATAGAAAAATTAC ATCCGAAGTGGTAAAGTGA	
Protein EPA được khử độc tính chứa 4 trình tự điều hòa quá trình N-glycosyl được làm tối ưu hóa	GSGGGDQNAATGSGGGKLAEEAFDLWNECAKACVLDLKD VRSSRMSVDPAIADTNGQGVLYHYSMVLEGGNDALKLAIN ALSITSDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSTYTRQARGSWSLNWL V LỘNHEKPSNIKVFIHELNAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKL ARDATFFVRAHESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQAQPRREK RWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNYLAQQRCLDDTWEGKI YRVLAGNPAKHDLDIKDNNNSTPTVISHRLHFPEGGSLAAL TAHQACHLPLEAFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYL AARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLAL TLAAAESERFVRQGTGNDEAGAASADVSLTCPVAKDQNR TKGECAGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDVSFSTRGTQ NWTVERLLQAHQRQLEERGYVFGYHGTGFLEAAQSIVFGGV	13

Mô tả	Trình tự	SEQ ID NO.
	RARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRN GALLRVYVPRWSLPGFYRTGLTLAAPEAAGEVERLIGHPLP LRDAITGPEEEGGRVTILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGG DLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLKLGGGGDQN AT	
Trình tự điều hòa quá trình N-glycosyl hóa	Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro	14
Trình tự điều hòa quá trình N-glycosyl hóa	Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro	15

Tất cả các phương án trên đây theo sáng chế được mô tả chỉ với mục đích minh họa cho sáng chế, và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận ra rằng, hoặc có thể xác định được chỉ bằng cách sử dụng các thử nghiệm thông dụng, các phương án tương đương về mặt giá trị số đối với các phương án đã được mô tả. Do đó, tất cả các phương án này bị coi là nằm trong phạm vi của sáng chế và yêu cầu bảo hộ kèm theo dưới đây.

Tất cả các tài liệu tham chiếu (bao gồm đơn yêu cầu cấp patent, các patent, và các công bố khác) được dẫn theo sáng chế được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của chúng.

Một số phương án cụ thể theo sáng chế

Phương án 1

1. Tế bào chủ không nhân chứa:

- a. cụm gen *rfb*(upec138) (SEQ ID NO:12), cụm gen *rfb*(upec163), hoặc cụm gen *rfb*(upec177);
- b. trình tự nucleotit mã hóa oligosacaryl transferaza; và
- c. trình tự nucleotit mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14).

2. Tế bào chủ không nhân chứa:

- a. *rmlB, rmlD, rmlA, rmlC, wzx, wekA, wekB, wzy, wbbJ, wbbK, và wbbL*;
- b. trình tự nucleotit mã hóa oligosacaryl transferaza;
- c. trình tự nucleotit mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14).

3. Tế bào chủ không nhân chứa:

- a. trình tự nucleotit mã hóa:
 - i, dTDP-Glucoza 4,6-dehydrataza;
 - ii, dTDP-6-Deoxy-D-Glucoza 3,5-epimeraza;
 - iii, Glucoza-1-phosphat thymidyltransferaza;
 - iv, dTDP-4-dehydrorhamnoza 3,5-epimeraza;
 - v, Flippaza của kháng nguyên O;
 - vi, dTDP-Rha:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP α -1,3-rhamnosyltransferaza;
 - vii, UDP-Glc:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP β -1,6- glucosyltransferaza;
 - viii, Polymeraza của kháng nguyên O;
 - ix, O-acetyl transferaza;
 - x, UDP-Glc:Rha-GlcNAc-UPP α -1,3-glucosyltransferaza và
 - xi, dTDP-Rha: GlcNAc-UPP α -1,3-rhamnosyltransferaza;
- b. trình tự nucleotit mã hóa oligosacaryl transferaza;
- c. trình tự nucleotit mã hóa protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14).

4. Tế bào chủ theo mục 3, trong đó:

- a. dTDP-Glucoza 4,6-dehydrataza chứa trình tự axit amin mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%,

91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với dTDP-Glucoza 4,6-dehydrataza được mã hóa bằng SEQ ID NO:1;

b. dTDP-6-Deoxy-D-Glucoza 3,5-epimeraza chứa trình tự axit amin mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với dTDP-6-Deoxy-D-Glucoza 3,5-epimeraza được mã hóa bằng SEQ ID NO:2;

c. Glucoza-1-phosphat thymidylyltransferaza chứa trình tự axit amin mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với Glucoza-1-phosphat thymidylyltransferaza được mã hóa bằng SEQ ID NO:3;

d. dTDP-4-dehydrorhamnoza 3,5-epimeraza chứa trình tự axit amin mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với dTDP-4-dehydrorhamnoza 3,5-epimeraza được mã hóa bằng SEQ ID NO:4;

e. flippaza của kháng nguyên O chứa trình tự axit amin mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với flippaza của kháng nguyên O được mã hóa bằng SEQ ID NO:5;

f. rhamnosyl transferaza của (xi) chứa trình tự axit amin mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với rhamnosyl transferaza được mã hóa bằng SEQ ID NO: 6;

g. glucosyltransferaza của (xii) chứa trình tự axit amin mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với glucosyltransferaza được mã hóa bằng SEQ ID NO:7;

h. polymeraza của kháng nguyên O chứa trình tự axit amin mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%,

91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với polymeraza của kháng nguyên O được mã hóa bằng SEQ ID NO:8;

i. *O*-axetyl transferaza chứa trình tự axit amin mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với *O*-axetyl transferaza được mã hóa bằng SEQ ID NO: 9;

j. glucosyltransferaza của (x) chứa trình tự axit amin mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với glucosyltransferaza được mã hóa bằng SEQ ID NO:10; và

k. rhamnosyltransferaza của (xi) chứa trình tự axit amin mà ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với rhamnosyltransferaza được mã hóa bằng SEQ ID NO:11.

5. Tế bào chủ theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 4, trong đó tế bào chủ là *Escherichia coli*.

6. Tế bào chủ theo mục 5, trong đó ít nhất một trong số các gen *waaL*, gen *gtrA*, gen *gtrB*, gen *gtrS*, và cụm *rfb* được loại bỏ hoặc làm bất hoạt chức năng từ hệ gen tế bào chủ.

7. Tế bào chủ theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 6, trong đó protein mang được chọn từ nhóm bao gồm ngoại độc tố A được khử độc tính của *P. Aeruginosa* (EPA), CRM197, protein gắn kết maltoza (MBP), giải độc tố bạch cầu, giải độc tố uốn ván, tan huyết tố được khử độc tính của *S. Aureus*, yếu tố kết cụm A, yếu tố kết cụm B, FimH của *E. coli*, FimHC của *E. coli*, độc tố đường ruột không bền nhiệt của *E. coli*, biến thể được khử độc tính của độc tố đường ruột không bền nhiệt của *E. coli*, tiểu đơn vị B của độc tố cholera (CTB), độc tố cholera, biến thể được khử độc tính của độc tố cholera, protein Sat của *E. coli*, vùng chờ của protein Sat của *E. coli*, Pneumolysin của *Streptococcus pneumoniae* và biến thể được khử độc tính của chúng, AcrA của *C. jejuni*, và glycoprotein tự nhiên của *C. jejuni*.

8. Tế bào chủ theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 7, trong đó protein mang chứa trình tự điều hòa quá trình N-glycosyl hóa được làm tối ưu hóa, Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15).

9. Tế bào chủ theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8, trong đó protein mang chứa một hoặc nhiều trình tự điều hòa được bổ sung bằng cách tái tổ hợp.

10. Tế bào chủ theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 9, trong đó protein mang chứa trình tự tín hiệu (trình tự đích) để hướng protein mang vào trong chu chất của tế bào chủ.

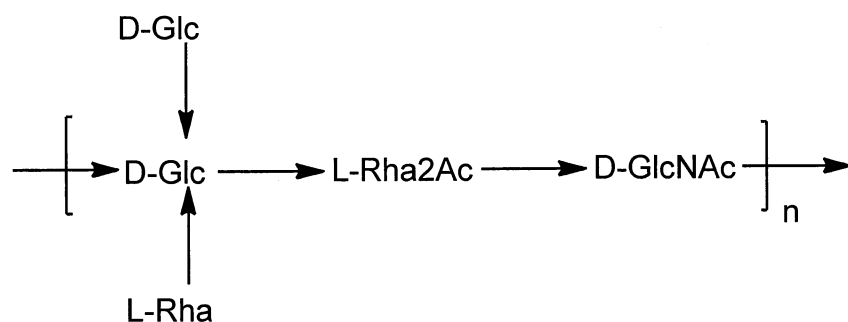
11. Tế bào chủ theo mục 10, trong đó trình tự tín hiệu được chọn từ nhóm bao gồm trình tự tín hiệu từ DsbA của *E. coli*, porin A lớp màng ngoài của *E. coli* (OmpA), protein gắn kết maltoza của *E. coli* (MalE), pectat lyaza của *Erwinia carotovora* (PelB), FlgI, NikA, hoặc endoxylanaza của *Bacillus sp.* (XynA), độc tố LTIIb đường ruột không bền nhiệt của *E. coli*, endoxylanaza XynA của *Bacillus*, hoặc flagellin của *E. coli* (FlgI).

12. Phương pháp sản xuất protein mang được N-glycosyl hóa, phương pháp này bao gồm bước:

- a. nuôi cấy tế bào chủ theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 11; và
- b. tinh chế protein mang được N-glycosyl hóa.

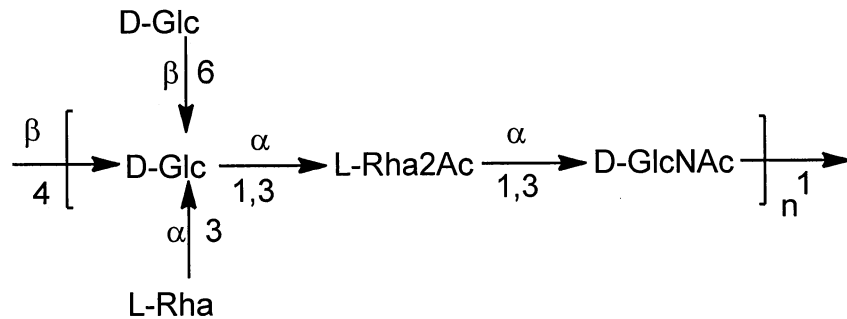
13. Protein mang được N-glycosyl hóa được tạo ra bởi phương pháp theo mục 12.

14. Protein mang được N-glycosyl hóa theo mục 13 chứa hợp chất có công thức O25B sau đây:



trong đó n là số nguyên có giá trị nằm trong khoảng từ 1 đến 30, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 5, 10 đến 30, 15 đến 30, 20 đến 30, 25 đến 30, 5 đến 25, 10 đến 25, 15 đến 25, 20 đến 25, 10 đến 20, hoặc 15 đến 20,

15. Protein mang được N-glycosyl hóa theo mục 13 chứa hợp chất có công thức O25B' sau đây:

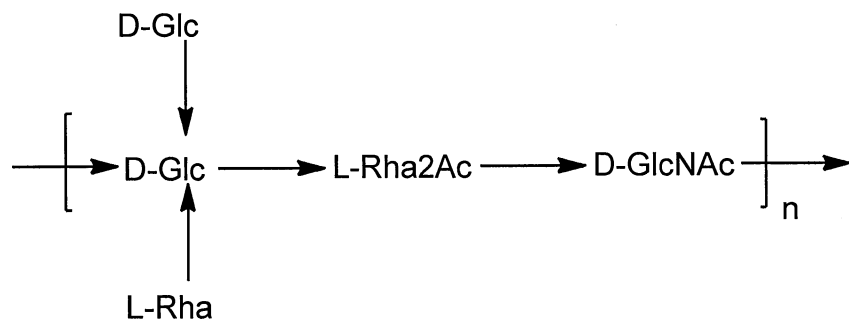


trong đó n là số nguyên có giá trị nằm trong khoảng từ 1 đến 30, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 5, 10 đến 30, 15 đến 30, 20 đến 30, 25 đến 30, 5 đến 25, 10 đến 25, 15 đến 25, 20 đến 25, 10 đến 20, hoặc 15 đến 20.

16. Kháng nguyên O được phân lập từ chủng O25B như upec138, upec163, hoặc upec177.

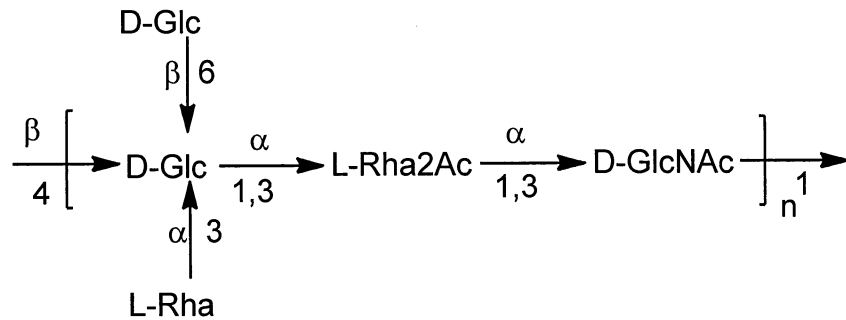
17. Protein mang được tạo liên kết thông qua nguyên tử N với kháng nguyên O theo mục 15.

18. Hỗn hợp của đại phân tử được phân lập chứa cấu trúc có công thức O25B sau đây:



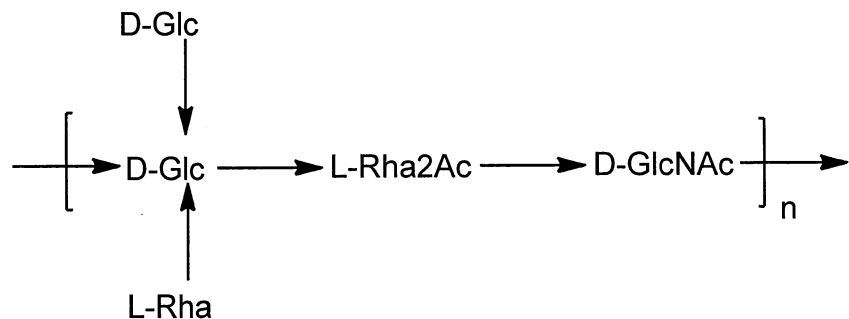
trong đó n là số nguyên có giá trị nằm trong khoảng từ 1 đến 30, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 5, 10 đến 30, 15 đến 30, 20 đến 30, 25 đến 30, 5 đến 25, 10 đến 25, 15 đến 25, 20 đến 25, 10 đến 20, hoặc 15 đến 20.

19. Hỗn hợp của đại phân tử được phân lập chứa cấu trúc có công thức O25B' sau đây:



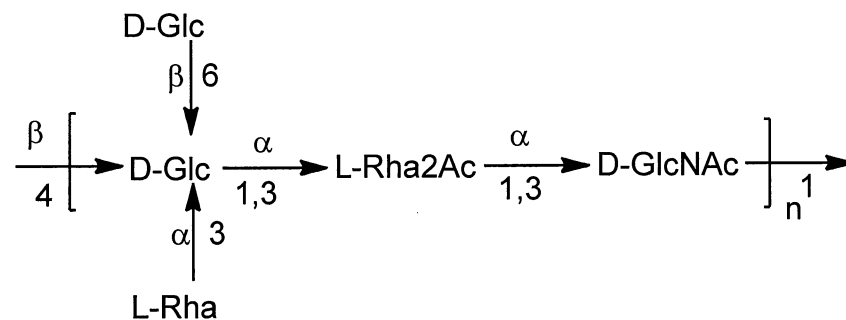
trong đó n là số nguyên có giá trị nằm trong khoảng từ 1 đến 30, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 5, 10 đến 30, 15 đến 30, 20 đến 30, 25 đến 30, 5 đến 25, 10 đến 25, 15 đến 25, 20 đến 25, 10 đến 20, hoặc 15 đến 20.

20. Dược phẩm chứa đại phân tử chứa cấu trúc có công thức O25B sau đây:



trong đó n là số nguyên có giá trị nằm trong khoảng từ 1 đến 30, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 5, 10 đến 30, 15 đến 30, 20 đến 30, 25 đến 30, 5 đến 25, 10 đến 25, 15 đến 25, 20 đến 25, 10 đến 20, hoặc 15 đến 20.

21. Dược phẩm chứa đại phân tử chứa cấu trúc có công thức O25B' sau đây sau đây:



trong đó n là số nguyên có giá trị nằm trong khoảng từ 1 đến 30, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 5, 10 đến 30, 15 đến 30, 20 đến 30, 25 đến 30, 5 đến 25, 10 đến 25, 15 đến 25, 20 đến 25, 10 đến 20, hoặc 15 đến 20.

22. Dược phẩm theo mục 20, trong đó cấu trúc có công thức O25B được liên kết cộng hóa trị với gốc Asn trong protein mang.

23. Dược phẩm theo mục 21, trong đó cấu trúc có công thức O25B' được liên kết cộng hóa trị với gốc Asn trong protein mang.

24. Dược phẩm theo mục 20 hoặc 21, trong đó gốc Asn nằm trong trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), trong đó X có thể là axit amin bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14).

25. Tế bào chủ không nhân theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 11, trong đó oligosacaryl transferaza nêu trên không tương đồng với tế bào chủ.

26. Tế bào chủ không nhân của 1 đến 11, trong đó oligosacaryl transferaza nêu trên là *C. jejuni* oligosacaryl transferaza, *pglB*.

27. Tế bào chủ không nhân theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 11, trong đó protein mang nêu trên không tương đồng với tế bào chủ.

28. Tế bào chủ không nhân theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 11, 25, 26, hoặc 27, trong đó protein mang nêu trên không phải là protein *E. coli*.

29. Phương pháp tạo ra oligosacarit chứa L-Rha(2Ac), bao gồm bước ủ sacarit hoặc oligosacarit với rhamnosyl transferaza chứa SEQ ID NO:11, trong đó sacarit hoặc oligosacarit chứa đầu cuối D-GlcNAc.

30. Phương pháp theo mục 29, trong đó L-Rha(2Ac) và D-GlcNAc được tạo liên kết thông qua liên kết alpha 1, 3.

31. Phương pháp theo mục 29, trong đó bước ủ nêu trên xảy ra trong ống nghiệm (in vitro).

32. Phương pháp theo mục 29, trong đó oligosacarit nêu trên được tạo ra trong tế bào chủ mà biểu hiện tái tổ hợp rhamnosyl transferaza chứa SEQ ID NO:11.

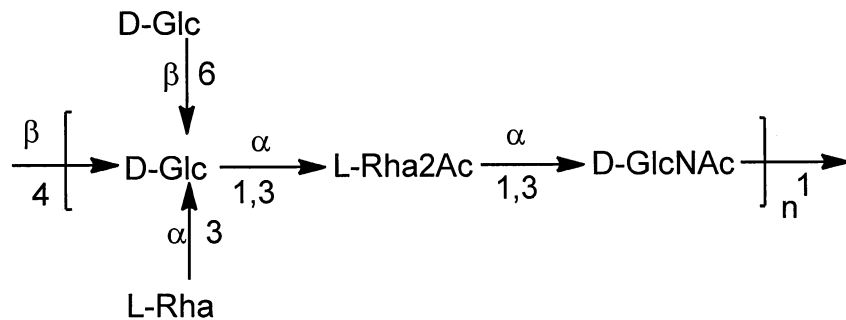
Phương án 2

1. Chế phẩm chứa (i) phức hợp sinh học O25B, chứa kháng nguyên O25B của *E.coli* được liên kết cộng hóa trị với gốc Asn của protein mang, (ii) phức hợp sinh

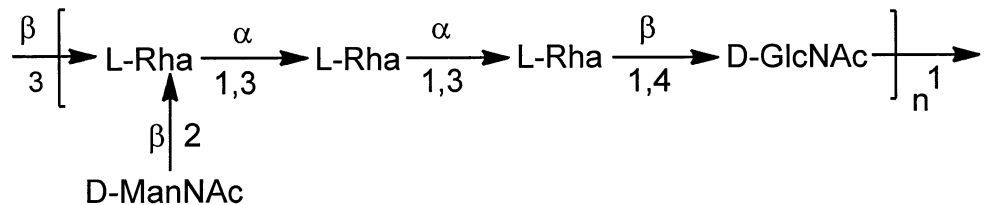
học O1A, chứa kháng nguyên O1A của *E.coli* được liên kết cộng hóa trị với gốc Asn của protein mang, (iii) phức hợp sinh học O2, chứa kháng nguyên O2 của *E.coli* được liên kết cộng hóa trị với gốc Asn của protein mang, và (iv) phức hợp sinh học O6, chứa kháng nguyên O6 của *E.coli* được liên kết cộng hóa trị với gốc Asn của protein mang.

2. Chế phẩm theo mục 1, trong đó kháng nguyên O25B, kháng nguyên O1A, kháng nguyên O6, và kháng nguyên O2 lần lượt chứa các công thức sau đây:

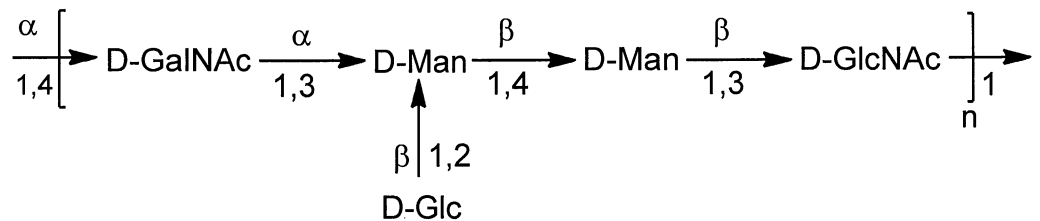
a. Công thức O25B'



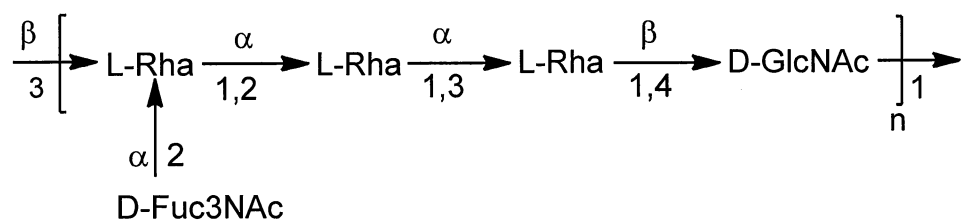
b. Công thức O1A'



c. Công thức O6Glc'



d. Công thức O2'



3. Chế phẩm theo mục 1 hoặc 2, trong đó protein mang được chọn từ nhóm bao gồm ngoại độc tố A được khử độc tính của *P. Aeruginosa* (EPA), CRM197, protein

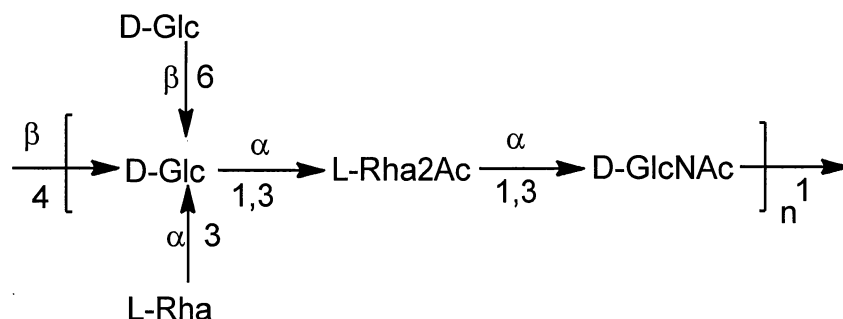
gắn kết maltoza (MBP), giải độc tố bạch cầu, giải độc tố uốn ván, tan huyết tố được khử độc tính của *S. Aureus*, yếu tố kết cụm A, yếu tố kết cụm B, FimH của *E. coli*, FimHC của *E. coli*, độc tố đường ruột không bền nhiệt của *E. coli*, biến thể được khử độc tính của độc tố đường ruột không bền nhiệt của *E. coli*, tiểu đơn vị B của độc tố cholera (CTB), độc tố cholera, biến thể được khử độc tính của độc tố cholera, protein Sat của *E. coli*, vùng chờ của protein Sat của *E. coli*, Pneumolysin của *Streptococcus pneumoniae* và biến thể được khử độc tính của chúng, AcrA của *C. jejuni*, và glycoprotein tự nhiên của *C. jejuni*.

4. Chế phẩm theo mục 3, trong đó protein mang là EPA được khử độc tính, CRM197, hoặc MBP.
5. Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 4, trong đó gốc Asn của protein mang nằm trong trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15).
6. Phương pháp điều trị sự nhiễm trùng cho đối tượng mắc *Escherichia coli* gây bệnh ngoài đường ruột, trong đó phương pháp này bao gồm bước sử dụng cho đối tượng lượng hữu hiệu của chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 5.
7. Phương pháp ngăn ngừa sự nhiễm trùng cho đối tượng mắc *Escherichia coli* gây bệnh ngoài đường ruột, trong đó phương pháp này bao gồm bước sử dụng cho đối tượng lượng hữu hiệu của chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 5.
8. Phương pháp tạo ra đáp ứng miễn dịch cho đối tượng chống lại *Escherichia coli* gây bệnh ngoài đường ruột, trong đó phương pháp này bao gồm bước sử dụng cho đối tượng lượng hữu hiệu của chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 5.
9. Phương pháp tạo ra sự sản xuất kháng thể thực bào opsonin cho đối tượng mà đặc hiệu với *Escherichia coli* gây bệnh ngoài đường ruột, trong đó phương pháp này bao gồm bước sử dụng cho đối tượng lượng hữu hiệu của chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 5.

10. Phương pháp theo mục 6, 8, hoặc 9, trong đó đối tượng nêu trên được chẩn đoán mắc phải sự nhiễm trùng đường tiết niệu.
11. Phương pháp theo mục 7, 8, hoặc 9, trong đó đối tượng có nguy cơ phát triển sự nhiễm trùng đường tiết niệu.
12. Phương pháp theo mục 6, 8, hoặc 9, trong đó đối tượng nêu trên được chẩn đoán mắc phải sự nhiễm trùng huyết.
13. Phương pháp theo mục 7, 8, hoặc 9, trong đó đối tượng có nguy cơ phát triển sự nhiễm trùng huyết.
14. Phương pháp theo mục 6, 8, hoặc 9, trong đó đối tượng nêu trên được chẩn đoán mắc phải sự nhiễm trùng.
15. Phương pháp theo mục 7, 8, hoặc 9, trong đó đối tượng có nguy cơ phát triển sự nhiễm trùng.
16. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 6 đến 16, trong đó đối tượng là người.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm chứa phức hợp sinh học của kháng nguyên O25B của *E.coli* được liên kết cộng hóa trị với protein mang, trong đó kháng nguyên O25B của *E.coli* chứa cấu trúc có công thức O25B' sau đây:



trong đó n là số nguyên từ 1 và 30.

2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó kháng nguyên O25B của *E.coli* được liên kết cộng hóa trị với gốc Asn trong protein mang.

3. Chế phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó protein mang được chọn từ nhóm bao gồm ngoại độc tố (Exotoxin) A được khử độc tính của *P. Aeruginosa* (EPA), CRM197, protein gắn kết maltoza (MBP), giải độc tố bạch cầu, giải độc tố uốn ván, tan huyết tố A được khử độc tính của *S. Aureus*, yếu tố kết cụm A, yếu tố kết cụm B, FimH của *E. coli*, FimHC của *E. coli*, độc tố đường ruột không bền nhiệt của *E. coli*, biến thể được khử độc tính của độc tố đường ruột không bền nhiệt của *E. coli*, tiểu đơn vị B của độc tố cholera (CTB), độc tố cholera, biến thể được khử độc tính của độc tố cholera, protein Sat của *E. coli*, vùng chờ của protein Sat của *E. coli*, Pneumolysin của *Streptococcus pneumoniae* và biến thể được khử độc tính của chúng, AcrA của *C. jejuni*, và glycoprotein tự nhiên của *C. jejuni*.

4. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó protein mang là EPA được khử độc tính.

5. Chế phẩm theo điểm 4, trong đó kháng nguyên O25B liên kết cộng hóa trị với gốc Asn trong EPA được khử độc tính, và gốc Asn của protein mang nằm trong trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập với nhau được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15).

6. Tế bào chủ không nhân tái tổ hợp để tạo ra phức hợp sinh học của kháng nguyên O25B của *E.coli* liên kết cộng hóa trị với protein mang, chứa:

a) trình tự nucleotit chứa cụm gen *rfb* mã hóa cho kháng nguyên O25B của *E.coli*, trong đó cụm gen *rfb* mã hóa:

- i, dTDP-Glucoza 4,6-dehydrataza;
- ii, dTDP-6-Deoxy-D-Glucoza 3,5-epimeraza;
- iii, Glucoza-1-phosphat thymidyltransferaza;
- iv, dTDP-4-dehydrorhamnoza 3,5-epimeraza;
- v, Flippaza của kháng nguyên O;
- vi, dTDP-Rha:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP α -1,3-rhamnosyltransferaza;
- vii, UDP-Glc:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP β -1,6-glucosyltransferaza;
- viii, Polymeraza của kháng nguyên O;
- ix, O-acetyl transferaza;
- x, UDP-Glc:Rha-GlcNAc-UPP α -1,3-glucosyltransferaza và
- xi, dTDP-Rha: GlcNAc-UPP α -1,3-rhamnosyltransferaza;

b) trình tự nucleotit mã hóa oligosacaryl transferaza; và

c) trình tự nucleotit mã hóa cho protein mang trong đó protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), và X là axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14).

7. Tế bào chủ không nhân tái tổ hợp theo điểm 6, trong đó trình tự nucleotit của (c) mã hóa cho protein mang chứa trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15).

8. Tế bào chủ không nhân tái tổ hợp theo điểm 6, trong đó trình tự nucleotit của (a) chứa các gen *rmlB*, *rmlD*, *rmlA*, *rmlC*, *wxz*, *wekA*, *wekB*, *wzy*, *wbbJ*, *wbbK*, và *wbbL*.

9. Tế bào chủ không nhân tái tổ hợp theo điểm 6, trong đó trình tự nucleotit của (a) bao gồm cụm gen *rfb* có trình tự nucleotit SEQ ID NO: 12.

10. Tế bào chủ không nhân tái tổ hợp theo điểm 6, trong đó ít nhất một trong số các gen *waaL*, gen *gtrA*, gen *gtrB*, gen *gtrS*, hoặc cụm *rfb* được loại bỏ từ hoặc làm bất hoạt chức năng trong hệ gen của tế bào chủ này.

11. Tế bào chủ không nhân tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 10, trong đó protein mang được chọn từ nhóm bao gồm ngoại độc tố A được khử độc tính của *P. Aeruginosa* (EPA), CRM197, protein gắn kết maltoza (MBP), giải độc tố bạch cầu, giải độc tố uốn ván, tan huyết tố A được khử độc tính của *S. Aureus*, yếu tố kết cụm A, yếu tố kết cụm B, FimH của *E. coli*, FimHC của *E. coli*, độc tố đường ruột không bền nhiệt của *E. coli*, biến thể được khử độc tính của độc tố đường ruột không bền nhiệt của *E. coli*, tiểu đơn vị B của độc tố cholera (CTB), độc tố cholera, biến thể được khử độc tính của độc tố cholera, protein Sat của *E. coli*, vùng chờ của protein Sat của *E. coli*, Pneumolysin của *Streptococcus pneumoniae* và biến thể được khử độc tính của chúng, AcrA của *C. jejuni*, và glycoprotein tự nhiên của *C. jejuni*.

12. Tế bào chủ không nhân tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 11, trong đó tế bào chủ là tế bào chủ *E. coli*.

13. Phương pháp sản xuất phức hợp sinh học của kháng nguyên O25B của *E.coli* liên kết cộng hóa trị với protein mang, phương pháp này bao gồm các bước:

a) nuôi cấy tế bào chủ theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 12 trong điều kiện sản xuất phức hợp sinh học; và

b) tinh chế phức hợp sinh học này.

14. Phức hợp sinh học của kháng nguyên O25B của *E.coli* liên kết cộng hóa trị với protein mang, trong đó phức hợp sinh học này được sản xuất theo phương pháp bao gồm:

a) nuôi cấy tế bào chủ không nhân tái tổ hợp trong điều kiện sản xuất phức hợp sinh học, tế bào chủ này chứa:

i. trình tự nucleotit chứa cụm gen *rfb* mã hóa cho kháng nguyên O25B của *E.coli*, trong đó cụm gen *rfb* mã hóa:

a. dTDP-Glucose 4,6-dehydratase;

b. dTDP-6-Deoxy-D-Glucose 3,5-epimerase;

c. Glucose-1-phosphate thymidyltransferase;

- d. dTDP-4-dehydrorhamnoza 3,5-epimeraza;
- e. Flippaza của kháng nguyên O;
- f. dTDP-Rha:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP α -1,3-rhamnosyltransferaza;
- g. UDP-Glc:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP β -1,6- glucosyltransferaza;
- h. Polymeraza của kháng nguyên O;
- i. O-acetyl transferaza;
- j. UDP-Glc:Rha-GlcNAc-UPP α -1,3-glucosyltransferaza và
- k. dTDP-Rha: GlcNAc-UPP α -1,3-rhamnosyltransferaza;

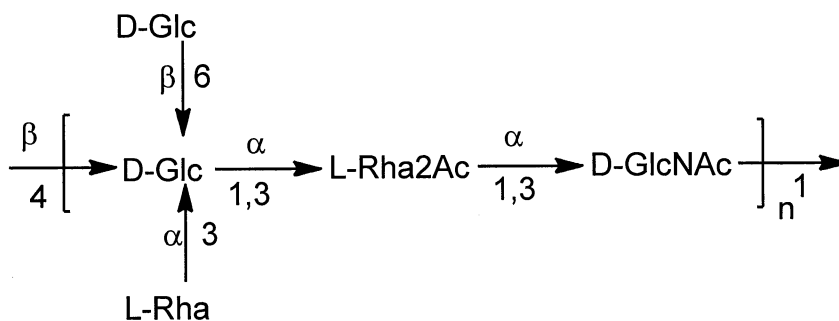
b) trình tự nucleotit mã hóa oligosacaryl transferaza; và

c) trình tự nucleotit mã hóa cho protein mang, trong đó protein mang chứa trình tự điều hòa Asn-X-Ser(Thr), và X là axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:14); và

b) tính chế phức hợp sinh học này.

15. Chế phẩm chứa phức hợp sinh học theo điểm 14.

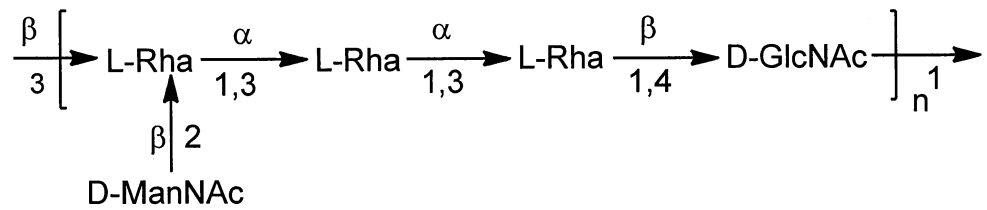
16. Chế phẩm chứa phức hợp sinh học của kháng nguyên O25B của *E.coli* liên kết cộng hóa trị với protein mang, (ii) phức hợp sinh học của kháng nguyên O1A của *E.coli* được liên kết cộng hóa trị với protein mang, (iii) phức hợp sinh học của kháng nguyên O2 của *E.coli* được liên kết cộng hóa trị với protein mang, và (iv) phức hợp sinh học của kháng nguyên O6 liên kết cộng hóa trị với protein mang, trong đó kháng nguyên O25B của *E.coli* chứa cấu trúc có công thức O25B':



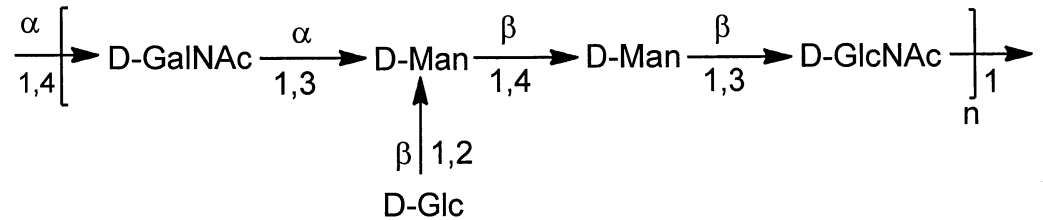
trong đó n là số nguyên từ 1 và 30.

17. Chế phẩm theo điểm 16, trong đó kháng nguyên O1A, kháng nguyên O6, và kháng nguyên O2 lần lượt chứa công thức sau đây:

a) công thức O1A'

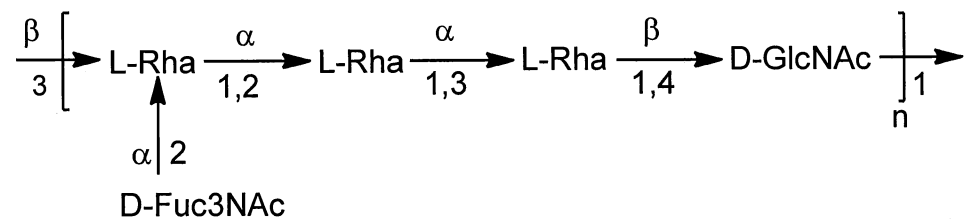


b) công thức O6Glc'



, và

c) công thức O2'



18. Chế phẩm theo điểm 16 hoặc 17, trong đó kháng nguyên O25B của *E.coli* được liên kết cộng hóa trị với gốc Asn trong protein mang.

19. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 16-18, trong đó (i) kháng nguyên O1A của *E.coli* được liên kết cộng hóa trị với gốc Asn của protein mang, (ii) kháng nguyên O2 của *E.coli* được liên kết cộng hóa trị với gốc Asn của protein mang, và (iii) kháng nguyên O6 của *E.coli* được liên kết cộng hóa trị với gốc Asn của protein mang.

20. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 16-19, trong đó protein mang được chọn từ nhóm bao gồm ngoại độc tố A được khử độc tính của *P. Aeruginosa* (EPA), CRM197, protein gắn kết maltoza (MBP), giải độc tố bạch cầu, giải độc tố uốn ván, tan huyết tố A được khử độc tính của *S. Aureus*, yếu tố kết cụm A, yếu tố kết cụm B, Emil của *E. coli*, FimH của *E. coli*, độc tố đường ruột không bền nhiệt của *E. coli*, biến thể được khử độc tính của độc tố đường ruột không bền nhiệt của *E. coli*, tiểu đơn vị B của độc tố cholera (CTB), độc tố cholera, biến thể được khử độc tính của độc tố cholera, protein Sat của *E. coli*, vùng chờ của protein Sat của *E.*

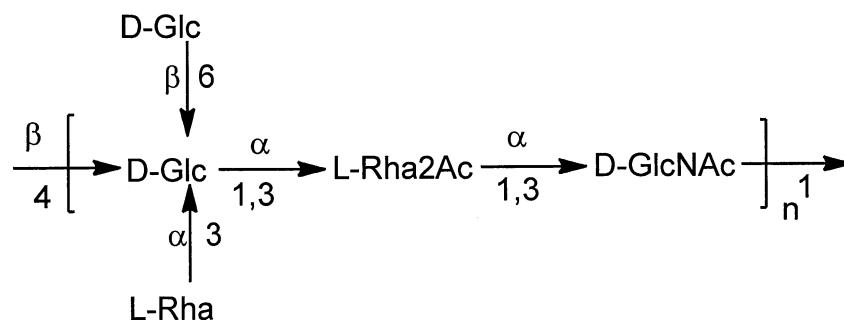
coli, Pneumolysin của *Streptococcus pneumoniae* và biến thể được khử độc tính của chúng, AcrA của *C. jejuni*, và glycoprotein tự nhiên của *C. jejuni*.

21. Chế phẩm theo điểm 20, trong đó protein mang là EPA được khử độc tính.

22. Chế phẩm theo điểm 18, trong đó gốc Asn của protein mang nằm trong trình tự điều hòa Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), trong đó X và Z độc lập được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ trừ Pro (SEQ ID NO:15).

23. Chế phẩm chứa phức hợp sinh học của kháng nguyên O25B của *E.coli* liên kết cộng hóa trị với gốc Asn của ngoại độc tố A được khử độc tính của *P. Aeruginosa* (EPA), (ii) phức hợp sinh học của kháng nguyên O1A của *E.coli* được liên kết cộng hóa trị với gốc Asn của EPA được khử độc tính, (iii) phức hợp sinh học của kháng nguyên O2 của *E.coli* được liên kết cộng hóa trị với gốc Asn của EPA được khử độc tính, và (iv) phức hợp sinh học của kháng nguyên O6 được liên kết cộng hóa trị với gốc Asn của EPA được khử độc tính,

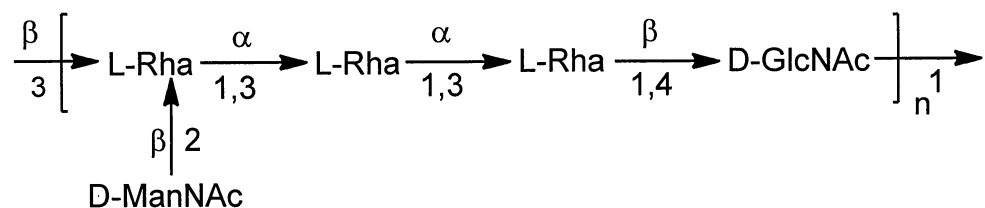
trong đó kháng nguyên O25B của *E.coli* chứa cấu trúc có công thức O25B' sau đây:



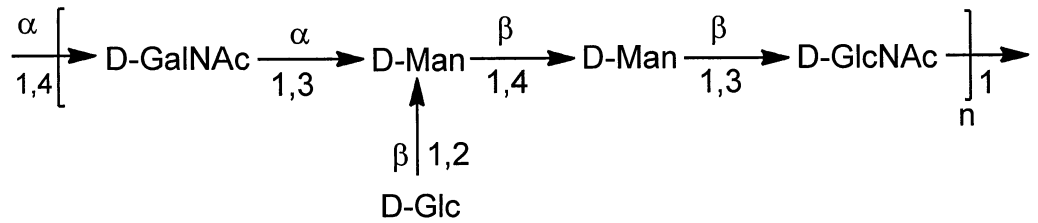
trong đó n là số nguyên từ 1 và 30.

24. Chế phẩm theo điểm 23, trong đó kháng nguyên O1A, kháng nguyên O6, và kháng nguyên O2 lần lượt có công thức sau đây:

a) công thức O1A'

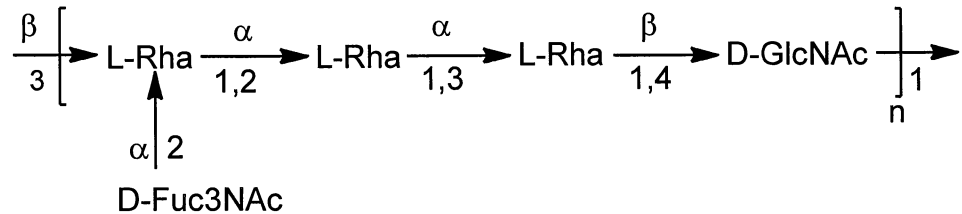


b) công thức O6Glc'



, và

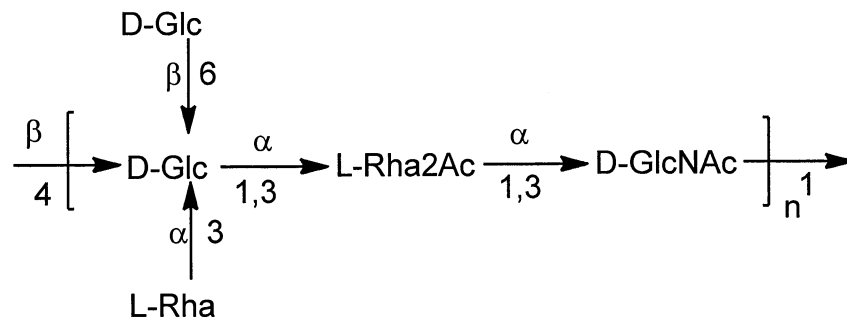
c) công thức O2'



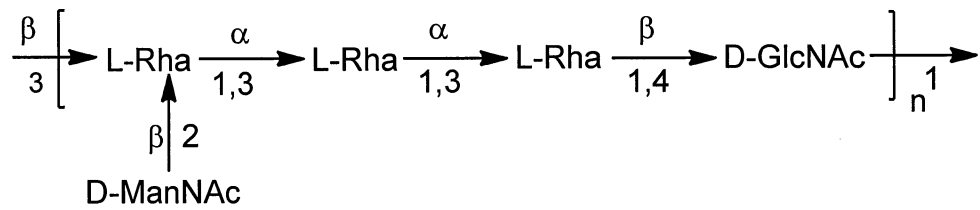
25. Chế phẩm gây miễn dịch chứa (i) phức hợp sinh học của kháng nguyên O25B của *E.coli* liên kết cộng hóa trị với gốc Asn của ngoại độc tố A được khử độc tính của *P. aeruginosa* (EPA), (ii) phức hợp sinh học của kháng nguyên O1A của *E.coli* được liên kết cộng hóa trị với gốc Asn của EPA được khử độc tính, (iii) phức hợp sinh học của kháng nguyên O2 của *E.coli* được liên kết cộng hóa trị với gốc Asn của EPA được khử độc tính, và (iv) phức hợp sinh học của kháng nguyên O6 được liên kết cộng hóa trị với gốc Asn của EPA được khử độc tính,

trong đó kháng nguyên O25B, kháng nguyên O1A, kháng nguyên O6, và kháng nguyên O2 của *E.coli* lần lượt có công thức sau đây:

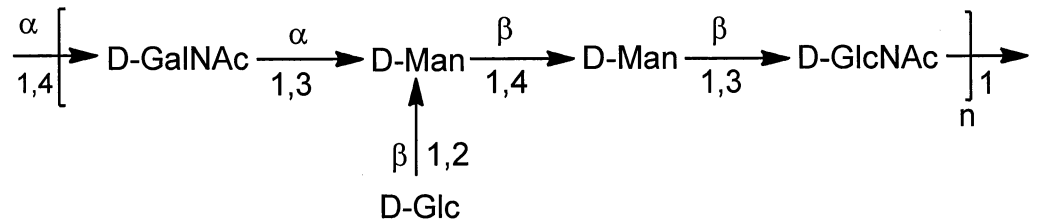
a. công thức O25B':



b. công thức O1A'

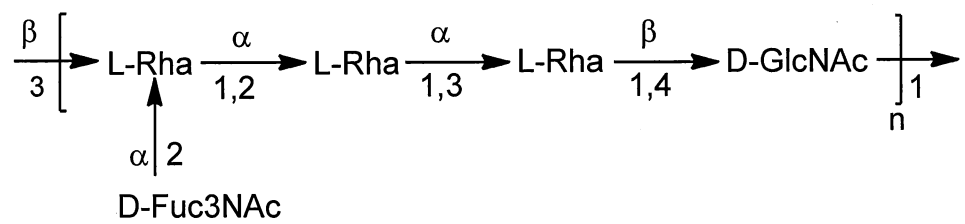


c. công thức O6Glc'



, và

d. công thức O2'



trong đó n là số nguyên từ 1 và 30.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> GlycoVaxyn AG
 <120> CHẾ PHẨM CHỨA PHỨC HỢP SINH HỌC O25B VÀ TẾ BÀO CHỦ KHÔNG NHÂN
 SẴN XUẤT PHỨC HỢP SINH HỌC O25B
 <130> 13064-042
 <140> TBA
 <141> Cùng ngày
 <150> 61/943,710
 <151> 2014-02-24
 <160> 15
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 1086
 <212> ADN
 <213> E. Coli
 <220>
 <223> rmlB (upec138)
 <400> 1
 gtgaagatac ttgttactgg tggcgcagga tttattgggt ctgctgttgt tcgtcacata
 60
 ataaataata cgcaagatag tgttgttaat gtcgataaat taacatacgc cggaaacctg
 120
 gaatcacttg cagatgtttc tgattctgaa cgctatttct ttgaacatgc ggatatttgt
 180
 gatgcagctg caatggcacg gatttttgct cagcatcagc cggatgcagt gatgcacctg
 240
 gcagctgaaa gccatgttga ccgttcaatt acaggccctg cggcatttat tgaaaccaat
 300
 attgtgggta cttatgtcct tttagaagcg gtcggaatt attggtctgg tctggatgat
 360
 gaaaagaaaa aaaacttccg ttttcatcat atttctactg atgaggtgta tggtgactta
 420
 ccccatccgg atgaagtaaa tagcaatgaa acgttgccgc tatttacgga aacgacagca
 480

tacgcgccaa gtagtccata ttctgcttct aaagcttcca gcgatcattt gggtcgcgca
540

tggaacgta cttatgggtt accgaccatt gtgactaatt gctcgaacaa ctatggctct
600

tatcatttcc cgaaaagct tattccactg gttattctta attcactgga aggtaaggca
660

ttacctattt atggcaaagg agatcagatc cgcgactggg tgtatgtaga ggatcatgct
720

cgagcgttat ataccgtcgt aaccgaagggt aaagcgggcg aaacttataa cattgggtgga
780

cacaacgaaa agaaaaacat cgacgtagtg ttcactattt gtgatttggt ggatgagata
840

gtcccgaag agaaatctta ccgcgagcaa attacttatg ttaccgatcg tccgggacac
900

gatcgccgtt atgcgattga tgctgagaag attggtcgcg aattgggatg gaaaccacag
960

gaaacgtttg agagtgggat tcgtaaaacg gtggaatggt acctgtccaa tacaaaatgg
1020

gttgataatg tgaaaagtgg tgcctatcaa tcgtggattg aacagaacta tgagggccgc
1080

cagtaa
1086

<210> 2
<211> 900
<212> ADN
<213> E. Coli

<220>
<223> rmlD (upec138)

<400> 2
atgaatafcc tccttttttg caaacaggg caggtagggt gggaactaca gcgtgctctg
60

gcacctctgg gtaatttgat tgctcttgat gttcactcca ctgattactg tgggtgatttt
120

agtaatcctg aaggtgtagc tgaaaccgta agaagcattc ggctgatat tattgtcaac
180

gcagccgctc acaccgcagt agacaaagca gaatcagaac cgaagtttgc acaattactg
240

aacgcgacga gtgtcgaagc gatcgcgaaa gcagccaatg aagtcggcgc ctgggttatt
300

cactactcta ctgactacgt atttccgggg accggtgaaa taccatggca ggaggaggat
360

gcaaccgcac cgctaaatgt ttacggtgaa accaagttag cgggagaaaa agcattacaa
420

gagcattgtg cgaagcacct tattttccgg accagctggg tctatgcagg taaaggaaat
480

aacttcgcca aaacaatggt gcgctctggca aaagagcgtg aagaattagc cgttattaat
540

gatcagtttg gtgcgccaac tggcgcgagag ttactggctg attgtacggc acatgctatt
600

cgtgtggcac tgaataaacc ggaagtcgca ggcttgtacc atctggtagc tagtgggtacc
660

acaacgtggc acgattatgc tgcgctgggt tttgaagagg cgcgcaaagc aggcatcccc
720

cttgcaactca acaagctcaa cgcagtagca acaacagcct atcctacacc agctcgtcgt
780

ccacataact ctcgccttaa tacagaaaaa tttcagcaga actttgcgct tgtcttgcct
840

gactggcagg ttggcgtgaa acgaatgctt aacgaattat ttacgactac agcaatttaa
900

<210> 3
<211> 879
<212> ADN
<213> E. Coli

<220>
<223> rmlA (upec138)

<400> 3
atgaaaacgc gtaaaggtat tattttggcg ggtgggttctg gtactcgtct ttatcctgtg
60

acgatggccg tcagtaaaca gctggttaccg atttatgata aaccgatgat ctattacccg
120

ctctctacac tgatgttagc gggatttcgc gatattctga ttatcagtag accacaggat
180

actcctcggt ttcaacaact gctgggtgac gggagccagt ggggcctgaa tcttcagtag
240

aaagtgcac cgagtcgga tgggtcttgc caggcggtta ttatcggtag agagtttatt
300

ggtggtgatg attgtgcttt ggtacttggg gataatatct tctacggcca cgacctgccg
360

aagttaatgg acgtagctgt taacaaagaa agtggtgcaa cggattttgc ctatcacgtt
420

aatgatcctg aacgttatgg tgtcgtggag tttgataata acggtactgc aattagcctg
480

gaagaaaaac cgctggaacc aaaaagtaac tatgcggtta ctgggcttta tttctatgac
540

aatgacgttg tggaaatggc gaaaaacctt aagccttctg cccgaggtga actggaaatt
600

accgatatta accgtattta tatggaacaa ggacgtttgt ctgtcgtat gatggggcgt
660

ggctatgcat ggctggatac agggacgcat caaagtctta ttgaagcaag caacttcatt
720

gccaccattg aagagcgcca gggactaaag gtttcctgtc cggaagaaat tgcttatcgt
780

aaagggttta ttgatgctga gcaggtaaaa gtattagccg aaccgttgaa gaaaaatgct
840

tatgggtcagt atctgctcaa aatgattaaa ggttattaa
879

<210> 4
<211> 543
<212> ADN
<213> E. Coli

<220>
<223> rmlC (upec138)

<400> 4
atgaacgtaa ttaaaactga aattcctgat gtgctgattt ttgaaccaaa agtttttggg
60

gatgaacgtg gcttcttttt tgagagtttt aatcagagga tttttgaaga agcagtaggt
120

cgtaagggtg agtttggttca ggataaccat tctaagtcca gtaaagggtg tttacgtggt
180

cttcattatc agttagaacc ttatgctcaa ggaaaactgg tgcgctgtgt tgttggcgag
240

gtttttgatg ttgcggttga tattcgtaaa tcgtcaccta catttgggaa atgggttggg
300

gtgaatttgt ctgctgagaa taagcgtcag ttgtggattc ctgagggatt tgcacatggt
360

tttttggtgc tgagtgattt agcagaagtt ttatataaaa cgaatcaata ttatgctcca
420

tcacatgaaa aaaatattat atggaatgac ctcttgctta atattaaatg gccgagcaca
480

gcactgatca ctctgtctga taaggatgca aatggggaaa gatttgaact aagtgagttt
540

tga
543

<210> 5
<211> 1260
<212> ADN
<213> E. Coli

<220>
<223> wx (upec138)

<400> 5
atgtctctct taaaacatag tatatggaat gttgcgggct actttatacc aacattaatt
60

gcaattcccg cctttggatt aattgcgagg aaaattgggtg tagaactatt tggtttgtat
120

acgttagcaa tgatttttat agggatatgca agtatatttg atgctggggtt aacaagagct
180

gttgtgctg aaatagcatt actaaaaaac agagtggacg attgtaatac gataatagta
240

acttctatta tcgctgtgat atttttaggg ttatcggag gcgggggagt gtttctgctt
300

aaaggcgata ttattgaact gttaaataac tcaccaatat attacgccga ttcgataaag
360

tctctagtat tattatcatc tctgatacct gtattccttag tcacgcaaact actattagca
420

gagcttgagg gtcgggaata ttttgggatt ctaaataatc aaaaaagtgt agggaattct
480

ttaattgcag ggttacctgc attatttggt ttaattaatc aaacgctttt ttctgcaatt
540

attggtgtag cgattgcaag agttatatgc ttgtgggttaa gctacattat gagcagggaa
600

agaataacta tcgatatctc atttttttca ataactgttt taaagcgggtt atttagatat
660

ggcgggtggg taactataag taacataata tctcctatat tagcgagtat gtagatagatt
720

attctatccc atatccaggg agcatcaaaa atatcattct atacagtccc taatgagctg
780

gtaactaggc ttggaatagt tccaggctct cttgggaaag ctgtttttcc aaaattaagt
840

catgcaagga attttacagc gtcatatgca gagcaaaaaa aagcttatat attaatagact
900

gtcattgtaa tgcctttggt tttatttgta tattattacg caaagtttat tttaacattg
960

tggatggggg ctgagtatgc agggatttcg gtcgaaatat tacggattat gcttataggg
1020

tatatattta actgttattc acaaactctt tttgccaaca tacaggcctt tggaaaagca
1080

aaatacactg catacatcca tatgatggaa tttattcctt atttgataat gttatatata
1140

atttcaaagg aatatggggg tattggtggt gcgtgggttat ggacaattcg agtaataatt
1200

gattttttga tgcttttata tatgagttat cgttgtaata atcttatgaa aaaagggtag
1260

<210> 6
<211> 966
<212> ADN

<213> E. Coli

<220>

<223> wekA (upec138)

<400> 6

atgatataata ttgtggtatt aaattggaat ggggctatag ataccattaa ttgtgttaaa
60

agtttaatgg atttaaattg tagcgattat aaaattatca ttgttgataa ctgttctatg
120

gataactcat atgatactat aaaagaaaat cttaattcat tatatatatgc tgataaaaagt
180

atcattgagg tgaagtatga ggatagaaat aaatataaaa ccttagaaaa cgataaaaatc
240

atattaatac aatctccgca aaataatggg tacgcaagtg gtaataatat tggcatagag
300

ttcgctctta atcaggagaa tatgaaatac gtctgggttc tgaataatga tactgaagtg
360

gataaagagg ctttaactca ttttaattagt aaatgtgatt cagataaaaag tatagggatt
420

tgcggttctc gtttagtcta ttttgccgac agagagatgc agcaaggact aggtgggggtg
480

cataacaaat ggttatgcac tacaaaaaat tatgaaatgg gaagattagt ttccaaaaaa
540

tatgatgatg aagtcattag taatgatata gattatataa ttggcgcatc gatgtttttc
600

tctagagaat gtttggaac agttggattg atgaatgaag aatatttttt atactatgaa
660

gagttagata ttgacctcag agcaaaagca aagaacttta aattaggtat ttgctcagaa
720

agtttggttt atcataaaat aggtgcaagt actgatgggg gaaagagcat gatggctgat
780

ctttgctcaa taaaaaatag gctggtcatt acagaaagggt tttatcccca atattattgg
840

acggtatggg tgtcactttt tgtttagca ttttaaccgtg ctagaagagg tgagtttaat
900

aagatgaaaa gatgtttgaa tgttatgttt aacttcaaac gaaacaaagg tagcaaatgc
960

cattag
966

<210> 7
<211> 1149
<212> ADN
<213> E. Coli

<220>
<223> wekB (upec138)

<400> 7
atgaaagtgg cttttttatc tgcttatgat ccactatcta catccagttg gtctggcaca
60

ccttattata tgctaaaggc attatcgaag agaaatattt ccattgaaat attaggaccg
120

gtaaatagct atatgatata catgttaaaa gtatataaat taatattaag gtgtttcgga
180

aaagaatatg attatagtca ttcgaagttg ctttccaggt attacggtag aatattcggt
240

aggaaattaa aaaaaattga tggtttggat tttattatcg cacctgcagg ttcctcacia
300

attgcttttt taaaaacaac cataccaata atatatctat cggatacaac atatgatcaa
360

ttaaaaagct attatccgaa tttaaataaa aaaacaatta taaatgatga ggatgcaagt
420

ttaatcgaac gcaaggctat tgaaaaagca acagtagtat ctttcccatc taaatgggca
480

atggattttt gcaggaatta ttacagatta gattttgata aattagttga aataccatgg
540

ggggctaatt tatttgatga tattcacttt gctaataaaa atataattca aaagaatagt
600

tatacttgtc ttttcttggg agttgattgg gaaagaaaag gtgggaaaac agccttgaaa
660

gcaattgaat atgtaaggca gttatatggg atcgatgtta gactaaaaat ttgtggatgt
720

actccgaatc aaaagatttt acctacttgg gttgaattaa ttgataaagt agataaaaaat
780

aacgttgacg aatatcagaa attcatcgat gtgttatcta acgctgatat acttctttta
840

ccaaccattg ctgaatgtta tggaatggta ttttgtgaag ctgctgcttt tggattgcct
900

gttgctgcta cagatacagg tggagtcagt tctatagtta tcaacgaaag gacggggata
960

ttaattaaag acccgttaga ctataagcac tttggaaatg caattcataa aataattagt
1020

tccgtagaga cttatcaaaa ctactcccaa aacgcaagaa ttagatataa taatatattg
1080

cattgggaca attgggctaa aaagataatt gagattatgt atgagcataa gaatagaaga
1140

atcaaatag
1149

<210> 8
<211> 1218
<212> ADN
<213> E. Coli

<220>
<223> wzy (upec138)

<400> 8
atgagcataa gaatagaaga atcaaatagc acaaaaagaa ttatatgttt atttatactt
60

tttcttggtt tccctgattt tttgttttat acattagggg ttgataattt tagcatttca
120

acgataatct caattacatt gctttttggt tttttaagag ctaaaaatat ttgcaaagat
180

aattttctaa taatagtagc gttattcata ttgttggtgt ttaactgttt gttaagtatg
240

ctatttaata ttgaacaggc ttttaacattt aaagttgtac tttcaatata tagcatctta
300

ataatggcat acgtctcctc ttgttatgca cagacgttgt gggttatgttc tgaagaaata
360

cttaagagat ccgctctttta tttgttcgca tttcttttgcc ttattggcat tataagtatt
420

cttttacaga agactgagat tatacatgat aaaagtatga ttctttttcc tgaaccatca
480

gcatttgcat tgggtttttat acctatcttt tcattttggt tatactatac aagagggggg
540

gggctactat tgctctatat attatctttg ggtattgcgt taggtatcca gaatttaaca
600

atgttggttag gcattgtgat tagtggtttt gtgatgaaaa aaataactat aaggcaaact
660

attgttatac ttttgggggc atggattttt tccatgatat taagtgattt agacatttct
720

tactatacat cgcggttga ttttaaaaat actacgaacc tatcagtgc tgtatatctt
780

tcaggaattg aaagagcttt cttgaatttt attacaagtt atgggtcttg tattgggttt
840

caacaaatgg gagtgaatgg ggagatagga atatatcaac aaattttagc tgaacttgat
900

gcccctatgt taaatatata cgatggctca tttatttctt ctaagttaat atctgagttt
960

ggggttattg gtgcattaat gtgtattttc tatttttttt atttttcccg attttatctg
1020

cgtttcaaaa aaagtaagag atattcaccg cagtatattt tagcatatag cttctacatg
1080

tgttttcttca tccctctttt tatacgtggg gctgggtata taaacccta tgtgtttatg
1140

ttattttcat caatatTTTT gtgcaaatat cacgctaaaa atatcttgat gaaatcta
1200

gtccagatag ctatataa
1218

<210> 9
<211> 606
<212> ADN
<213> E. Coli

<220>

<223> wbbJ (upec138)

<400> 9

atgtgcatta aaaaaaaact taagttaatt aaacgatatg gcctttatgg tggctcttagg
60

cttcttaaag atatattctt aacaaaatTT ttattttggt caaatggttag gattattaga
120

tttccatggt atattagaaa agatggaagt gttagttttg gaaaagggtt tacatcaggt
180

gtaggattac gagttgatgc atttatggat gccgtagttt ccattggaga aaatgttcaa
240

attaatgact atgttcacat cgcggctatt aataatgtca ttattggttag agatacatta
300

atagcaagta aagtatttat tagtgatcat aatcatggta ttttttctaa atccgatatc
360

catagttcac caactattat tccttcgtct aggcccttg aatctgcacc tgtgtatatt
420

ggagagcgtg tgtggattgg cgaaaatgtg acaatattac caggtgcgtg tataggtaat
480

ggtgtagtta ttggcgcaaa cagtgttggt cgtggtgaga ttcttaataa tgtgatcatt
540

gctggtgttc cagctaaaat tgttaaaaaa tataactatg agcgtatgca atgggaaaga
600

atatag
606

<210> 10

<211> 1101

<212> ADN

<213> E. Coli

<220>

<223> wbbK (upec138)

<400> 10

atgggaaaga atatagttgt aatatcggct gttaatttta caaccggagg cccctttacc
60

gtactaaaaa atgtgcttac agcaactaaa gatagagccg aatgtaaatt tattgcactg
120

gttcatagct ctgctgaact aatggaatta tttccgtggg ttgaatttat agagtatcca
180

gaagtcaagt cttcgtgggt taaaagatta tatttcgaat atataacttg caatagatta
240

tctaaggtga ttaaggcaac tcattgggta tgcttacatg atattacagc aaatgttagt
300

gtaccctata gatttgttta ttgccacaat cctgcaccgt tctataaata tttaagctat
360

cgagatatta taggagaacc taaattttat cttttttatc ttttttatgg gcttttatac
420

aatatcaata taaaaaagaa cacagcagtt tttgttcagc agcagtggct aaaaaaagaa
480

ttcgaaaaaa aatataagtt aaagaatggt gttgttagtc gccctgaaga tatttgcctt
540

tttgaaagtg atggtttggt aagaaataat aataaaaagg atgtgaggat attttaccga
600

gcagtgcccc gtatatttaa aaactttgaa gttatcatatc gtgctgcaca aatattacaa
660

gataaaaata ttcattttta tcttactttt gatggtactg aaaataagta tgcaaaaaga
720

atatataaat tagcttccga actgaaaaat gtacattttcc tcggttacct taatgcaacc
780

gagatgggta acttttatca agattcagat attatttggt tcccatcgaa actagaaacg
840

tggggattac cattatcaga agctaaaaca tacaaaaaat ggatatttgc ggcagactta
900

ccttatgctc atgaagtttt atataactat tcaaaaacta gatattttcc atttgacgat
960

gagaaaatac ttgttcgcta catattagag tacacaagta aaaatatgca tgaagatata
1020

aaaaatagta ggggtgaattt taataatgat gcattgactg gttttgaaca gtttattgaa
1080

tatatcctca aggggaactg a
1101

<210> 11
 <211> 564
 <212> ADN
 <213> E. Coli

<220>
 <223> wbbL (upec138)

<400> 11
 atgattatga ataatgatta ttttctcttt cttaaccccg atgtattcat aaccagtga
 60

agtttgatta attatgttga ttatataatt agtaatgatt ataagtttag cacattatgt
 120

ctttatcgag attttactaa aagcaaacaat gattattcaa tacggagttt tccaacttta
 180

tatgattttc ttgttcttt tttattgggg gtgaataaaa gtaaaattaa gaaggaaaat
 240

atactttctg atactgtagt tgattggtgt gctggctcat ttatgcttat tcatgcttta
 300

agtttcttaa atgtgaatgg ttttgatcaa aaatatttta tgtattgtga agatattgac
 360

ctttgtatgc gtttaaaatt aagtggagta gatctttact atactcccca tttgatgct
 420

attcattatg cgcagcatga aaatagaaga atatttacta aagcatttcg atggcatata
 480

aggagtatta cgcgctacat attacggaaa ccaattcttt cttataaaaa ctatagaaaa
 540

attacatccg aactggtaaa gtga
 564

<210> 12
 <211> 10653
 <212> ADN
 <213> E. Coli

<220>
 <223> E. coli rfb(upec138) cpm gen

<400> 12
 gtgaagatac ttgttactgg tggcgcagga tttattgggt ctgctgttgt tcgtcacata
 60

ataaataata cgcaagatag tgttggttaat gtcgataaat taacatacgc cggaaacctg
120
gaatcacttg cagatgtttc tgattctgaa cgctatttct ttgaacatgc ggatatttgt
180
gatgcagctg caatggcacg gatttttgct cagcatcagc cggatgcagt gatgcacctg
240
gcagctgaaa gccatgttga ccgttcaatt acaggccctg cggcatttat tgaaaccaat
300
attgtgggta cttatgtcct tttagaagcg gctcggaatt attggtctgg tctggatgat
360
gaaaagaaaa aaaacttccg ttttcatcat atttctactg atgaggtgta tggtgactta
420
cccatccgg atgaagtaaa tagcaatgaa acgttgccgc tatttacgga aacgacagca
480
tacgcgcaa gtagtccata ttctgcttct aaagcttcca gcgatcattt ggttcgcgca
540
tgaaaacgta cttatgggtt accgaccatt gtgactaatt gctcgaacaa ctatggtcct
600
tatcatttcc cggaaaagct tattccactg gttattctta attcactgga aggtaaggca
660
ttacctattt atggcaaagg agatcagatc cgcgactggg tgtatgtaga ggatcatgct
720
cgagcgttat ataccgtcgt aaccgaaggt aaagcgggcg aaacttataa cattggtgga
780
cacaacgaaa agaaaaacat cgacgtagtg ttcactattt gtgatttggt ggatgagata
840
gtcccgaaag agaaatctta ccgcgagcaa attacttatg ttaccgatcg tccgggacac
900
gatcgccgtt atgcgattga tgctgagaag attggtcgcg aattgggatg gaaaccacag
960
gaaacgtttg agagtgggat tcgtaaaacg gtggaatggt acctgtccaa tacaaaatgg
1020
gttgataatg tgaaaagtgg tgcctatcaa tcgtggattg aacagaacta tgagggccgc
1080

cagtaatgaa tatcctcctt ttgggcaaaa cagggcaggt aggttgggaa ctacagcgtg
1140

ctctggcacc tctgggtaat ttgattgctc ttgatgttca ctccactgat tactgtgggtg
1200

at tttagtaa tcctgaaggt gtagctgaaa ccgtaagaag cattcggcct gatattattg
1260

tcaacgcagc cgctcacacc gcagtagaca aagcagaatc agaaccgaag ttgcacaat
1320

tactgaacgc gacgagtgtc gaagcgatcg cgaaagcagc caatgaagtc ggcgcctggg
1380

ttattcacta ctctactgac tacgtatttc cggggaccgg tgaaatacca tggcaggagg
1440

aggatgcaac cgcaccgcta aatgtttacg gtgaaaccaa gttagcggga gaaaaagcat
1500

tacaagagca ttgtgcgaag caccttattt tccggaccag ctgggtctat gcaggtaaag
1560

gaaataactt cgccaaaaca atgttgctgc tggcaaaaga gcgtaagaa ttagccgtta
1620

ttaatgatca gtttggtgcg ccaactggcg cagagttact ggctgattgt acggcacatg
1680

ctattcgtgt ggcactgaat aaaccggaag tcgcaggctt gtaccatctg gtagctagtg
1740

gtaccacaac gtggcacgat tatgctgcgc tggtttttga agaggcgcgc aaagcaggca
1800

ttccccttgc actcaacaag ctcaacgcag taccaacaac agcctatcct acaccagctc
1860

gtcgtccaca taactctcgc ctttaatacag aaaaatttca gcagaacttt gcgcttgtct
1920

tgcctgactg gcaggttggc gtgaaacgaa tgcttaacga attattttacg actacagcaa
1980

tttaatagtt tttgcatctt gttcgtaatg gtggagcaag atgtattaaa aggaatgatg
2040

aaatgaaaac gcgtaaaggt attattttgg cgggtggttc tgggtactcgt ctttatcctg
2100

tgacgatggc cgtcagtaaa cagctgttac cgatttatga taaaccgatg atctattacc
2160

cgctctctac actgatgtta gcgggtattc gcgatatctt gattatcagt acaccacagg
2220

atactcctcg ttttcaacaa ctgctgggtg acgggagcca gtggggcctg aatcttcagt
2280

acaaagtgca accgagtccg gatgggtctt cgcaggcggt tattatcggg gaagagttta
2340

ttgggtggtga tgattgtgct ttgggtactt gtgataatat cttctacggc cacgacctgc
2400

cgaagttaat ggacgtagct gttaacaaag aaagtgggtg aacggtatct gcctatcacg
2460

ttaatgatcc tgaacgttat ggtgtcgtgg agtttgataa taacgggtact gcaattagcc
2520

tggaagaaaa accgctggaa ccaaaaagta actatgcggg tactgggctt tatttctatg
2580

acaatgacgt tgtggaaatg gcgaaaaacc ttaagccttc tgcccggagg gaactggaaa
2640

ttaccgatat taaccgtatt tatatggaac aaggacgttt gtctgtcgtc atgatggggc
2700

gtggctatgc atggctggat acagggacgc atcaaagtct tattgaagca agcaacttca
2760

ttgccaccat tgaagagcgc cagggactaa aggtttcctg tccggaagaa attgcttatc
2820

gtaaagggtt tattgatgct gagcaggtaa aagtattagc cgaaccgttg aagaaaaatg
2880

cttatgggtca gtatctgctc aaaatgatta aaggttatta ataagatgaa cgtaattaaa
2940

actgaaattc ctgatgtgct gatttttgaa ccaaagttt ttggggatga acgtggcttc
3000

ttttttgaga gttttaatca gaggattttt gaagaagcag taggtcgtaa gggtgagttt
3060

gttcaggata accattctaa gtccagtaaa ggtgttttac gtgggtcttca ttatcagtta
3120

gaaccttatg ctcaaggaaa actggtgcgc tgtgttggtg gcgaggtttt tgatgttgcg
3180

gttgatattc gtaaactcgtc acctacattt gggaaatggg ttggggtgaa tttgtctgct
3240

gagaataagc gtcagttgtg gattcctgag ggatttgcac atggtttttt ggtgctgagt
3300

gatttagcag aagttttata taaaacgaat caatattatg ctccatcaca tgaaaaaaat
3360

attatatgga atgacctctt gcttaatat aaatggccga gcacagcact gatcactctg
3420

tctgataagg atgcaaattg ggaaagattt gaactaagt agttttgaaa tgtctctctt
3480

aaaacatagt atatggaatg ttgcgggcta ctttatacca acattaattg caattcccg
3540

ctttggatta attgcgagga aaattggtgt agaactattt ggtttgata cgtagcaat
3600

gatttttata gggatatgcaa gtatatgtga tgctgggtta acaagagctg ttgtgcgtga
3660

aatagcatta ctaaaaaaca gagtggacga ttgtaatacg ataatagtaa cttctattat
3720

cgctgtgata tttttagggt ttatcggagg cgggggagtg tttctgctta aaggcgatat
3780

tattgaactg ttaaatatct caccaatata ttacgccgat tcgataaagt ctctagtatt
3840

attatcatct ctgatacctg tattcttagt cacgcaaata ctattagcag agcttgaggg
3900

tcgggaatat tttgggattc taaatataca aaaaagtgtg gggaattctt taattgcagg
3960

gttacctgca ttatttgttt taattaatca aacgcttttt tctgcaatta ttggtgtagc
4020

gattgcaaga gttatatgct tgtgggtaag ctacattatg agcagggaaa gaataactat
4080

cgatatctca tttttttcaa taactgtttt aaagcgggta tttagatatg gcgggtgggt
4140

aactataagt aacataatat ctcctatatatt agcgagtatg gatagattta ttctatccca
4200

tatccaggga gcatcaaaaa tatcattcta tacagtccct aatgagctgg taactaggct
4260

tggaatagtt ccaggctctc ttgggaaagc tgtttttcca aaattaagtc atgcaaggaa
4320

ttttacagcg tcatatgcag agcaaaaaaa agcttatata ttaatgactg tcattgtaat
4380

gcctttgggtt ttatttgtat attattacgc aaagtttatt ttaacattgt ggatgggggc
4440

tgagtatgca gggatttcgg tcgaaatatt acggattatg cttatagggt atatttttaa
4500

ctgttattca caaatctctt ttgccaacat acaggccttt ggaaaagcaa aatacactgc
4560

atacatccat atgatggaat ttattcctta ttgataatg ttatatataa tttcaaagga
4620

atatgggggtt attgggtgtg cgtgggttatg gacaattcga gtaataattg attttttgat
4680

gcttttatat atgagttatc gttgtaataa tcttatgaaa aaagggtagc ctgatgatat
4740

atattgtgggt attaaattgg aatggggcta tagataccat taattgtgtt aaaagtttaa
4800

tggaatttaa tgtttagcgat tataaaatta tcattgttga taactgttct atggataact
4860

catatgatac tataaaagaa aatcttaatt cattatatat tgctgataaa agtatcattg
4920

aggtgaagta tgaggataga aataaatata aaaccttaga aaacgataaa atcatattaa
4980

tacaatctcc gcaaaataat gggtagcga gtggtaataa tattggcata gagttcgctc
5040

ttaatcagga gaatatgaaa tacgtctggg ttctgaataa tgatactgaa gtggataaag
5100

aggctttaac tcatttaatt agtaaattgtg attcagataa aagtataggg atttgcggtt
5160

ctcgtttagt ctattttgcc gacagagaga tgcagcaagg actaggtggg gtgcataaca
5220

aatggttatg cactacaaaa aattatgaaa tgggaagatt agtttccaaa aaatatgatg
5280

atgaagtcac tagtaatgat atagattata taattggcgc atcgatgttt ttctctagag
5340

aatgtttgga aacagttgga ttgatgaatg aagaatattt ttatactat gaagagttag
5400

atatttgcct cagagcaaaa gcaaagaact ttaaattagg tatttgctca gaaagtttgg
5460

tttatcataa aataggtgca agtactgatg ggggaaagag catgatggct gatctttgct
5520

caataaaaaa taggctggtc attacagaaa ggttttatcc ccaatattat tggacgggat
5580

ggttgtcact ttttgttgta gcatttaacc gtgctagaag aggtgagttt aataagatga
5640

aaagatgttt gaatggtatg ttttaacttca aacgaaacaa aggtagcaaa tgccattaga
5700

atatgcactt aatcatggtg ttaataaatc tatagtttga tatgttatta aagggtattt
5760

aatgaaagtg gcttttttat ctgcttatga tccactatct acatccagtt ggtctggcac
5820

accttattat atgctaaagg cattatcgaa gagaaatatt tccattgaaa tattaggacc
5880

ggtaaatagc tatatgatat acatgttaaa agtatataaa ttaatattaa ggtgtttcgg
5940

aaaagaatat gattatagtc attcgaagtt gctttccagg tattacggta gaatattcgg
6000

taggaaatta aaaaaaattg atggtttgga ttttattatc gcacctgcag gttcctcaca
6060

aattgctttt ttaaaaacaa ccataccaat aatatatcta tcggatacaa catatgatca
6120

attaaaaagc tattatccga atttaaataa aaaaacaatt ataaatgatg aggatgcaag
6180

tttaatcgaa cgcaaggcta ttgaaaaagc aacagtagta tctttcccat ctaaattgggc
6240

aatggatttt tgcaggaatt attacagatt agattttgat aaattagttg aaataccatg
6300

gggggctaatt ttatttgatg atattcactt tgctaataaa aatataattc aaaagaatag
6360

ttatacttgt cttttcttgg gagttgattg ggaaagaaaa ggtgggaaaa cagccttgaa
6420

agcaattgaa tatgtaaggc agttatatgg gatcgatggt agactaaaaa tttgtggatg
6480

tactccgaat caaaagattt tacctacttg ggttgaatta attgataaag tagataaaaa
6540

taacgttgac gaatatcaga aattcatcga tgtgttatct aacgctgata tacttctttt
6600

accaaccatt gctgaatggt atggaatggt attttgtgaa gctgctgctt ttggattgcc
6660

tgttgctgct acagatacag gtggagtcag ttctatagtt atcaacgaaa ggacggggat
6720

attaattaaa gaccogttag actataagca ctttggaat gcaattcata aaataattag
6780

ttccgtagag acttatcaaa actactccca aaacgcaaga attagatata ataatatatt
6840

gcattgggac aattgggcta aaaagataat tgagattatg tatgagcata agaatagaag
6900

aatcaaatag cacaaaaaga attatatggt tattttatact ttttcttggt ttccctgatt
6960

ttttgtttta tacattaggg gttgataatt ttagcatttc aacgataatc tcaattacat
7020

tgctttttgt ttttttaaga gctaaaaata tttgcaaaga taattttcta ataatagtag
7080

cgttattcat attggttggt tttaactggt tgtaaagtat gctatttaat attgaacagg
7140

ctttaacatt taaagttgta ctttcaatat atagcatcct aataatggca tacgtctcct
7200

cttgttatgc acagacgttg tggttatggt ctgaagaaat acttaagaga tccgtctttt
7260

atttgttcgc atttctttgc cttattggca ttataagtat tcttttacag aagactgaga
7320

ttatacatga taaaagtatg attctttttc ctgaaccatc agcatttgca ttggttttta
7380

tacctatctt ttcattttgt ttatactata caagaggggg ggggctacta ttgctctata
7440

tattatcttt gggatttgcg ttaggtatcc agaatttaac aatgttggtg ggcattgtga
7500

ttagtgtttt tgtgatgaaa aaaataacta taaggcaaac tattgttata cttttggggg
7560

catggatttt ttccatgata ttaagtgatt tagacatttc ttactatata tcgcggcttg
7620

attttaaaaa tactacgaac ctatcagtgc ttgtatatct ttcaggaatt gaaagagctt
7680

tcttgaattt tattacaagt tatggctctg gtattggttt tcaacaaatg ggagtgaatg
7740

gggagatagg aatatatcaa caaattttag ctgaacttga tgcccctatg ttaaataat
7800

acgatggctc atttatttct tctaagttaa tatctgagtt tgggggttatt ggtgcattaa
7860

tgtgtatttt ctattttttt tatttttccc gattttatct gcgtttcaaa aaaagtaaga
7920

gatattcacc gcagtatatt ttagcatata gcttctacat gtgtttcttc atccctcttt
7980

ttatacgtgg tgctgggtat ataaaccctt atgtgtttat gttattttca tcaatatttt
8040

tgtgcaaata tcacgctaaa aatatcttga tgaaatctaa tgtccagata gctatataat
8100

agtagattat attatcatta tcacgtaaat tacatattaa tagcatatat gataactagg
8160

acataaataa tgtgcattaa aaaaaactt aagttaatta aacgatatgg cctttatggt
8220

ggctcttaggc ttcttaaaga tatattctta acaaaatttt tattttgttc aaatgttagg
8280

attattagat ttccatgtta tattagaaaa gatggaagtg ttagttttgg aaaaggtttt
8340

acatcaggtg taggattacg agttgatgca tttatggatg ccgtagtttc cattggagaa
8400

aatgttcaaa ttaatgacta tgttcacatc gcggctatta ataatgtcat tattggtaga
8460

gatacattaa tagcaagtaa agtattttatt agtgatcata atcatggtat tttttctaaa
8520

tccgatatcc atagttcacc aactattatt ccttcgtcta ggccccttga atctgcacct
8580

gtgtatattg gagagcgtgt gtggattggc gaaaatgtga caatattacc aggtgcgtgt
8640

ataggtaatg gtgtagttat tggcgcaaac agtgttgttc gtggtgagat tcctaataat
8700

gtgatcattg ctggtgttcc agctaaaatt gttaaaaaat ataactatga gcgtatgcaa
8760

tgggaaagaa tatagttgta atatcggctg ttaattttac aaccggaggc ccctttaccg
8820

tactaaaaaa tgtgcttaca gcaactaaag atagagccga atgtaaattt attgcactgg
8880

ttcatagctc tgctgaacta atggaattat ttccgtgggt tgaatttata gagtatccag
8940

aagtcaagtc ttcgtggggt aaaagattat atttcgaata tataacttgc aatagattat
9000

ctaagtgat taaggcaact cattgggtat gcttacatga tattacagca aatgttagtg
9060

taccctatag atttgtttat tgccacaatc ctgcaccgtt ctataaatat ttaagctatc
9120

gagatattat aggagaacct aaattttatc ttttttatct tttttatggg cttttataca
9180

atatcaatat aaaaaagaac acagcagttt ttgttcagca gcagtggcta aaaaaagaat
9240

tcgaaaaaaaa atataagtta aagaatgttg ttgttagtcg ccctgaagat atttgcctt
9300

ttgaaagtga tggtttggtta agaaataata ataaaaagga tgtgaggata ttttaccag
9360

cagtgcctcg tatattttaa aactttgaag ttatcatcag tgctgcacaa atattacaag
9420

ataaaaaatat tcatttttat cttacttttg atggtactga aaataagtat gcaaaaagaa
9480

tatataaatt agcttccgaa ctgaaaaatg tacatttcct cggttacctt aatgcaaccg
9540

agatggttaa cttttatcaa gattcagata ttatttgttt cccatcgaaa ctagaaacgt
9600

ggggattacc attatcagaa gctaaaacat acaaaaaatg gatatttgcg gcagacttac
9660

cttatgctca tgaagtttta tataactatt caaaaactag atattttcca tttgacgatg
9720

agaaaatact tgttcgctac atattagagt acacaagtaa aaatatgcat gaagatataa
9780

aaaatagtag ggtgaatttt aataatgatg cattgactgg ttttgaacag tttattgaat
9840

atctcctcaa ggggaactga cgtggtttat attataatcg tttcacatgg ccatgatgac
9900

tatatagaaa atcttttatt aaatttaaag ttgccctctg gaagatttaa aataatagtt
9960

cgtgataaca aaagttcaat ggtttttaaaa aaaacatgcg aaaaaaattg cgtaacctat
10020

ttgcatggag ggcaatatgg atttggacat aataataaca tagcagtgtc atatataatt
10080

aataacttca tgattatgaa taatgattat tttctctttc ttaaccccgaa tgtattcata
10140

accagtgaag gtttgattaa ttatgttgat tatataatta gtaatgatta taagtttagc
10200

acattatgtc tttatcgaga ttttactaaa agcaaacatg attattcaat acggagtttt
10260

ccaactttat atgattttct ttgttctttt ttattggggg tgaataaaag taaaattaag
10320

aaggaaaata tactttctga tactgtagtt gattgggtgtg ctggctcatt tatgcttatt
10380

catgctttta gtttcttaaa tgtgaatggt tttgatcaaa aatattttat gtattgtgaa
10440

gatattgacc tttgtatgcg tttaaaatta agtggagtag atctttacta tactcccat
10500

tttgatgcta ttcattatgc gcagcatgaa aatagaagaa tatttactaa agcatttcga
10560

tggcatataa ggagtattac gcgctacata ttacggaaac caattctttc ttataaaaac
10620

tatagaaaaa ttacatccga actggtaaag tga
10653

<210> 13

<211> 652

<212> PRT

<213> Trình tự giả

<220>

<223> protein EPA được khử độc tính chứa 4 trình tự N-glycosyl hóa
được tối ưu

<400> 13

Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Asp	Gln	Asn	Ala	Thr	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Lys
1				5					10					15	

Leu	Ala	Glu	Glu	Ala	Phe	Asp	Leu	Trp	Asn	Glu	Cys	Ala	Lys	Ala	Cys
			20					25					30		

Val	Leu	Asp	Leu	Lys	Asp	Gly	Val	Arg	Ser	Ser	Arg	Met	Ser	Val	Asp
		35					40					45			

Pro	Ala	Ile	Ala	Asp	Thr	Asn	Gly	Gln	Gly	Val	Leu	His	Tyr	Ser	Met
	50					55					60				

Val	Leu	Glu	Gly	Gly	Asn	Asp	Ala	Leu	Lys	Leu	Ala	Ile	Asp	Asn	Ala
65					70					75				80	

Leu Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val
 85 90 95

Glu Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly
 100 105 110

Ser Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser
 115 120 125

Asn Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser
 130 135 140

His Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala
 145 150 155 160

Lys Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn
 165 170 175

Glu Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val
 180 185 190

Met Ala Gln Ala Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala
 195 200 205

Ser Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn
 210 215 220

Tyr Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys
 225 230 235 240

Ile Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile
 245 250 255

Lys Asp Asn Asn Asn Ser Thr Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His
 260 265 270

Phe Pro Glu Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys
 275 280 285

His Leu Pro Leu Glu Ala Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp
 290 295 300

Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu
 305 310 315 320

Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg
 325 330 335

Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile
 340 345 350

Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala
 355 360 365

Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly
 370 375 380

Ala Ala Ser Ala Asp Val Val Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala Lys Asp
 385 390 395 400

Gln Asn Arg Thr Lys Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp
 405 410 415

Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp
 420 425 430

Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val
 435 440 445

Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val
 450 455 460

Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val
 465 470 475 480

Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg
 485 490 495

Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln
500 505 510

Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu
515 520 525

Arg Val Tyr Val Pro Arg Trp Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Gly
530 535 540

Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile
545 550 555 560

Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu
565 570 575

Glu Gly Gly Arg Val Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr
580 585 590

Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly
595 600 605

Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala
610 615 620

Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu
625 630 635 640

Lys Leu Gly Ser Gly Gly Gly Asp Gln Asn Ala Thr
645 650

<210> 14

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự giả

<220>

<223> Trình tự tương đồng N-glycosyl hóa

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (2)..(2)
 <223> Xaa = amino axit bất kỳ

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa = Ser hoặc Thr

<400> 14

Asn Xaa Xaa
 1

<210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự giả

<220>
 <223> Trình tự tương đồng N-glycosyl hóa

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = Asp hoặc Glu

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = độc lập được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ ngoại trừ Pro

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa = độc lập được chọn từ axit amin tự nhiên bất kỳ ngoại trừ Pro

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa = Ser hoặc Thr

<400> 15

Xaa Xaa Asn Xaa Xaa
1 5

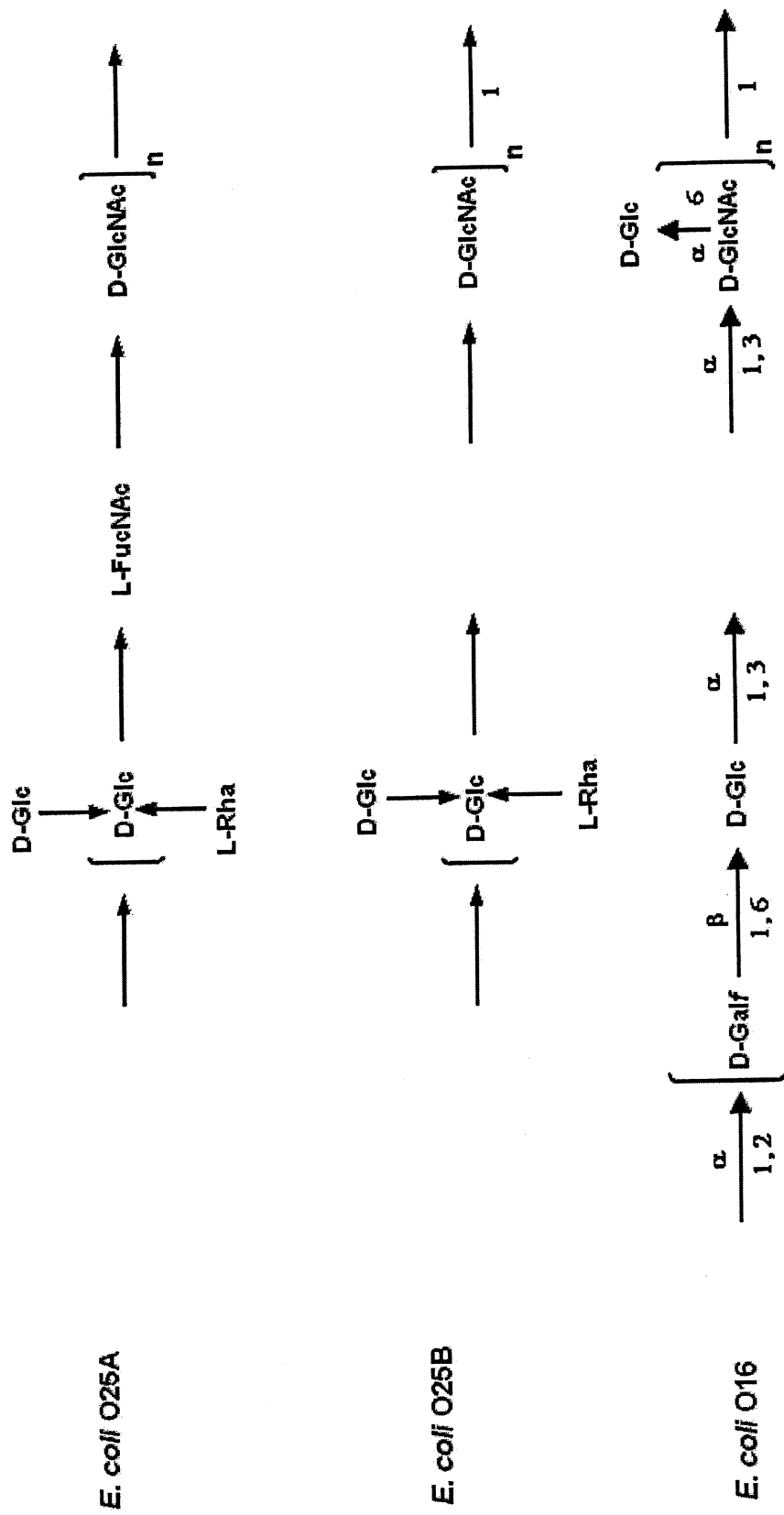


FIG. 3A

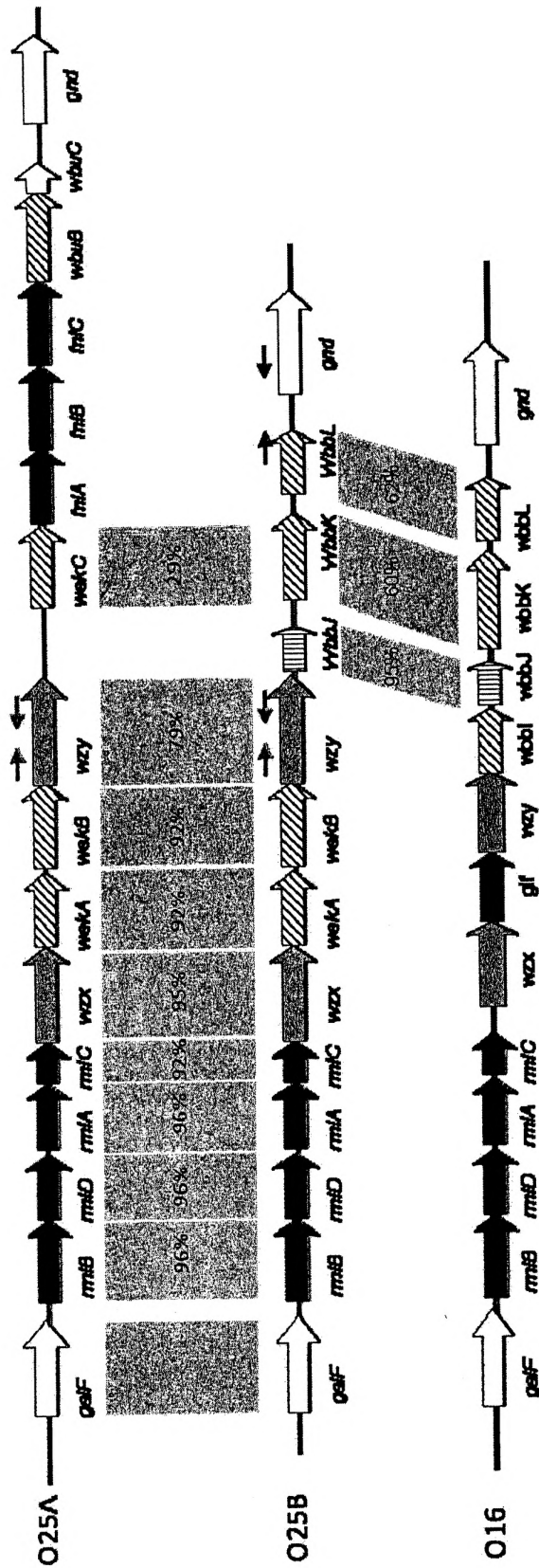
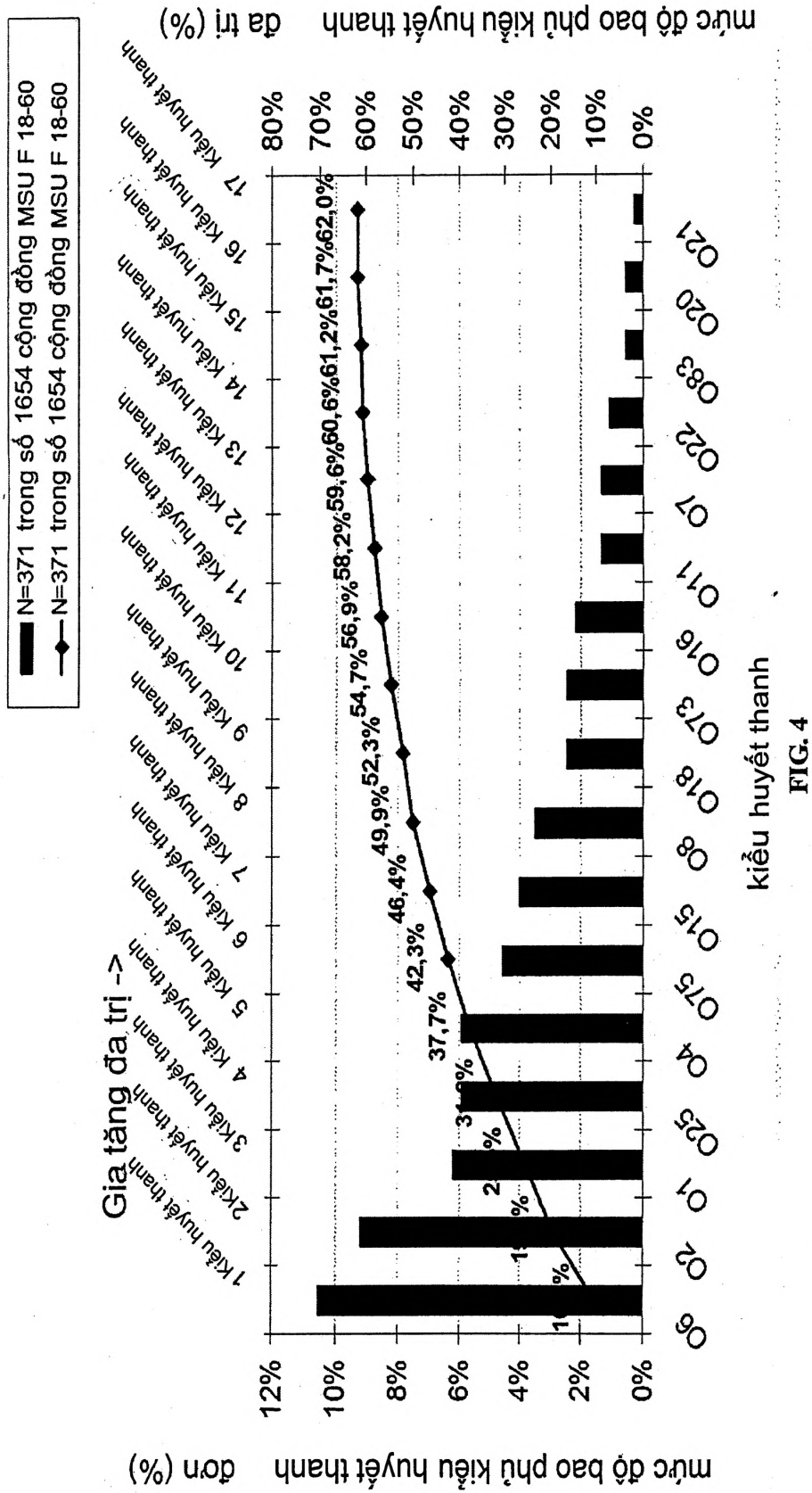
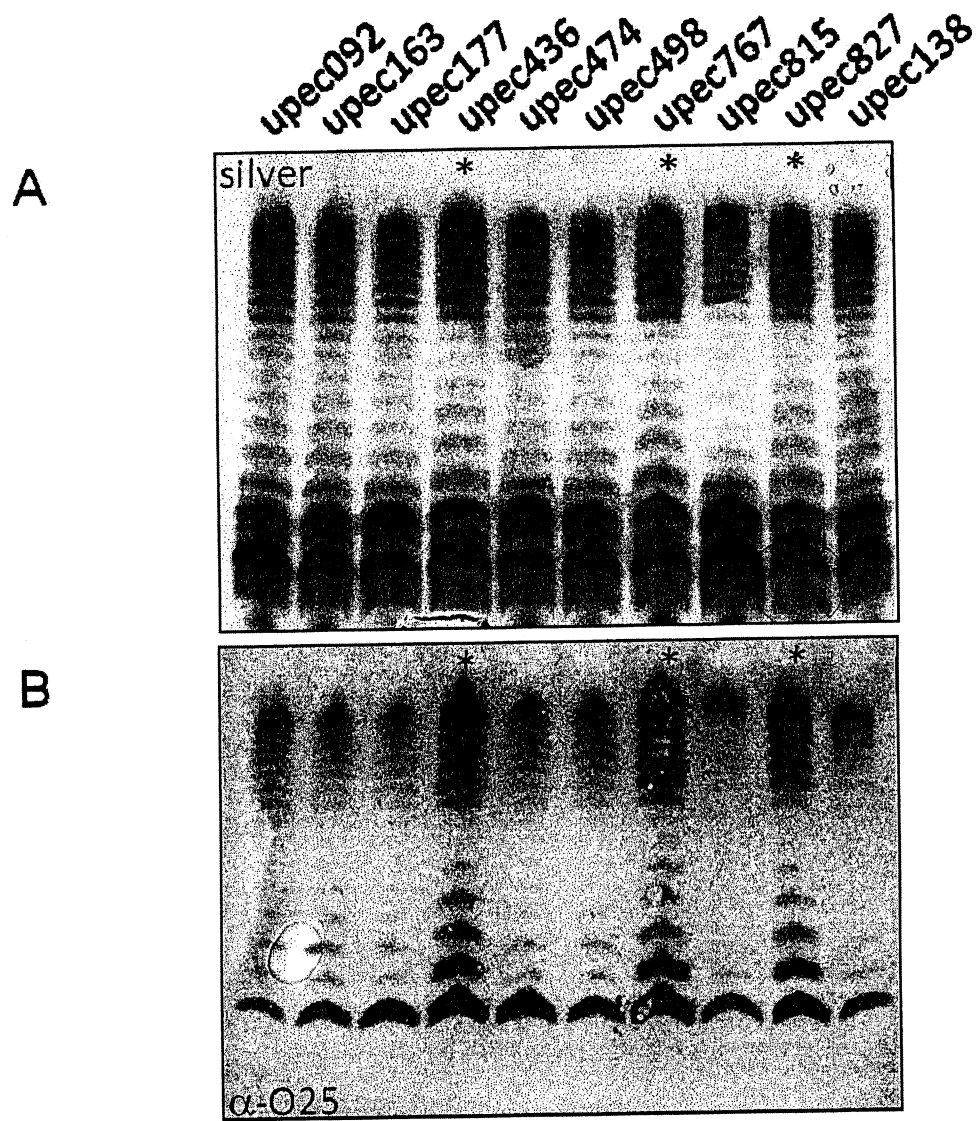


FIG. 3B





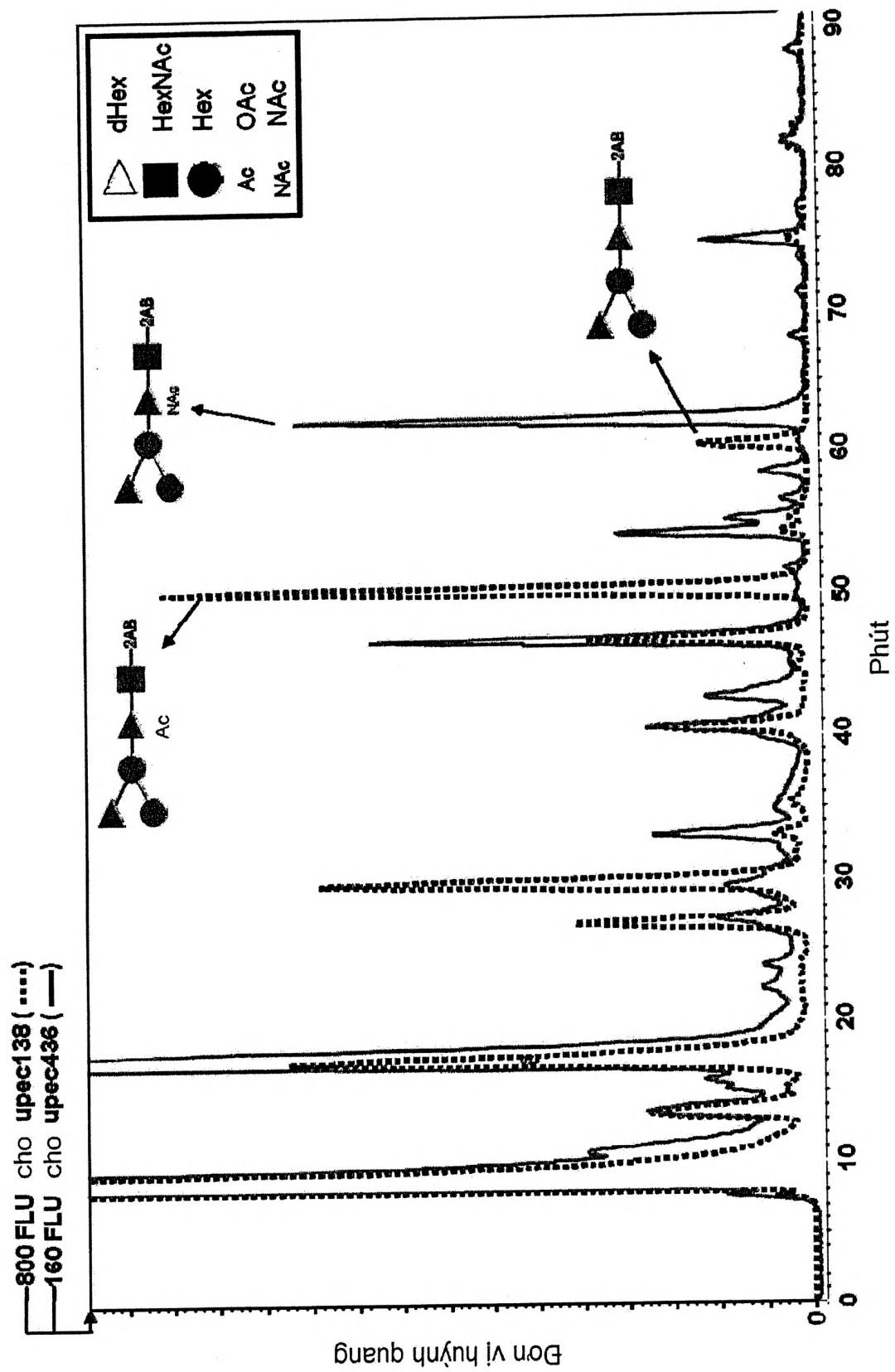
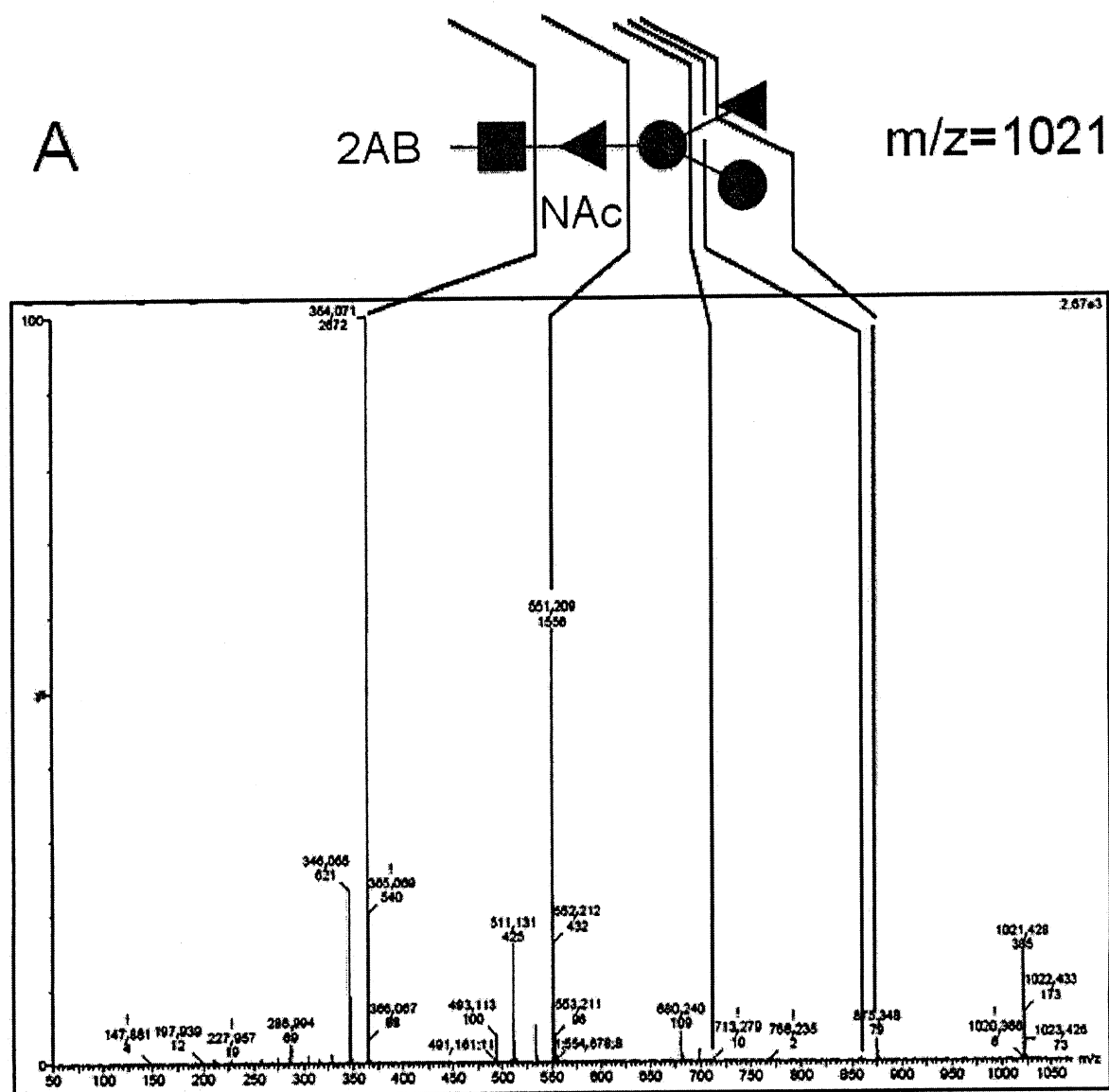


FIG. 6



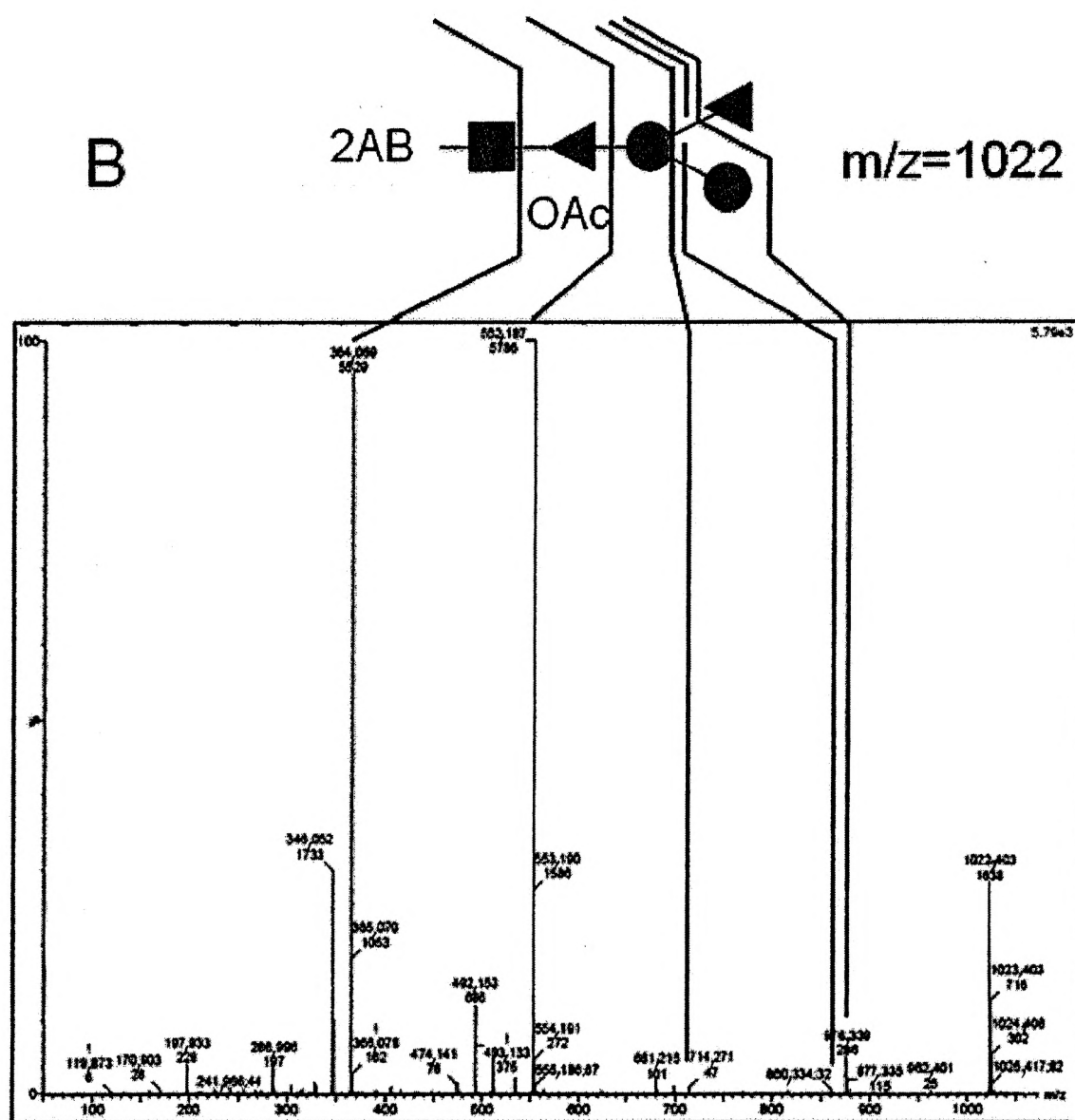


FIG. 7B

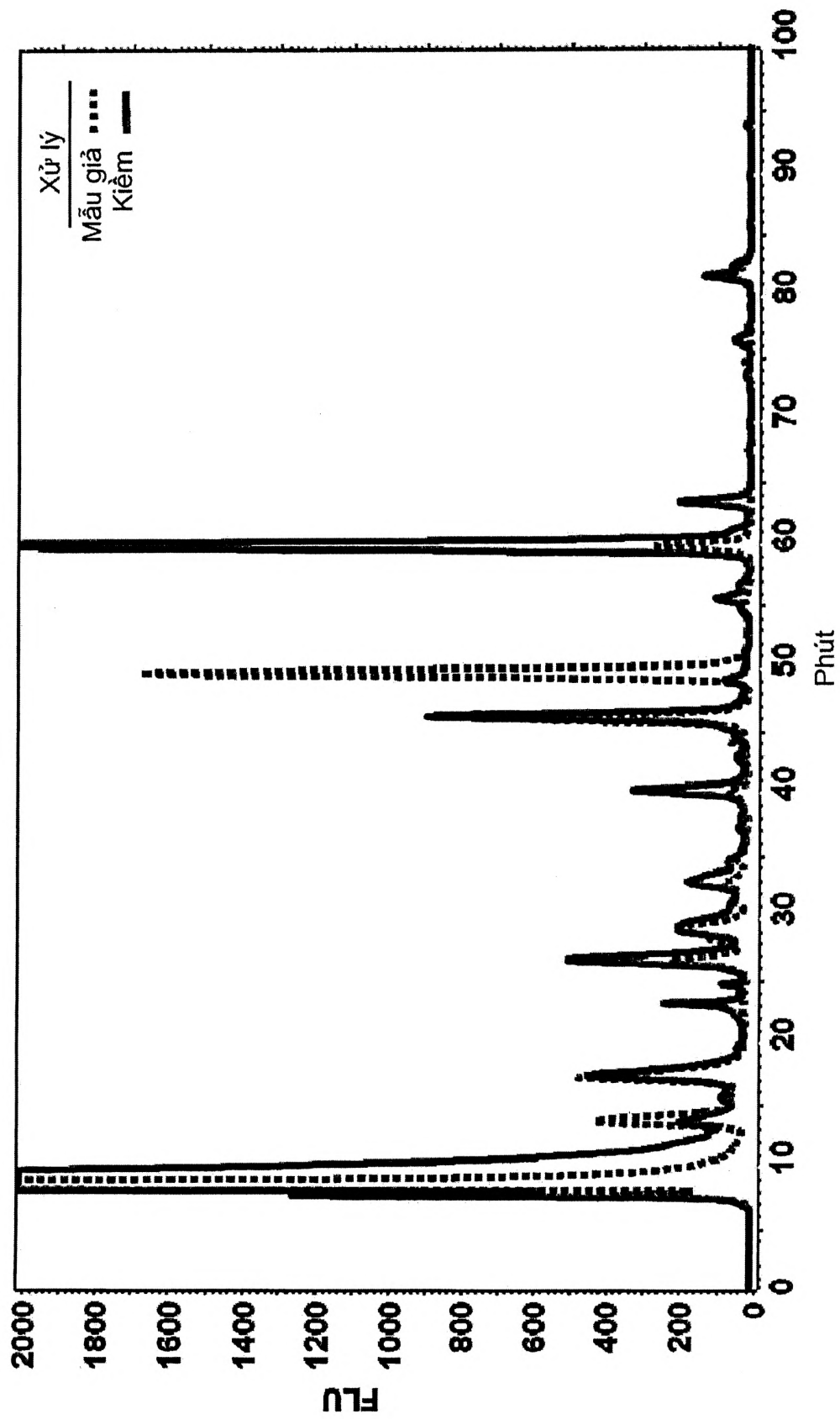


FIG. 8

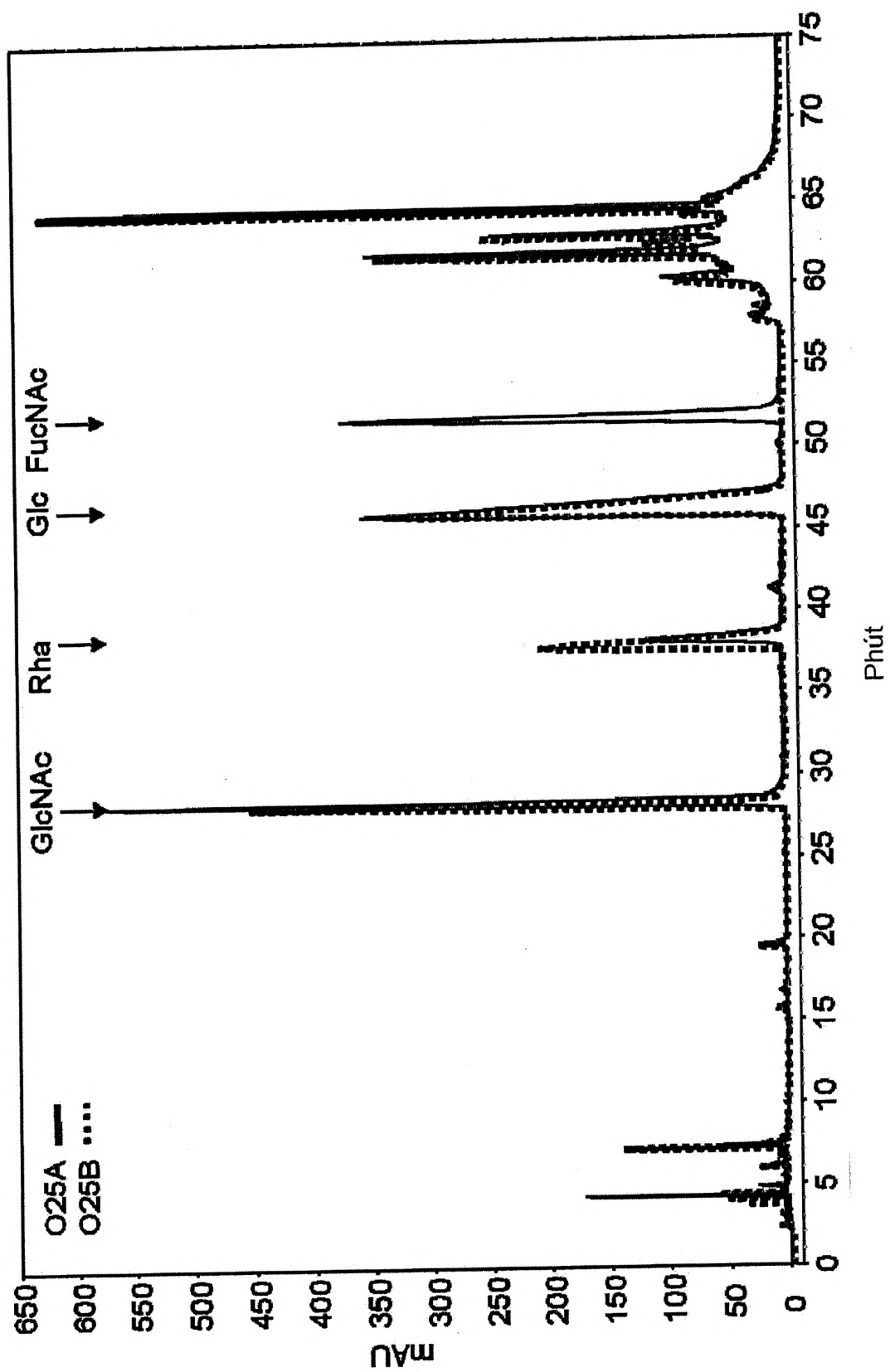


FIG. 9

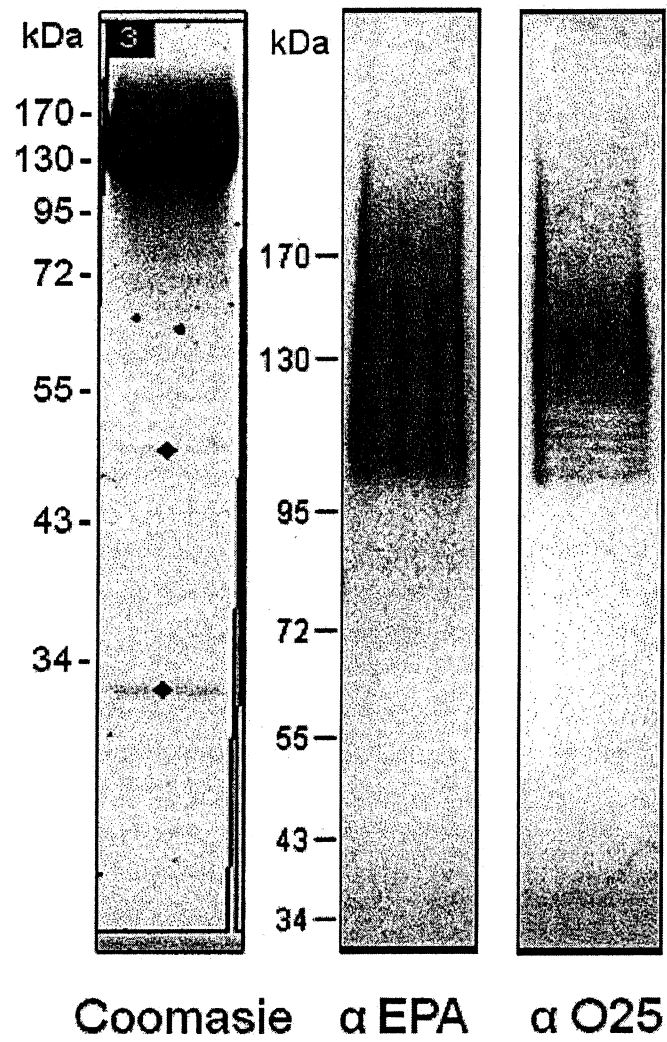


FIG. 10

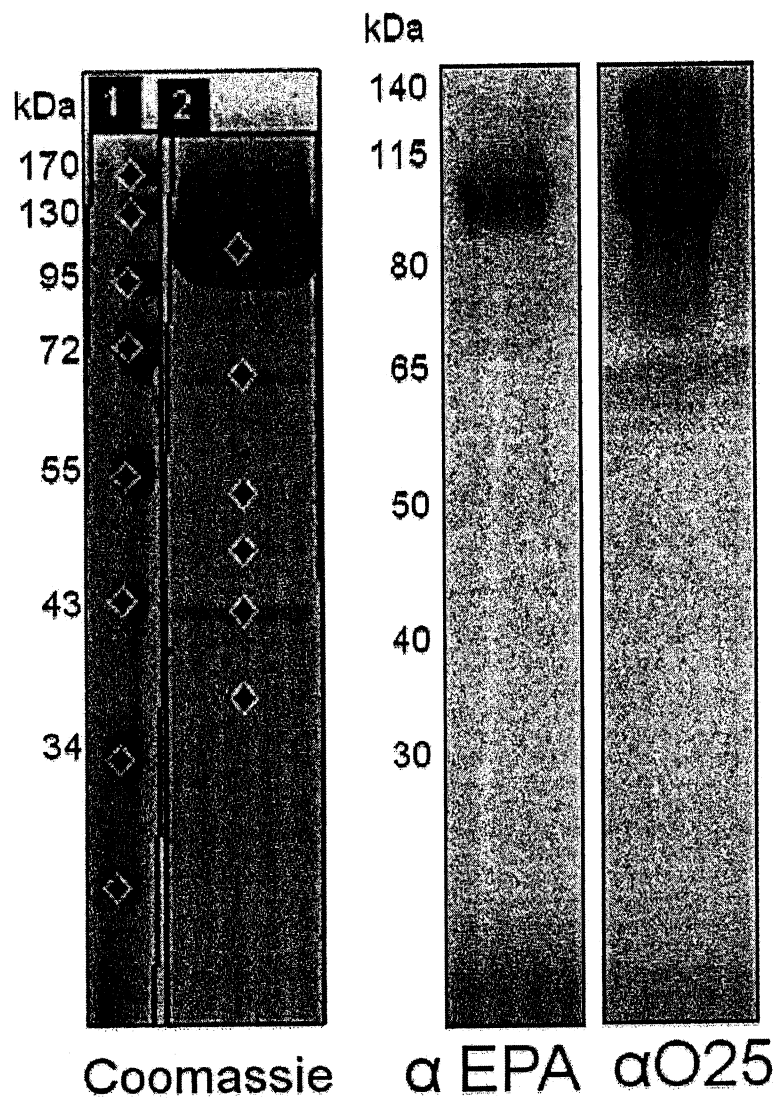


FIG. 11

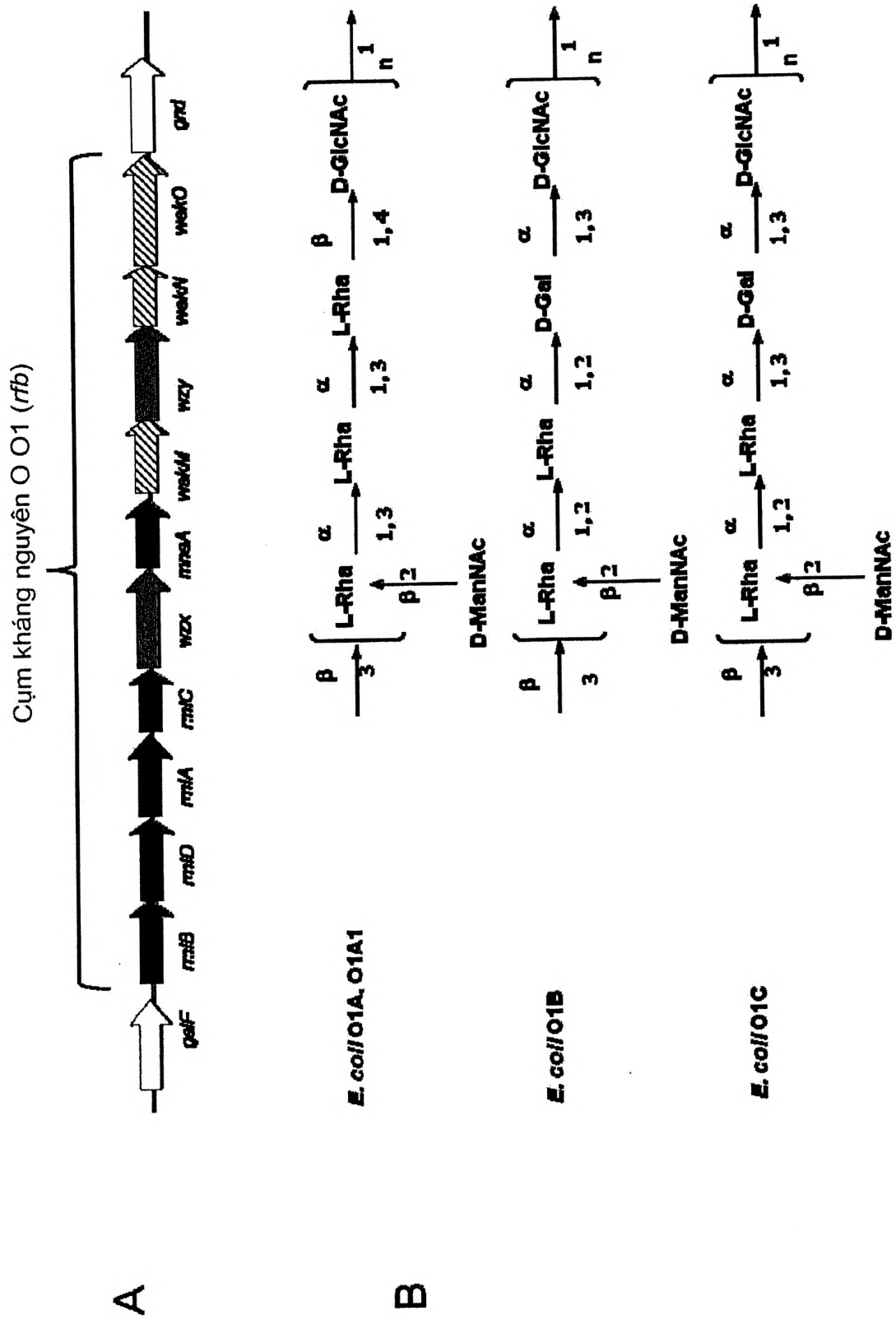


FIG. 12

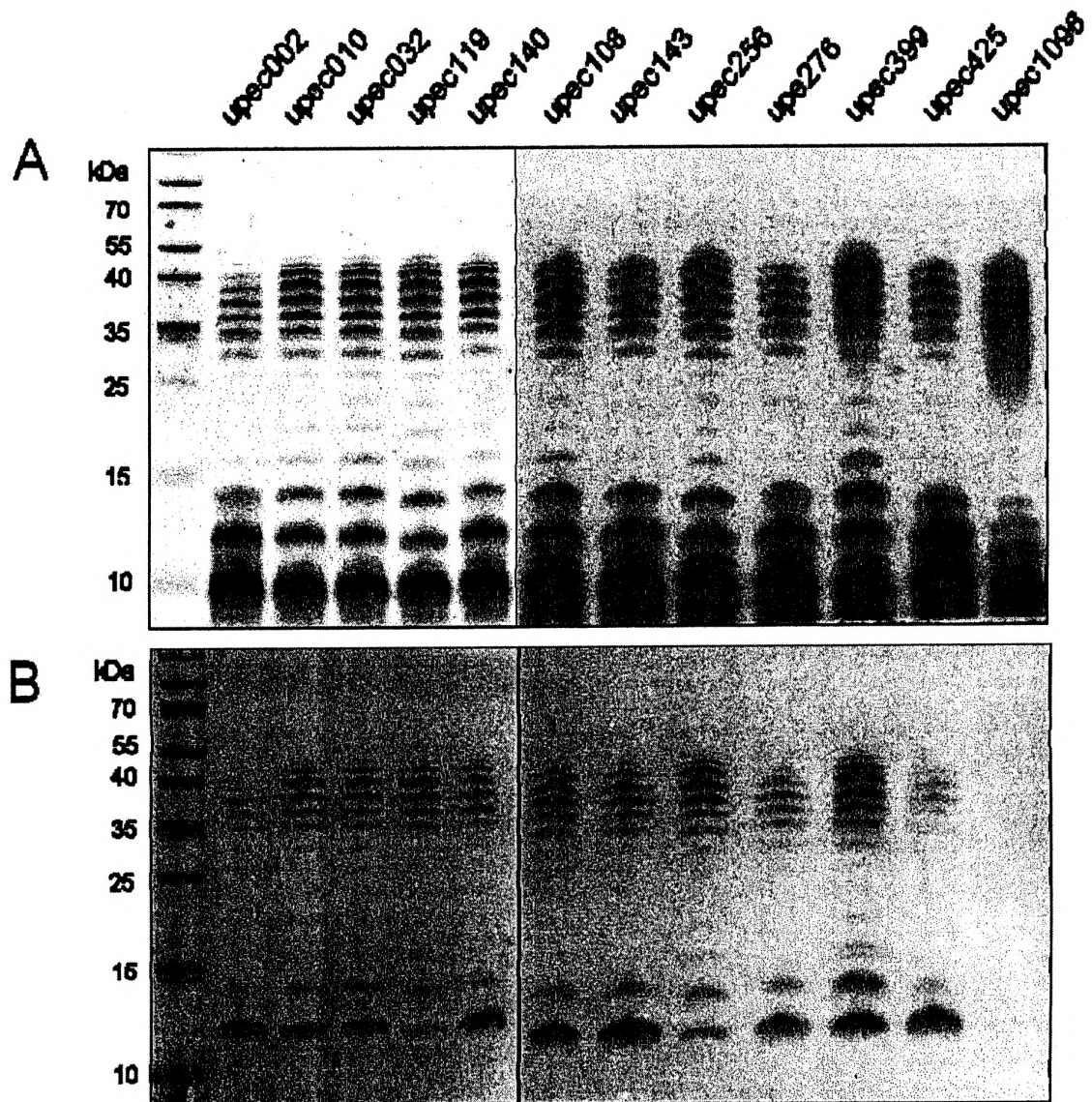


FIG. 13

A

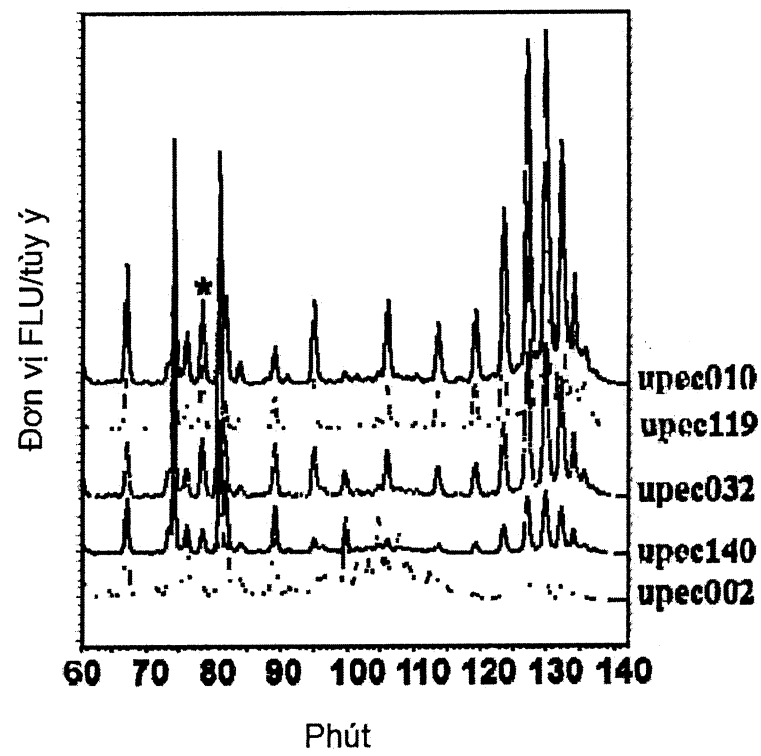


FIG. 14A

B

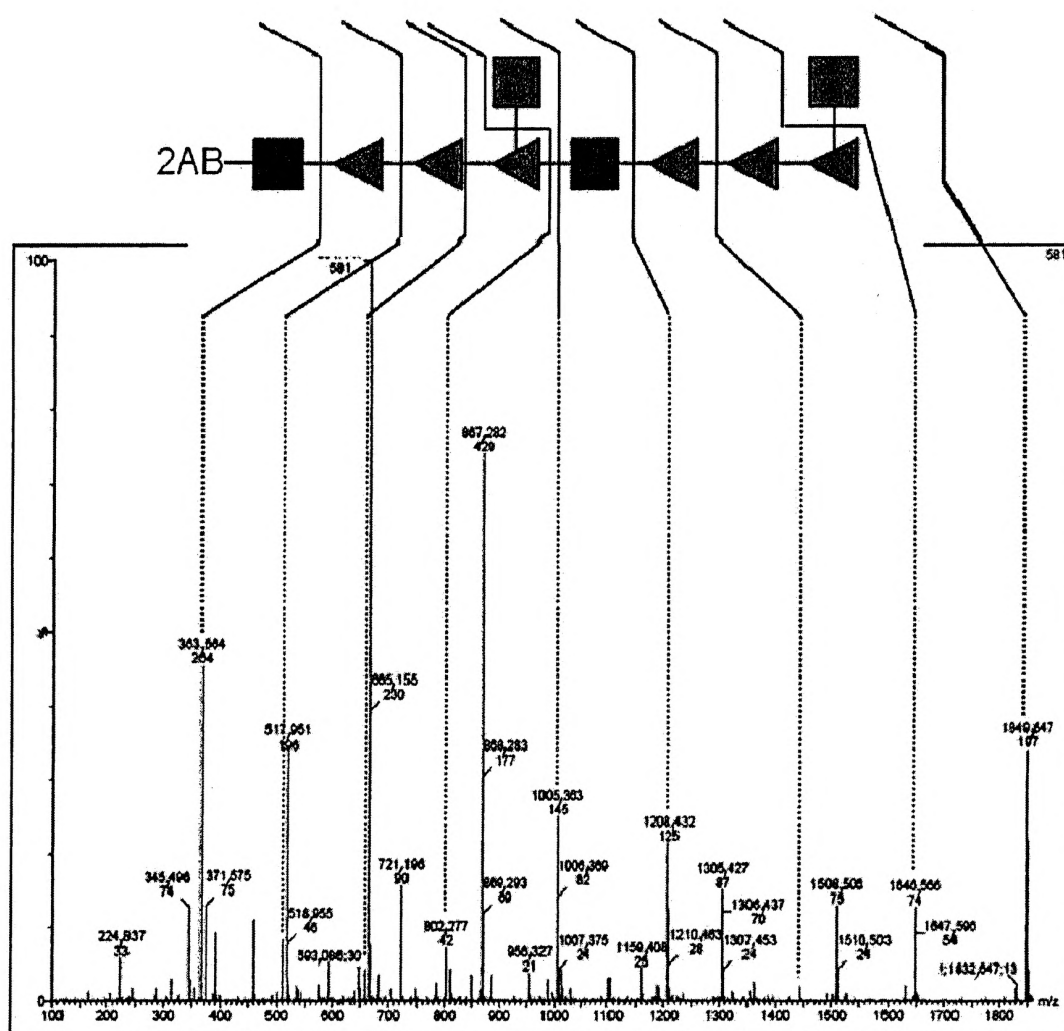


FIG. 14B

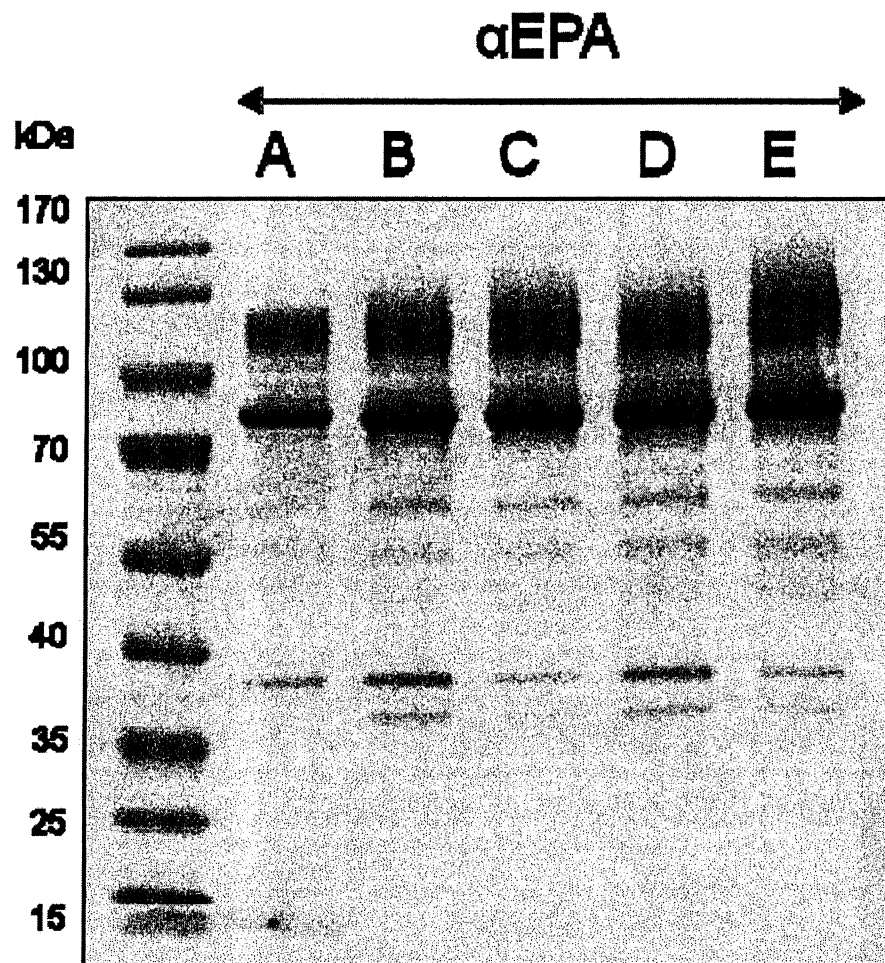


FIG. 15

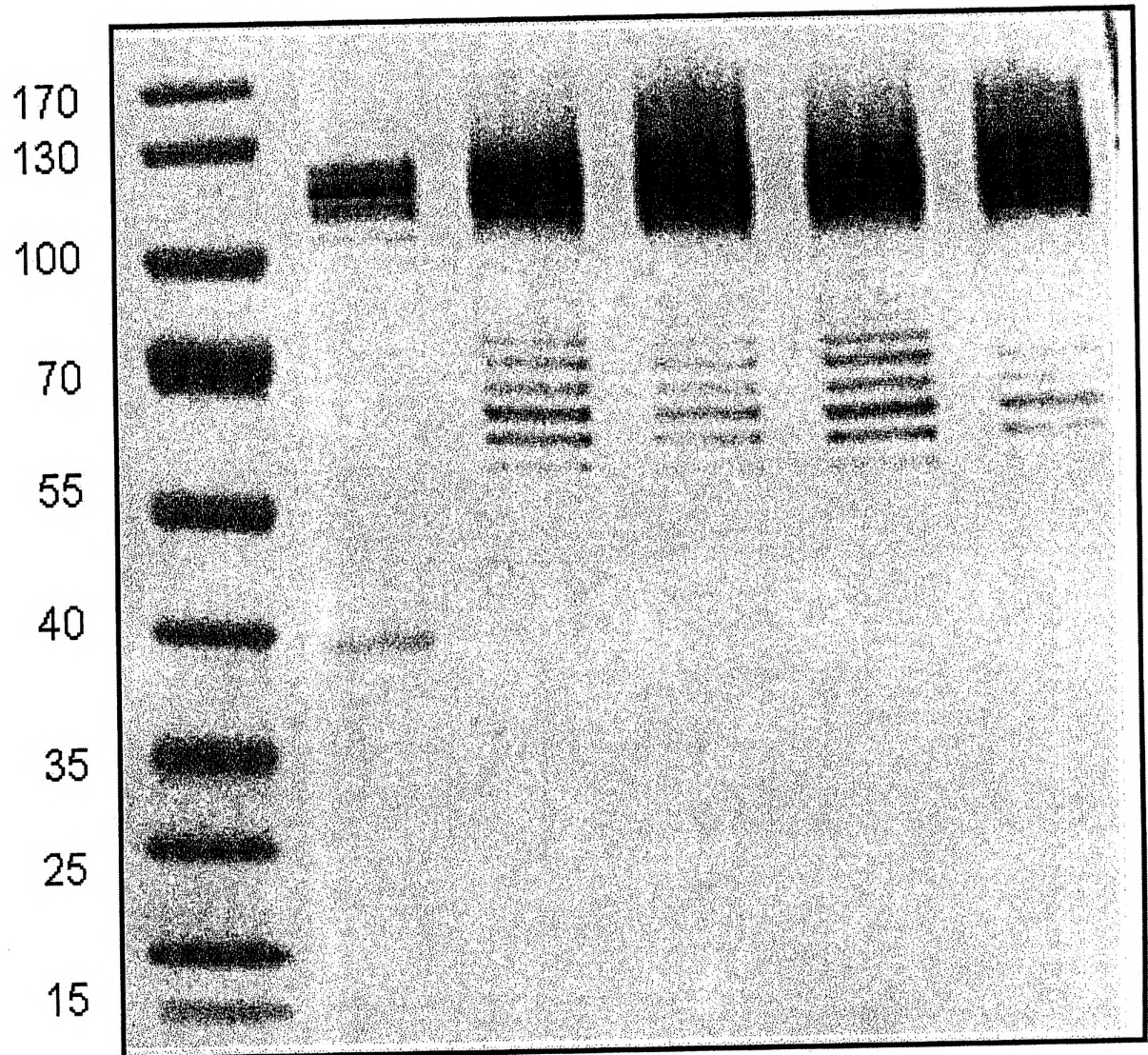


FIG. 16

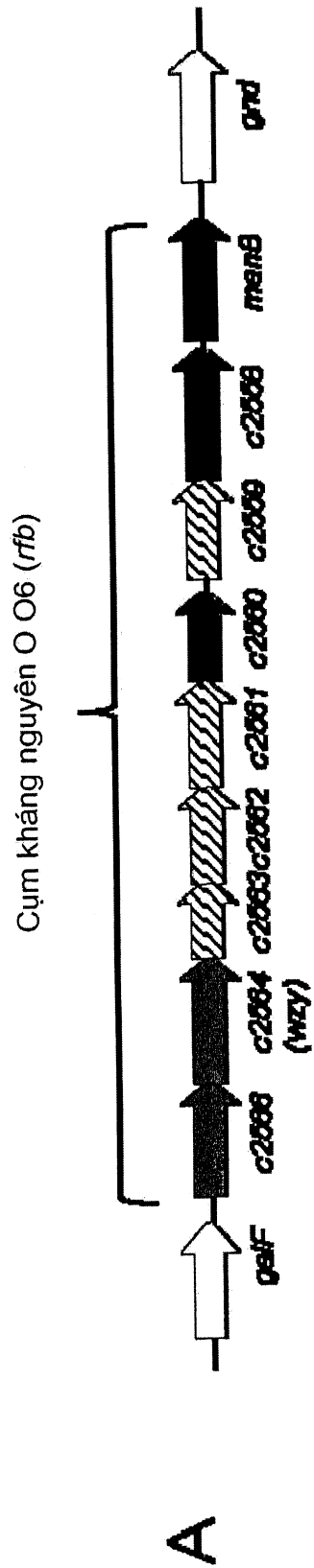


FIG. 17A

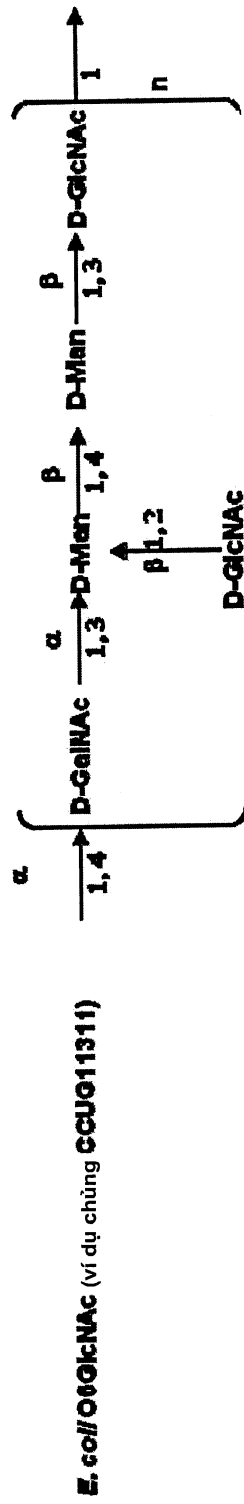
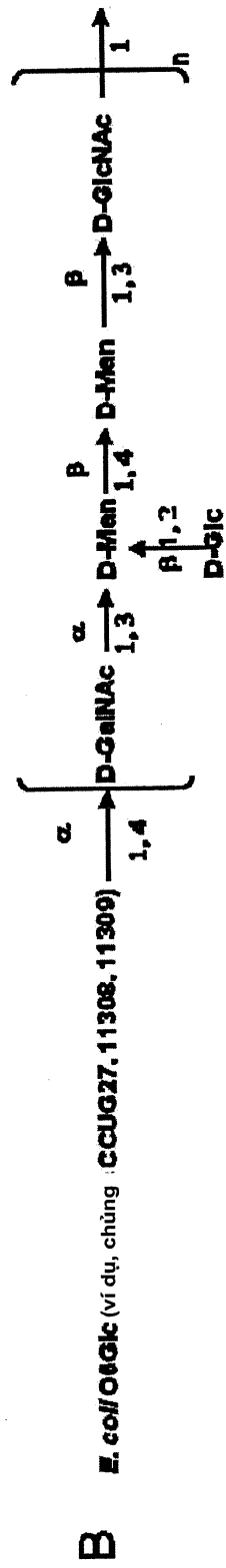


FIG. 17B

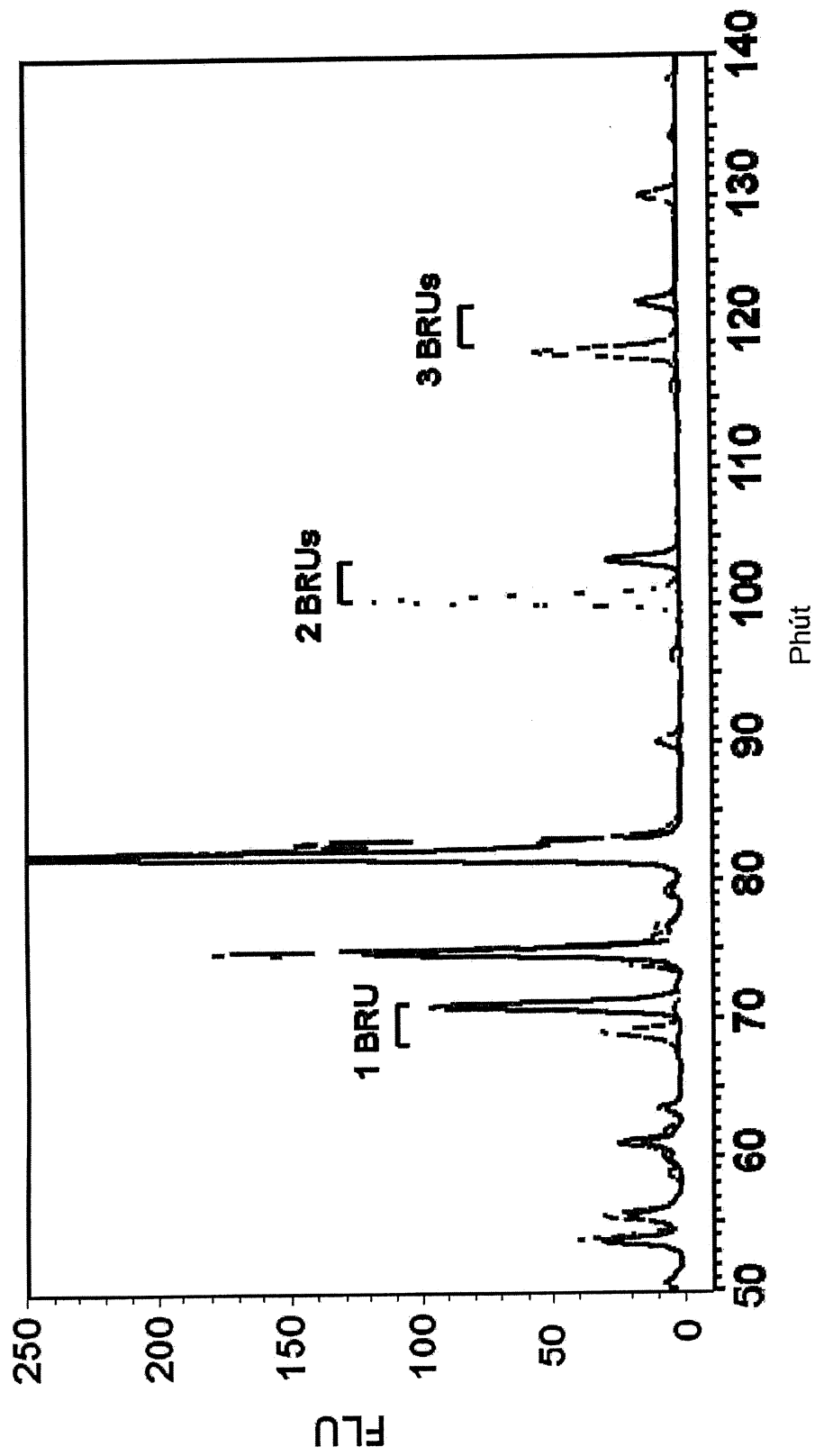


FIG. 18A

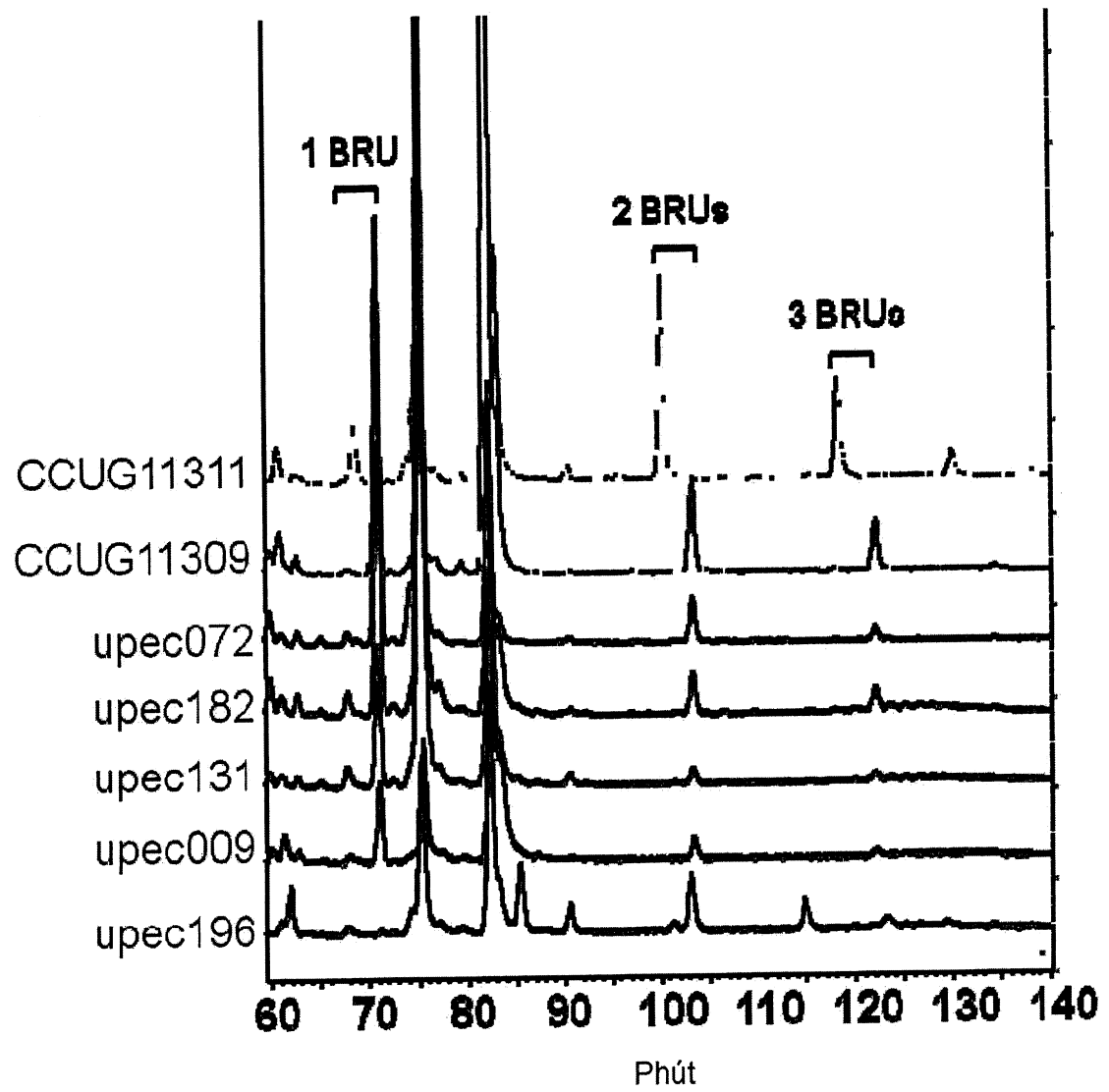


FIG. 18B

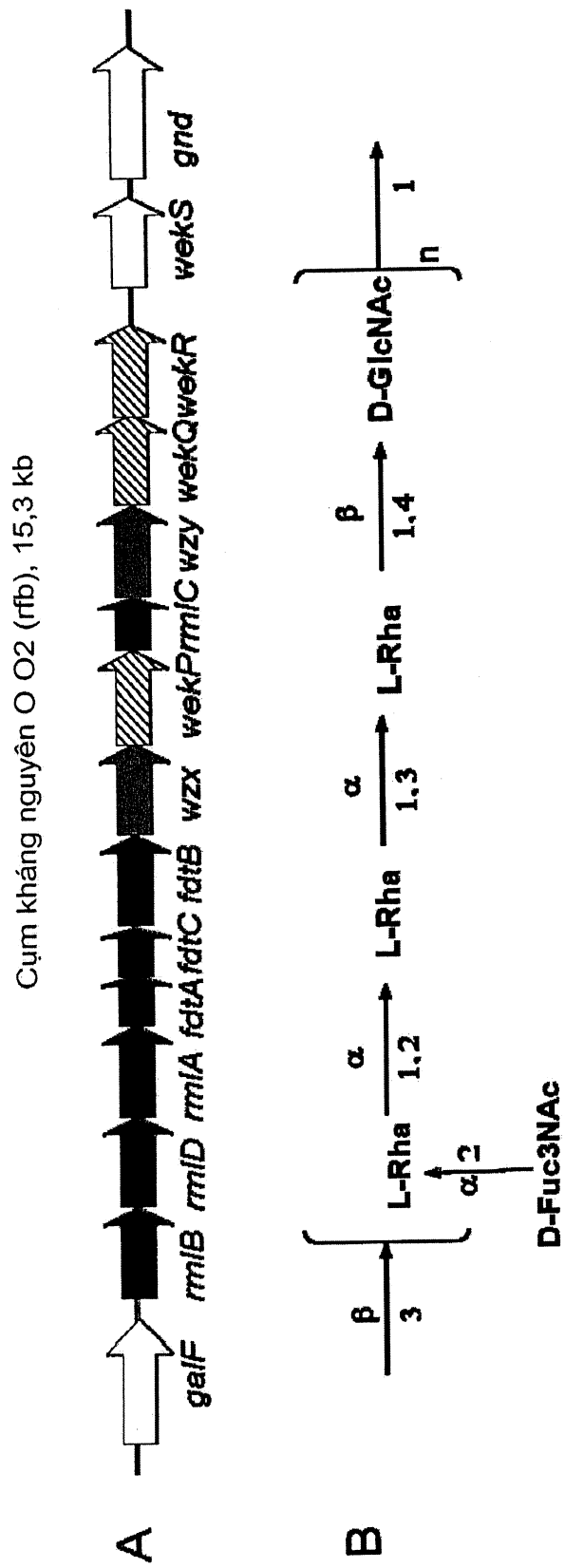


FIG. 19 A-B

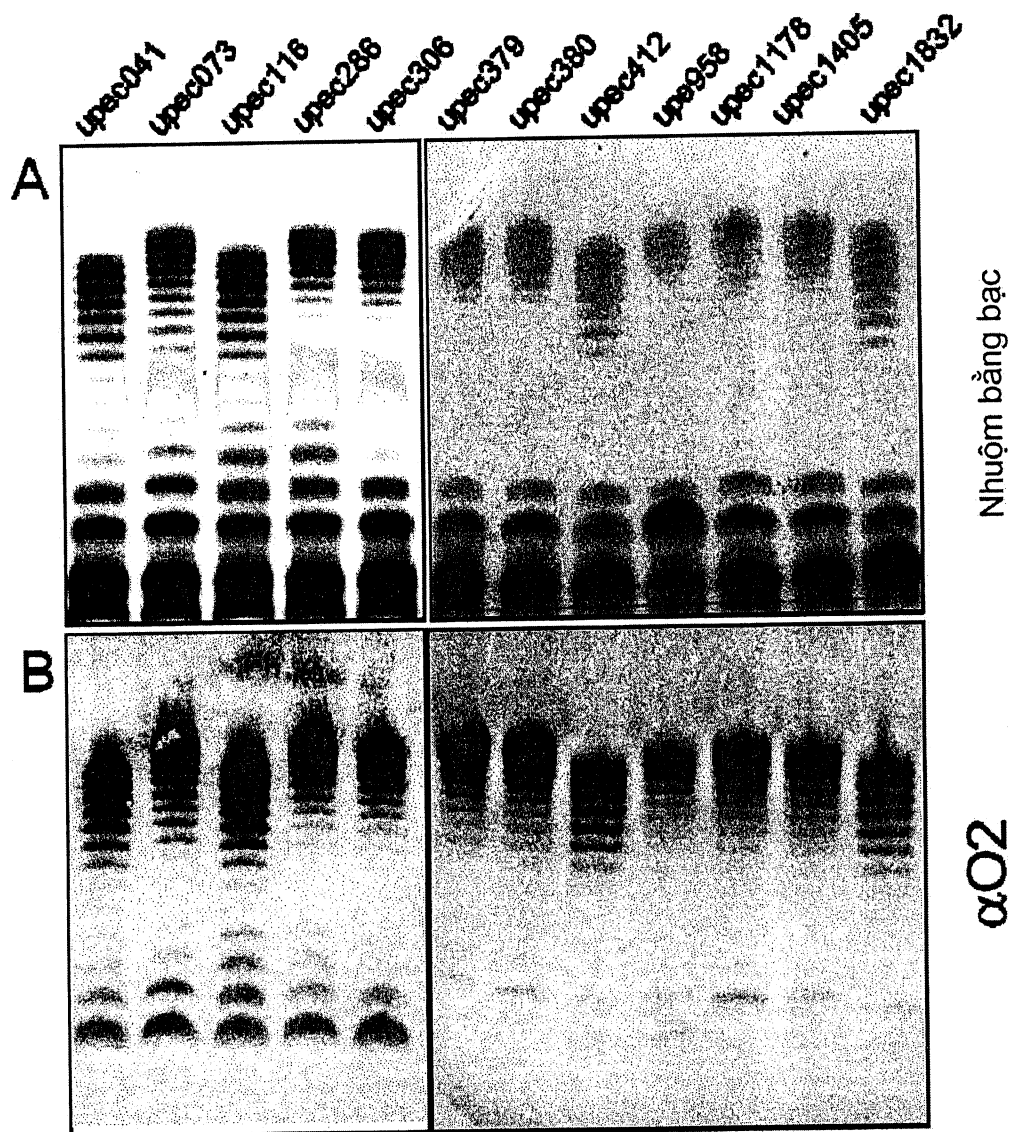


FIG. 20 A-B

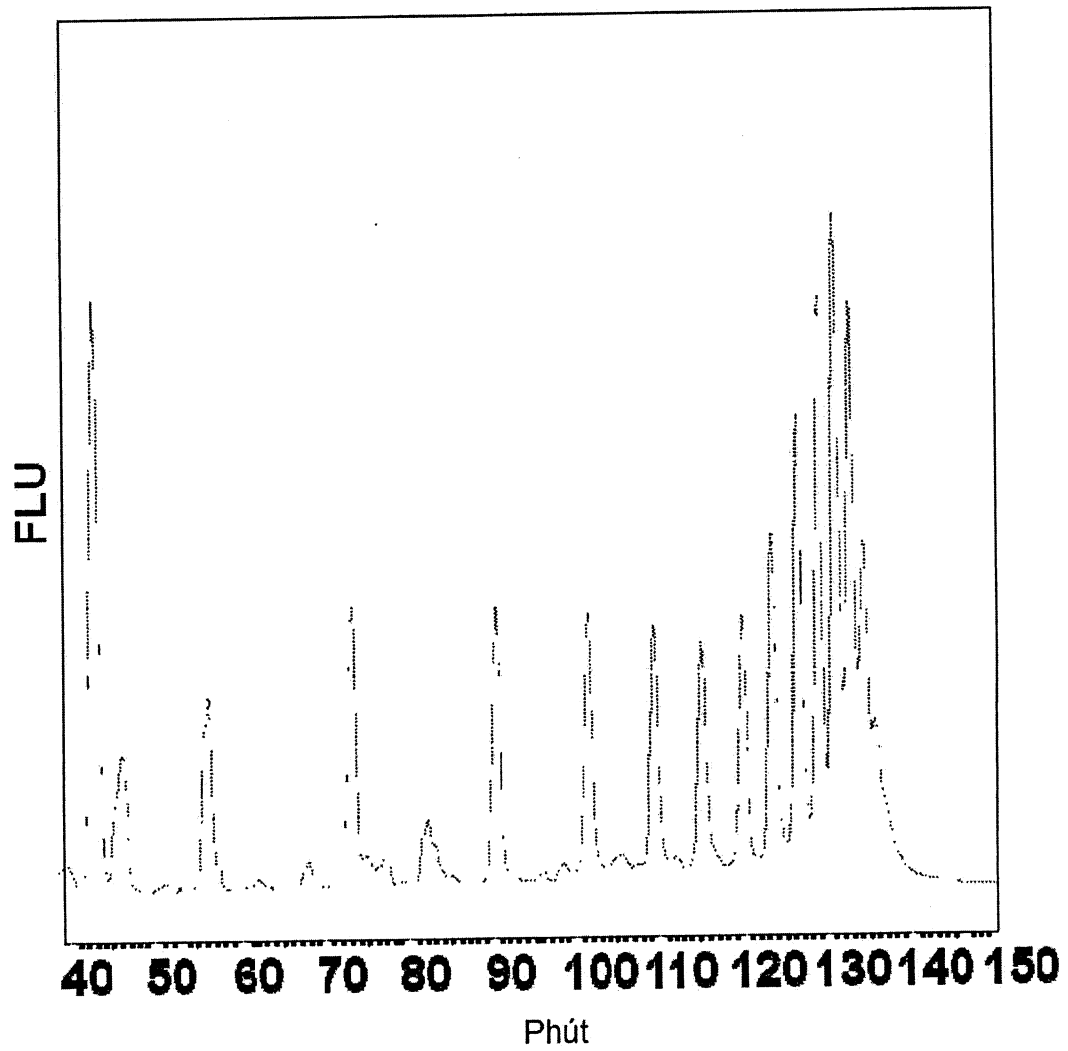


FIG. 21

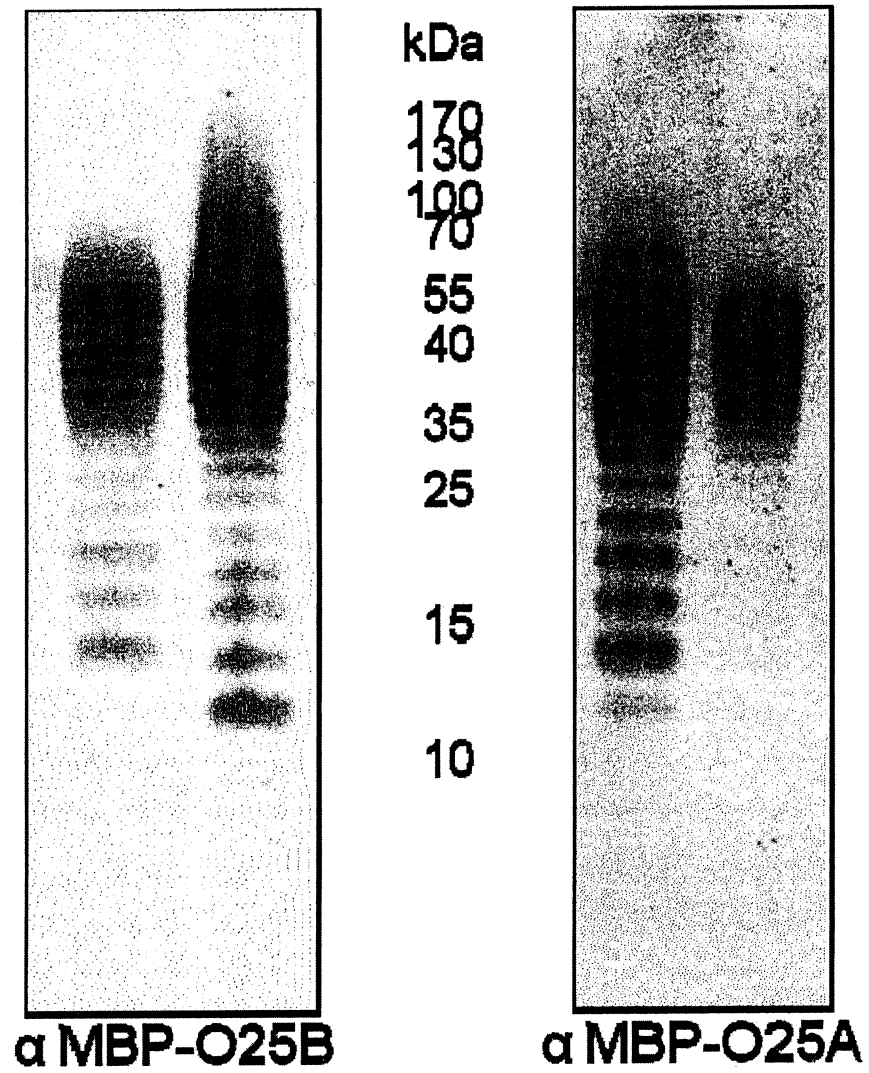


FIG. 22

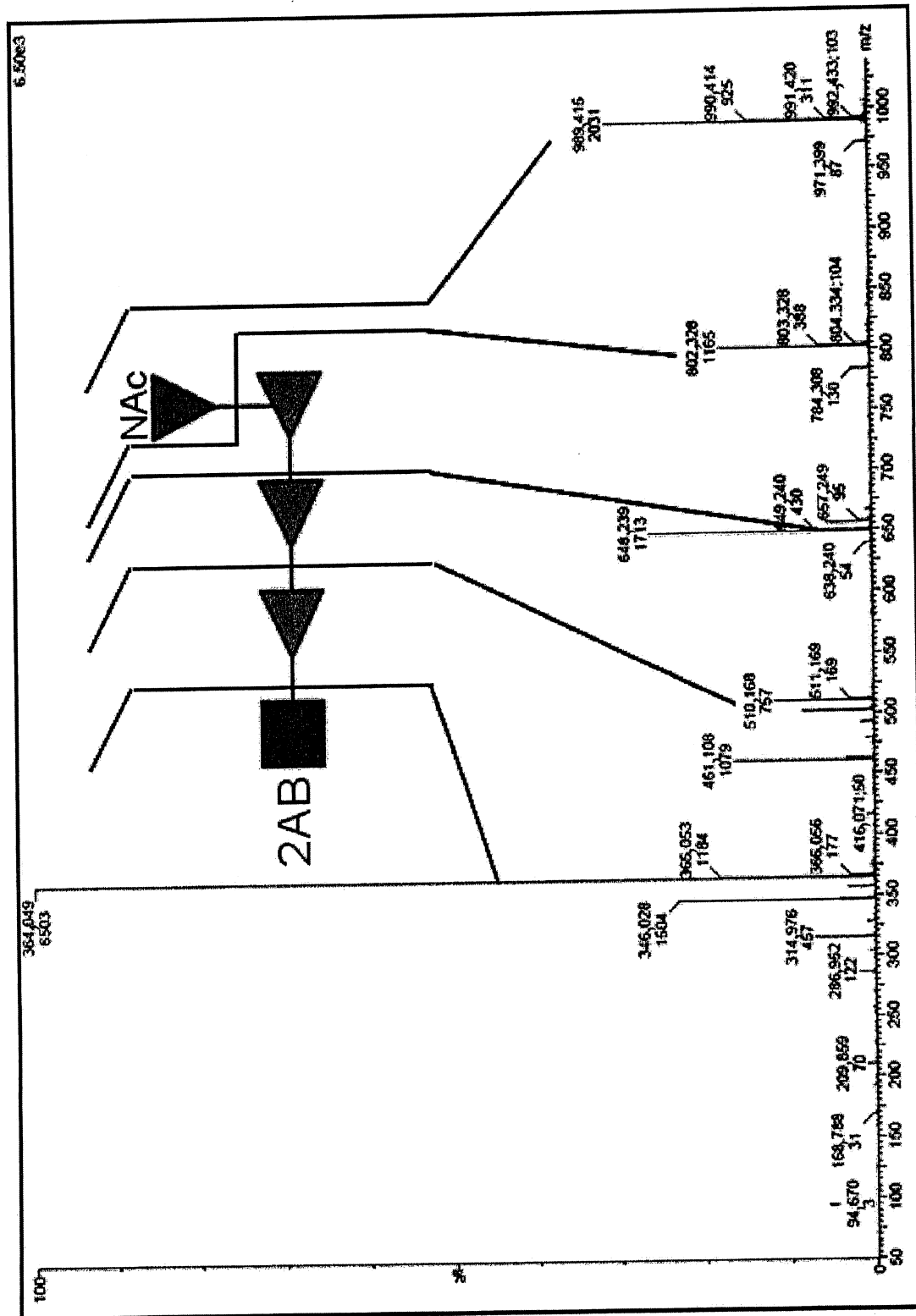


FIG. 23

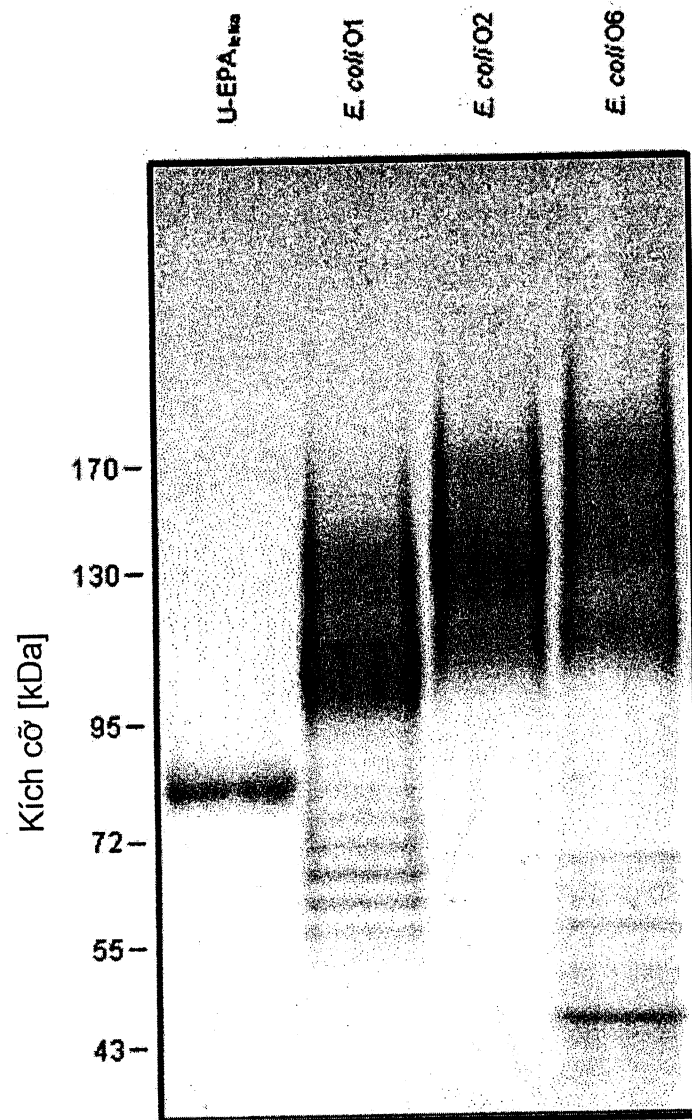


FIG. 24

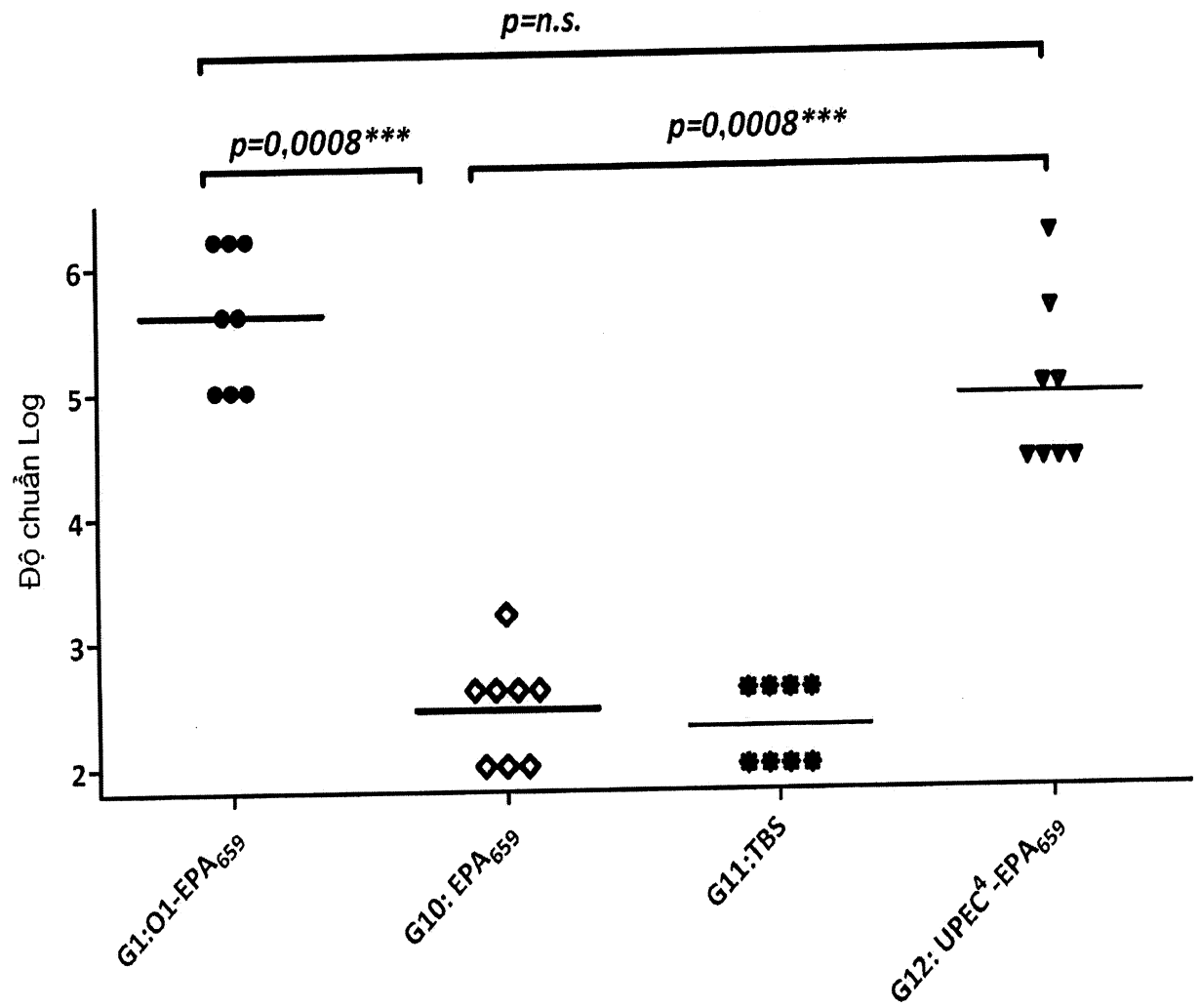


FIG. 25

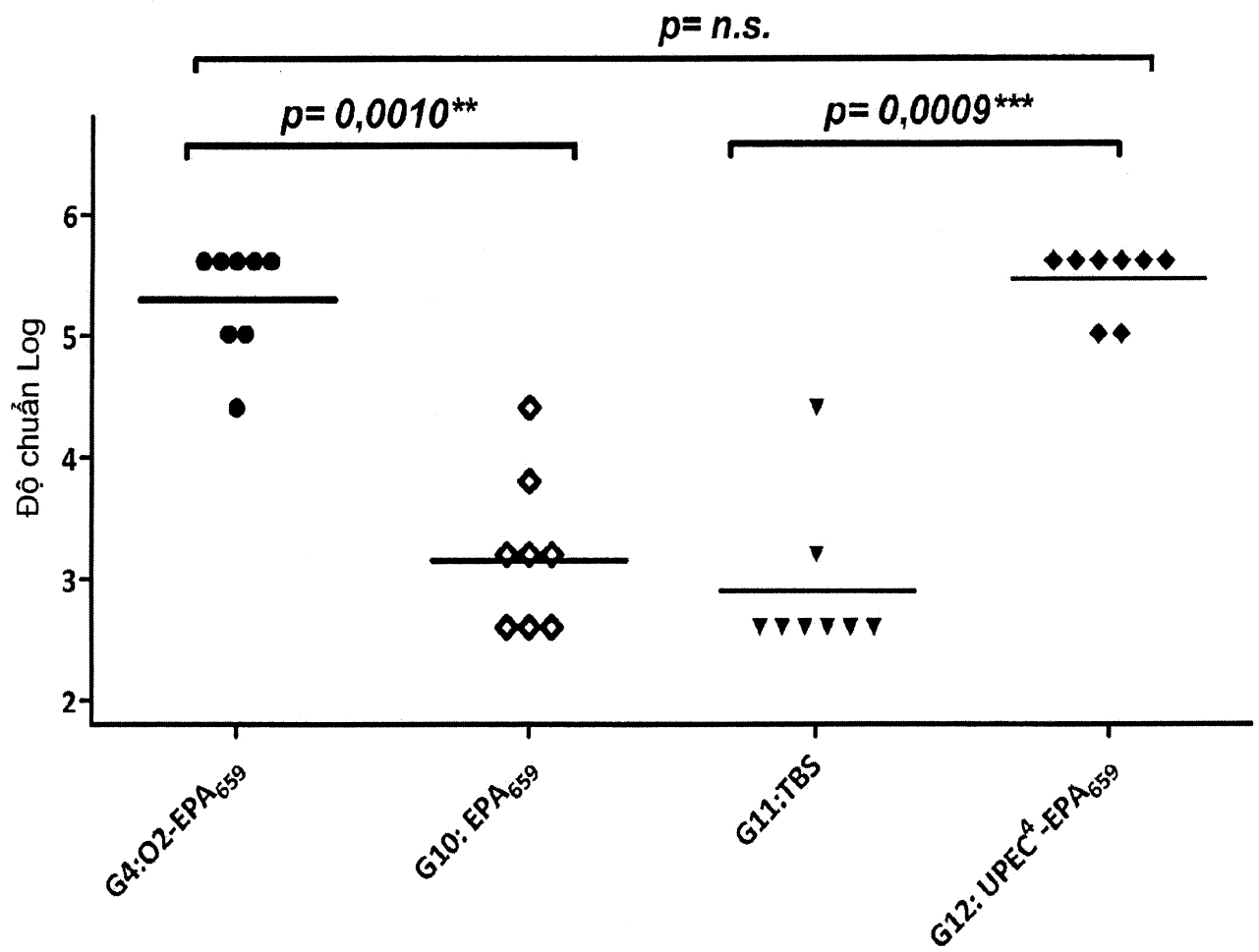


FIG. 26

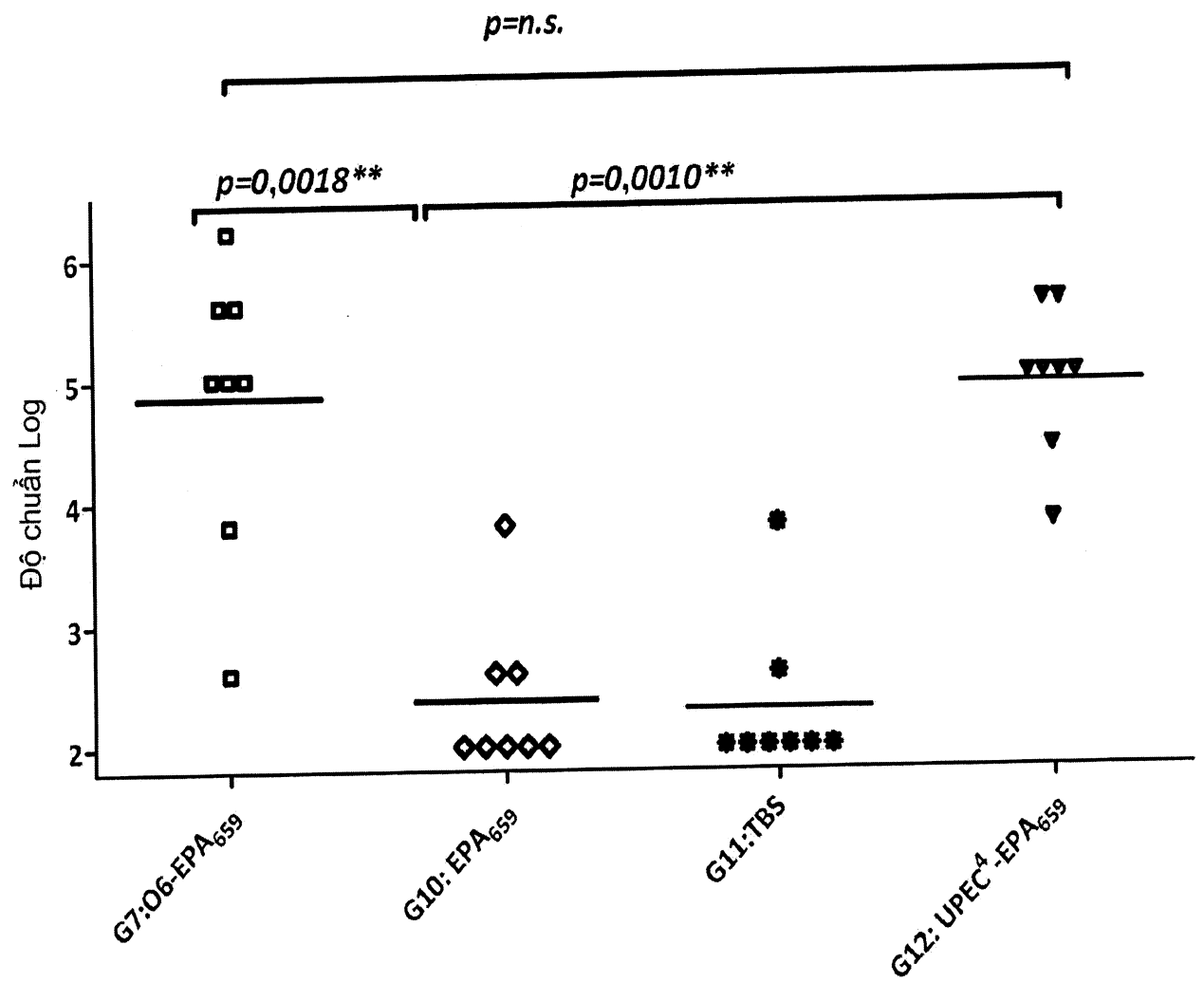


FIG. 27

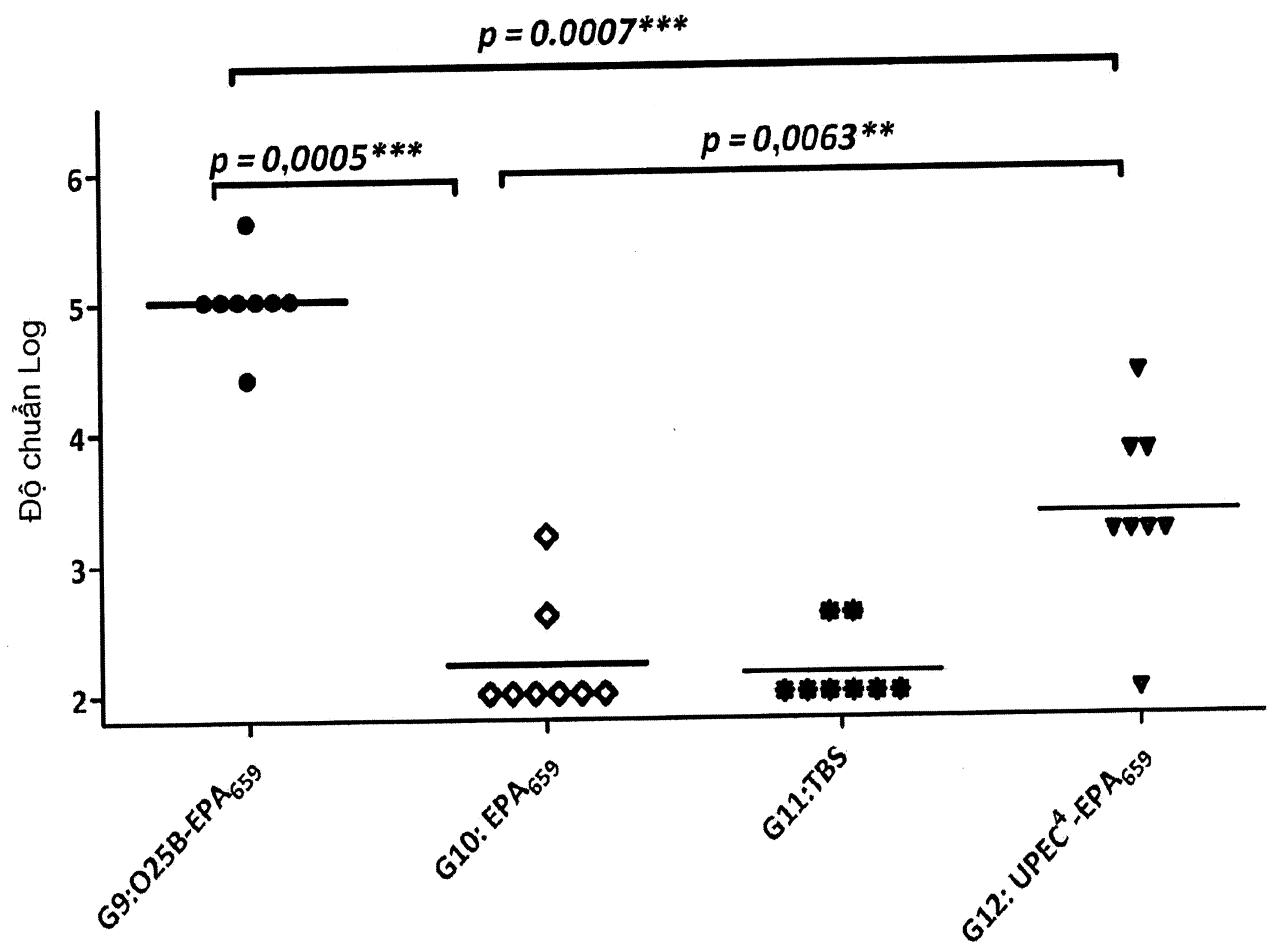


FIG. 28

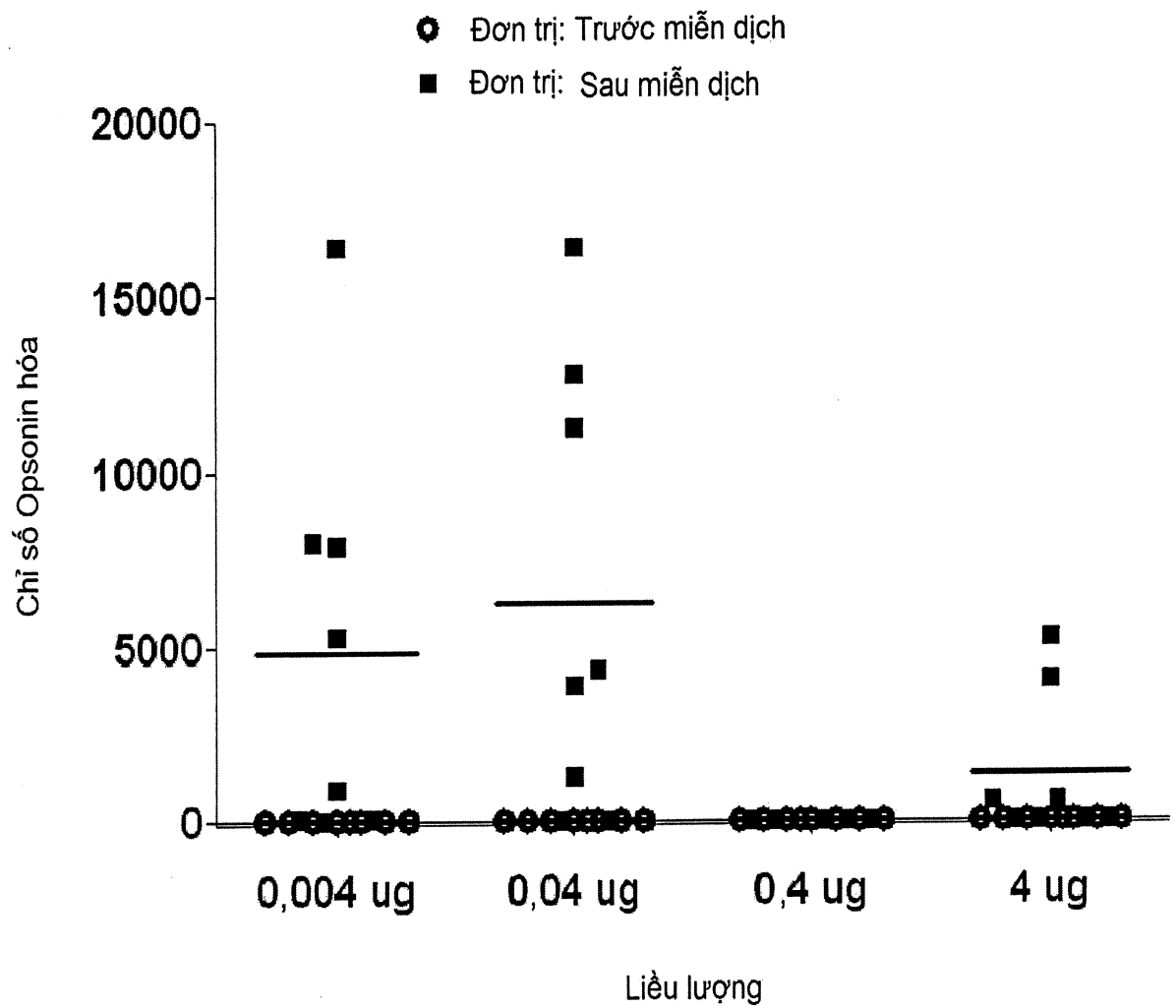


FIG. 29A

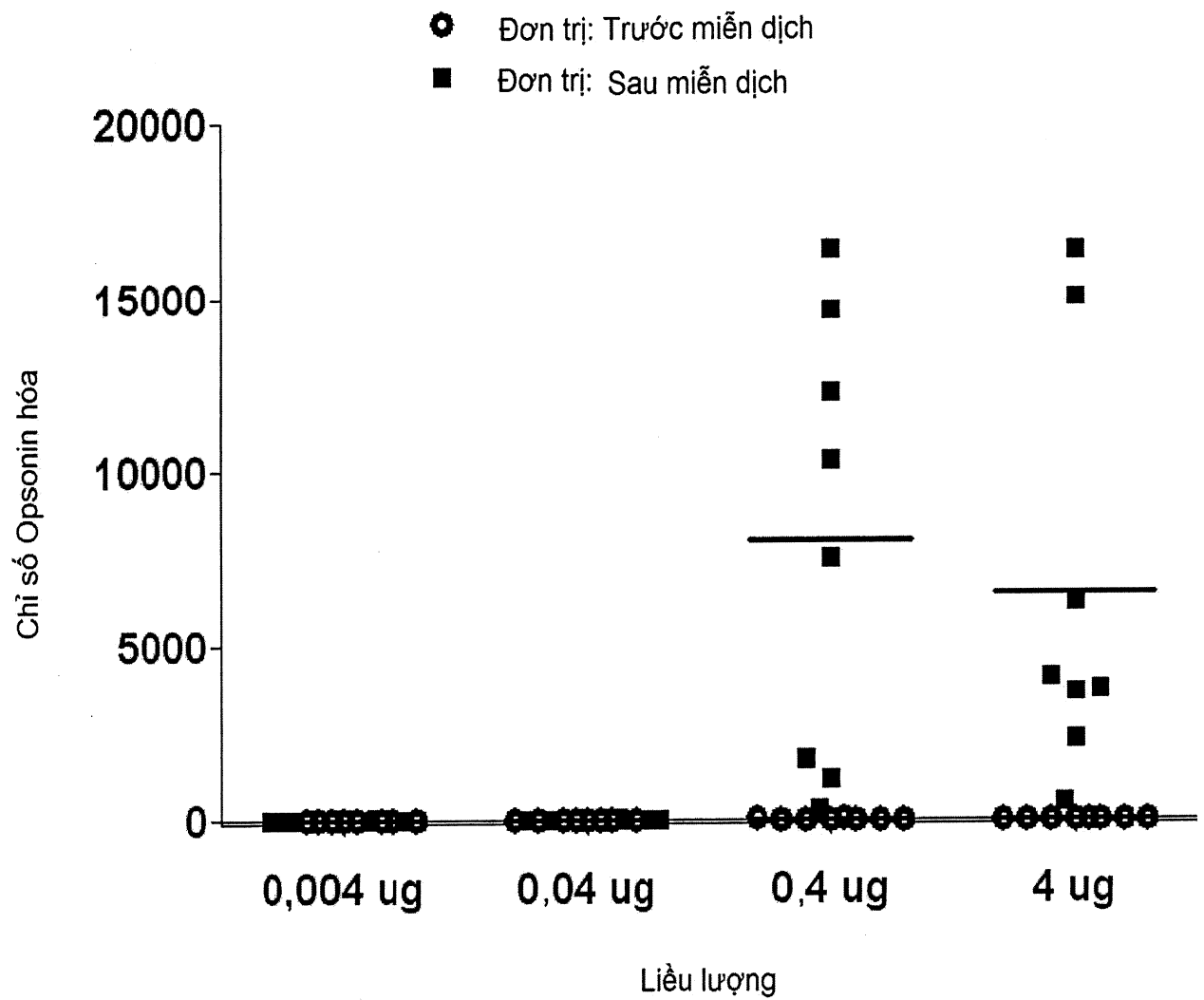
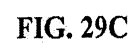


FIG. 29B



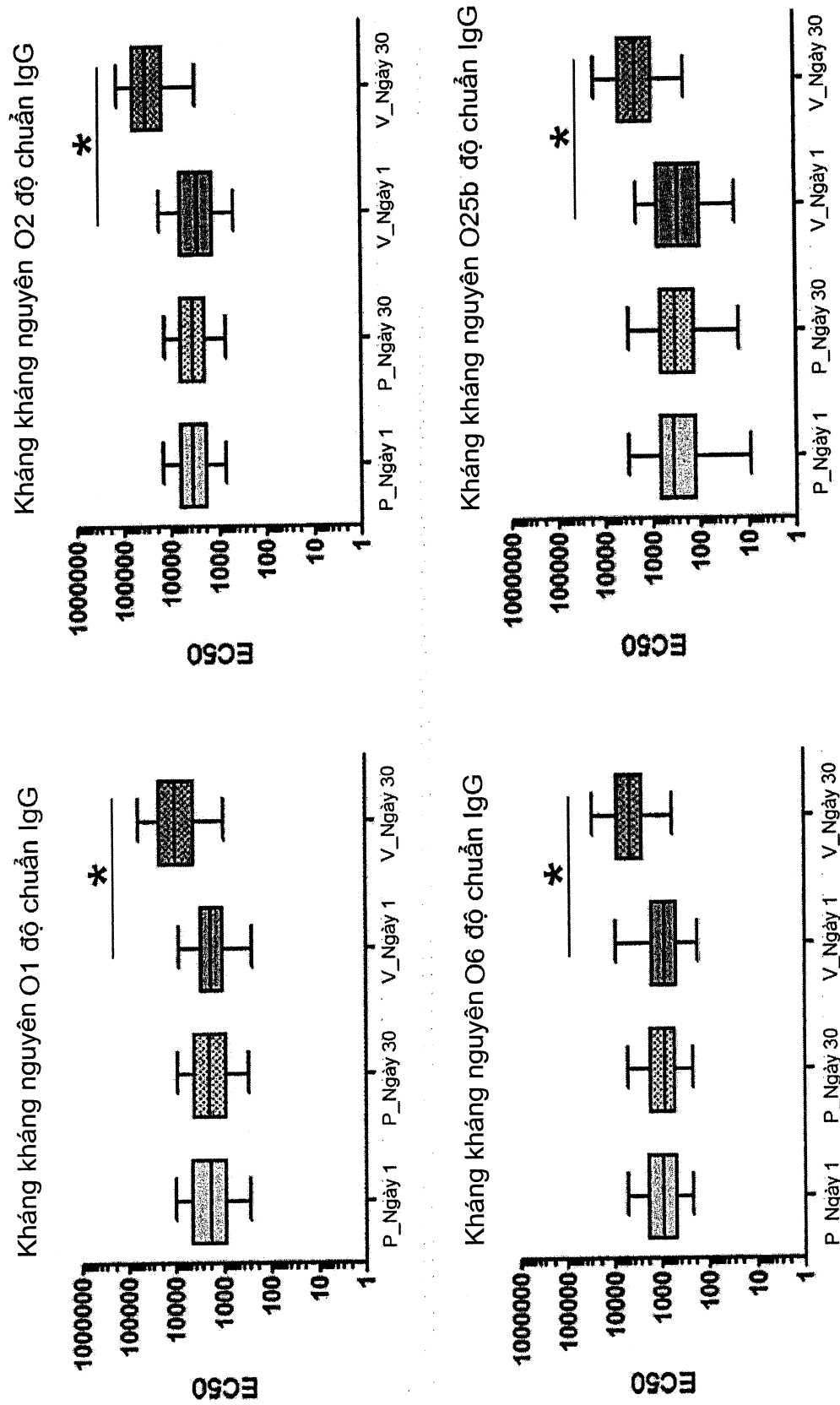


FIG. 30

O1

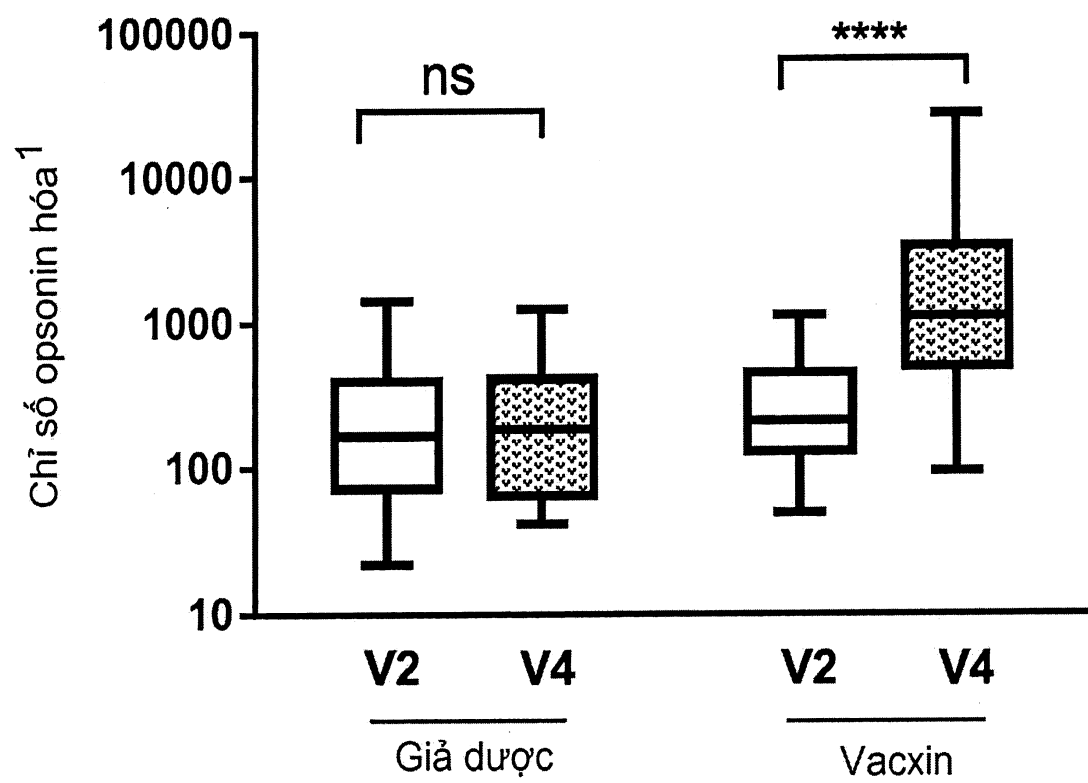


FIG. 31A

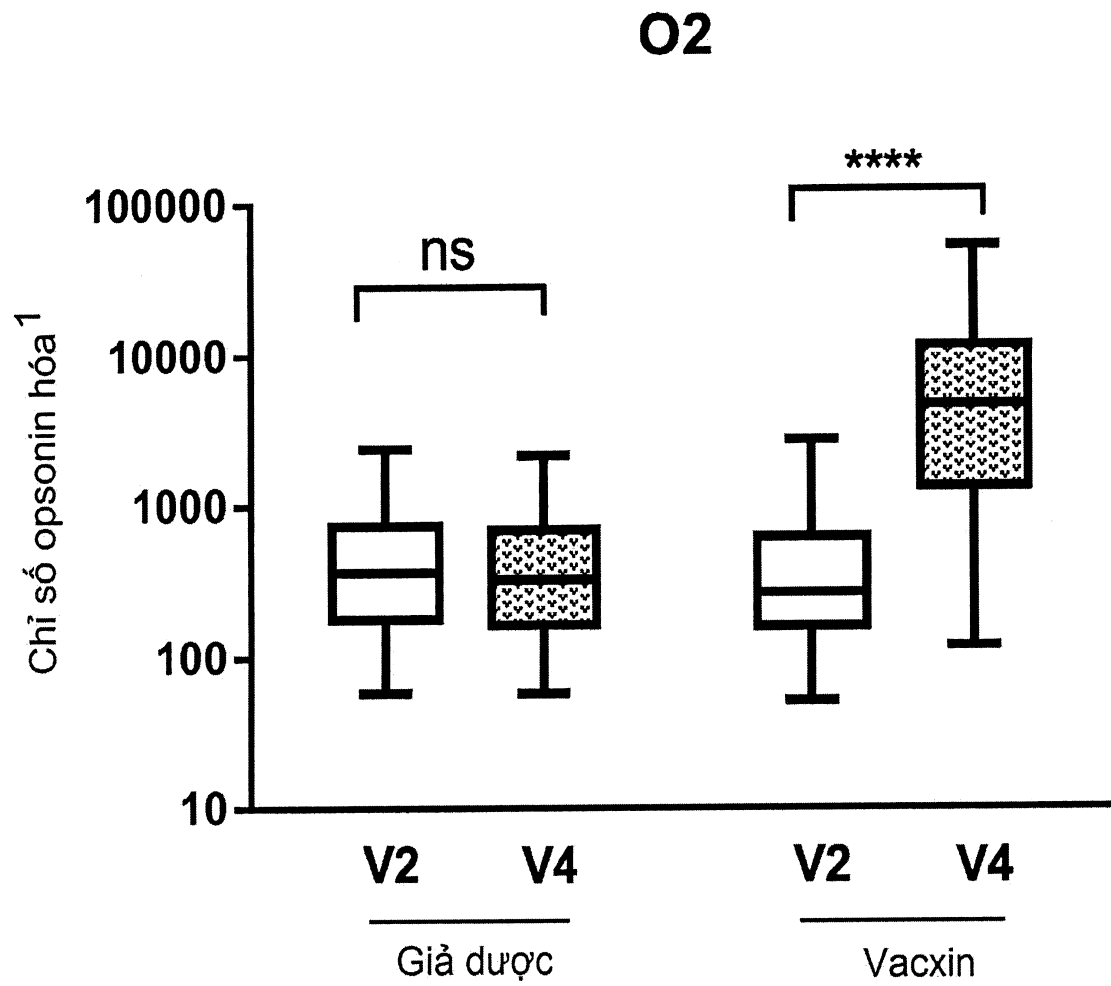


FIG. 31B

O6

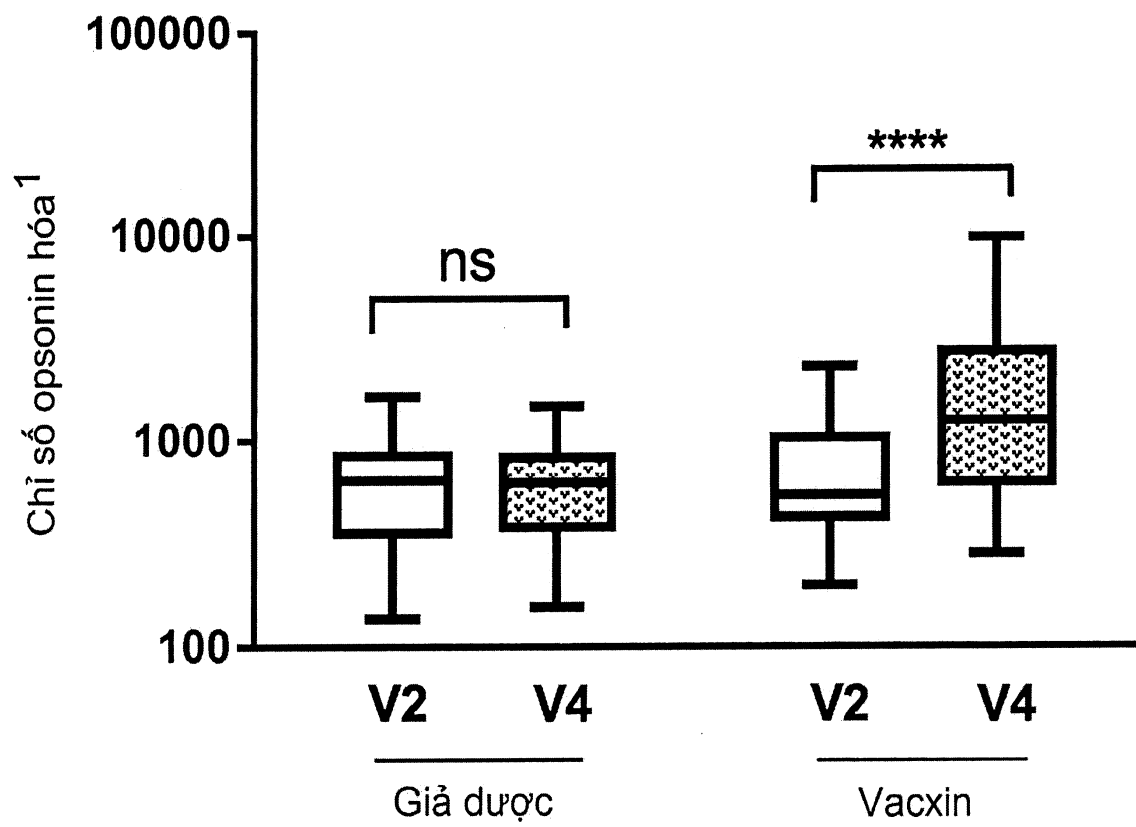


FIG. 31C

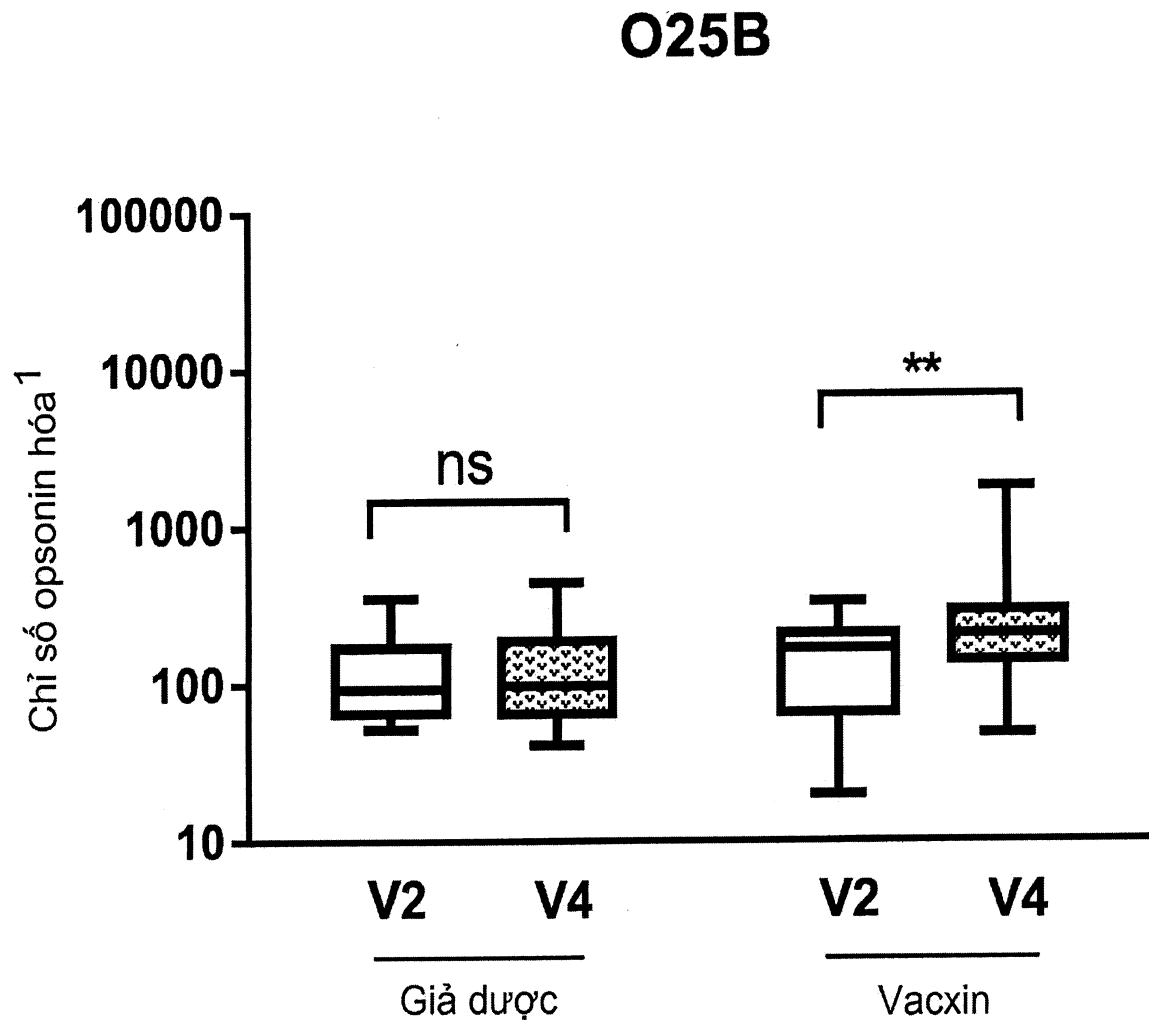


FIG. 31D

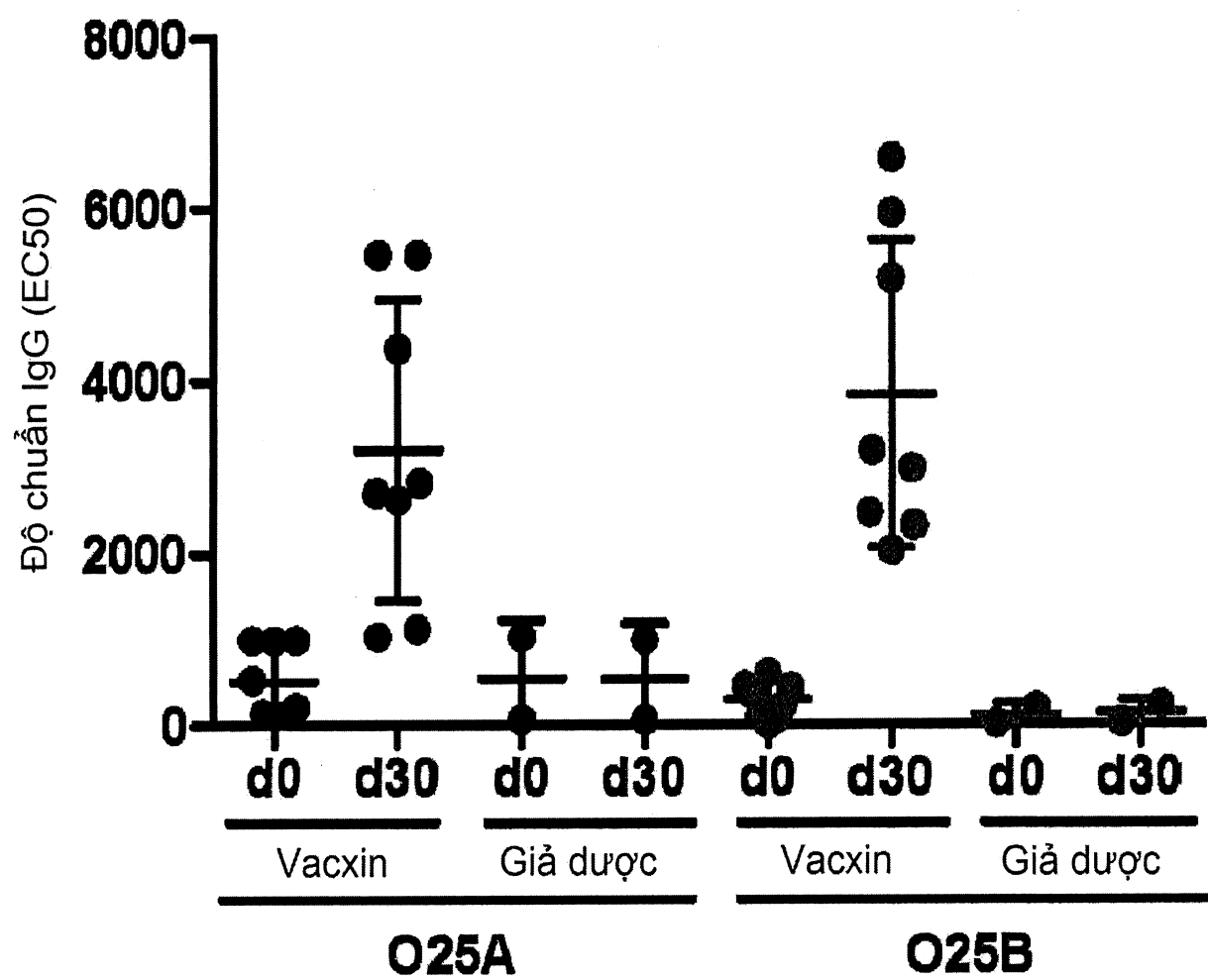


FIG. 32

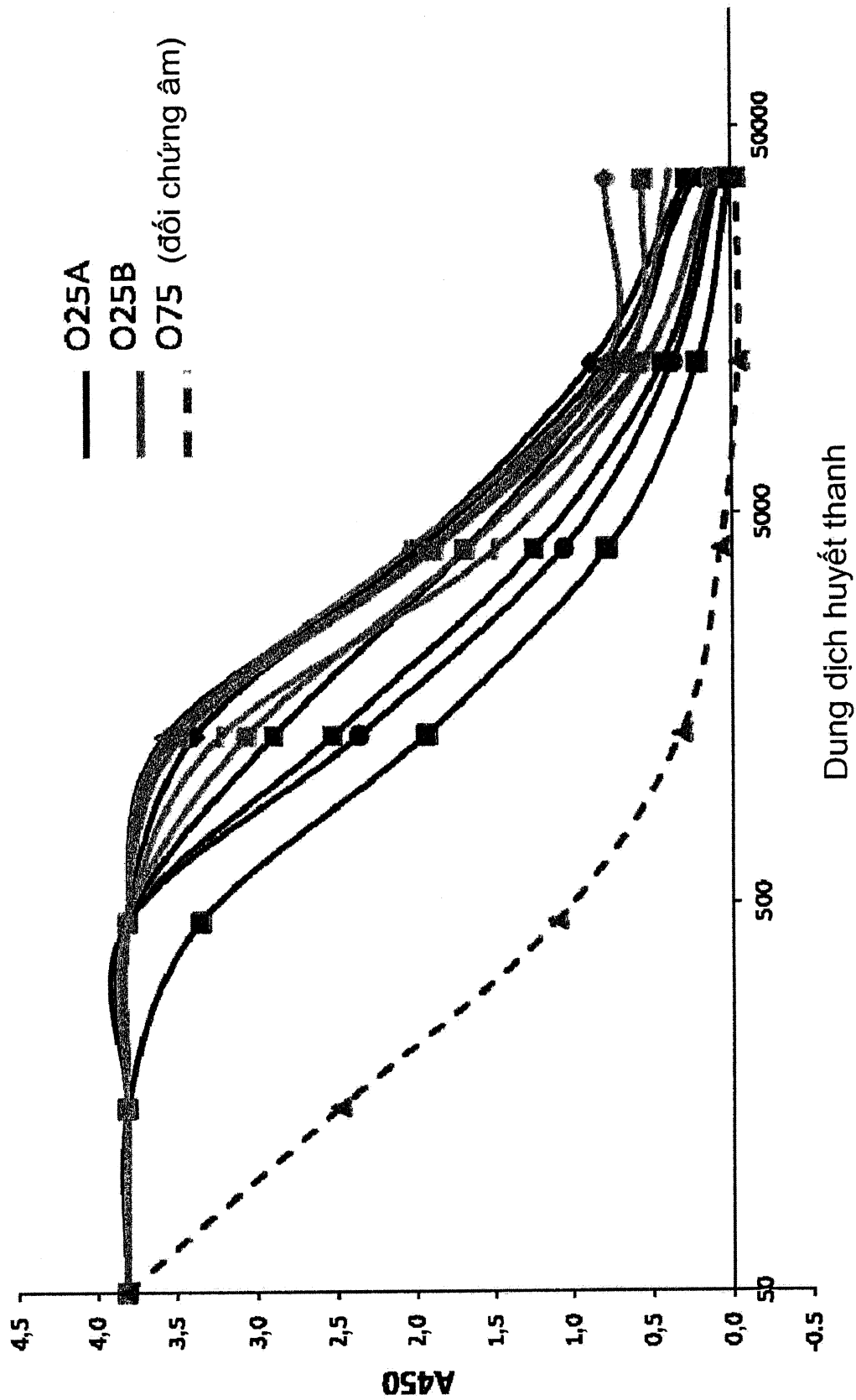


FIG. 33