

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201691478 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2017.02.28

(51) Int. Cl. A61K 39/02 (2006.01)
C07K 14/24 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2015.02.23

(54) НОВЫЙ ПОЛИСАХАРИД И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 61/943,710

(32) 2014.02.24

(33) US

(86) PCT/EP2015/053739

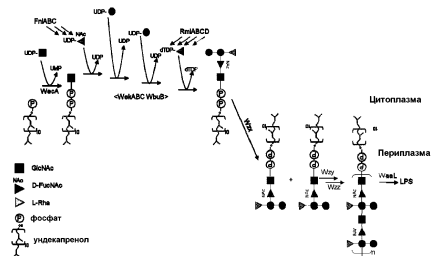
(87) WO 2015/124769 2015.08.27

(71) Заявитель:
ГЛИКОВАКСИН АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Коварик Михель Т., Веттер Михель
Л., Кеммлер Стэфан Дж., Хойпгле
Миха А., Гамбиллара Вероника,
Малли Мануэла (CH)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В. (RU)

(57) В данном документе предложен новый О-полисахарид E. coli. - O25B. В данном документе также предложены прокариотические клетки-хозяева, содержащие ферменты (например гликозилтрансферазы), используемые в получении O25B. Клетки-хозяева, предложенные здесь, продуцируют биоконъюгаты O25B, которые содержат O25B, связанный с белком-носителем. Кроме того, здесь предложены композиции, например фармацевтические композиции, содержащие O25B, и/или биоконъюгаты, содержащие O25B. Такие композиции могут быть использованы в качестве вакцин против инфекции EхPEC (внекишечные патогенные E. coli) и могут дополнительно содержать один или более дополнительных биоконъюгатов.



201691478
A1

201691478
A1

НОВЫЙ ПОЛИСАХАРИД И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

ВВЕДЕНИЕ

В данном документе раскрыта структура антигена O25B *E. coli*, а также применения O25B, способы получения O25B и биоконъюгаты, содержащие O25B. Заявители идентифицировали кластер генов *E. coli*, ответственный за продуцирование O25B, и полностью охарактеризовали структуру антигена O25B. Соответственно, в данном описании изобретения предложены нуклеиновые кислоты, способные продуцировать O25B в клетках-хозяевах. Также в данном описании изобретения предложены клетки-хозяева, например рекомбинантно сконструированные клетки-хозяева, содержащие нуклеиновые кислоты, способные продуцировать O25B. Такие клетки-хозяева можно использовать для получения биоконъюгатов, содержащих O25B, связанный с белком-носителем, которые можно использовать, например, в приготовлении лекарственных препаратов (например вакцин). Антиген O25B, описанный в данном документе, также полезен в получении антител, которые можно использовать, например, в терапевтических способах, таких как пассивная иммунизация субъектов. Кроме того, в данном описании изобретения предложены композиции, содержащие O25B, один или в комбинации с другими антигенами *E. coli* (например O1, O2 и O6 и их субсеротипами), для применения в терапевтических способах, например в вакцинации хозяев против инфекции *E. coli* (например внекишечными патогенными, такими как уропатогенные, *E. coli*).

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Внекишечные патогенные *E. coli* (ExPEC) вызывают широкий спектр инфекций, которые приводят к существенной заболеваемости, смертности и ежегодным расходам. Инфекции мочевыводящих путей являются одними из наиболее частых заболеваний, вызванных ExPEC у людей. Однако опасные для жизни состояния, такие как менингит и сепсис, также вызваны ExPEC.

Устойчивость бактерий к антибиотикам является серьезной проблемой в борьбе с бактериальной инфекцией, и штаммы *E. coli* с множественной лекарственной устойчивостью (MDR) становятся все более и более

распространенными. См. Schito et al., 2009, Int. J. Antimicrob. Agents 34(5):407-413; и Pitout et al., 2012, Expert Rev. Anti. Infect. Ther. 10(10):1165-1176. Таким образом, требуется разработка эффективных вакцин против ExPEC.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, содержащая нуклеиновые кислоты, кодирующие ферменты (например гликозилтрансферазы), способные продуцировать раскрытый в данном описании изобретения новый полисахарид O25B *E. coli*. В данном описании изобретения также предложены клетки-хозяева, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие ферменты (например гликозилтрансферазы), способные продуцировать другие антигены *E. coli*, например O25A, O1, O2 и O6 и их субсеротипы. Клетки-хозяева, предложенные в данном описании изобретения, могут естественным образом экспрессировать нуклеиновые кислоты, специфичные в отношении продуцирования представляющего интерес O-антигена, или клетки-хозяева, можно получить так, чтобы они экспрессировали такие нуклеиновые кислоты, то есть в некоторых воплощениях указанные нуклеиновые кислоты являются гетерологичными для клеток-хозяев. В некоторых воплощениях клетки-хозяева, предложенные в данном описании изобретения, содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие дополнительные ферменты, принимающие активное участие в N-гликозилировании белков, например, клетка-хозяин, предложенная в данном описании изобретения, может дополнительно содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую олигосахарил-трансферазу, или нуклеиновые кислоты, кодирующие другие гликозилтрансферазы. В некоторых воплощениях клетки-хозяева, предложенные в данном описании изобретения, содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-носитель, например белок, к которому олигосахариды и/или полисахариды могут быть присоединены с образованием биоконъюгата. В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*. См. Раздел 5.3.

В конкретном воплощении предложена прокариотическая клетка-хозяин, содержащая кластер генов *E. coli rfb* (урец138) (SEQ ID NO: 12) или кластер генов, который примерно или по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен или гомологичен кластеру генов *E. coli*

rfb(урес138) (SEQ ID NO: 12). В конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, содержащая кластер генов *rfb*(урес163) *E. coli* или кластер генов, который примерно или по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен или гомологичен кластеру генов *rfb*(урес163) *E. coli*. В конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, содержащая кластер генов *rfb*(урес177) *E. coli* или кластер генов, который примерно или по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен или гомологичен кластеру генов *rfb*(урес177) *E. coli*. В конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В другом

конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, рекомбинантно сконструированная так, чтобы содержать (например путем введения одного или более векторов/плазмид в клетку-хозяина) один, два, три, четыре или более из следующих генов (или нуклеиновую кислоту, которая примерно или по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична или гомологична одному из следующих генов): *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) и/или *wbbL* (SEQ ID NO: 11). В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу (например гетерологичную олигосахарил-трансферазу). В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин рекомбинантно сконструированная так, чтобы содержать (например путем введения одного или более векторов/плазмид в клетку-хозяина) один, два, три, четыре или более из

следующих: (1) dTDP-Глюкозо-4,6-дегидратаза; (2) dTDP-6-Дезокси-D-глюкозо-3,5-эпимераза; (3) Глюкозо-1-фосфат-тимидилитрансфераза; (4) dTDP-4-дегидрорамнозо-3,5-эпимераза; (5) O-антиген-флиппаза; (6) dTDP-Rha:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP- α -1,3-рамнозилтрансфераза; (7) UDP-Glc:Rha-GlcNAc-UPP- α -1,3-гликозилтрансфераза; (8) O-антиген-полимераза; (9) O-ацетилтрансфераза; (10) UDP-Glc:Rha-GlcNAc-UPP- α -1,3-гликозилтрансфераза; и/или (11) dTDP-Rha:GlcNAc-UPP- α -1,3-рамнозилтрансфераза. В конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу (например гетерологичную олигосахарил-трансферазу). В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

В некоторых воплощениях прокариотические клетки-хозяева, предложенные в данном описании изобретения, имеют делецию или функциональную инактивацию одного или более генов. См. Раздел 5.3.1. В конкретном воплощении один или более из гена *waaL*, гена *gtrA*, гена *gtrB*, гена *gtrS* или кластера генов *rfa* (или ген или гены в кластере *rfa*) удалены или функционально инактивированы в геноме прокариотической клетки-хозяина, предложенной в данном описании изобретения.

Белки-носители, экспрессируемые прокариотическими клетками-хозяевами, предложенными в данном описании изобретения, могут быть выбраны из любого белка-носителя, известного специалистам в данной области, например детоксифицированного экзотоксина A из *P. aeruginosa* (EPA; см., например Ihssen, et al., (2010) *Microbial cell factories* 9, 61), CRM197, мальтозосвязывающего белка (MBP), дифтерийного анатоксина, столбнячного анатоксина, детоксифицированного гемолизина A из *S. aureus*, фактора

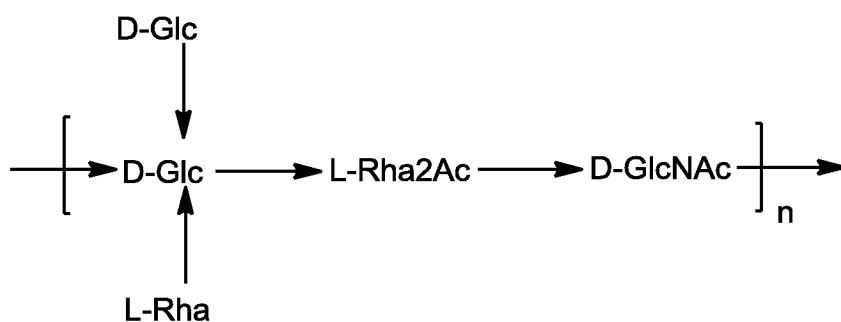
агглютинации А, фактора агглютинации В, FimH *E. coli*, FimHC *E. coli*, термолабильного энтеротоксина *E. coli*, детоксифицированных вариантов термолабильного энтеротоксина *E. coli*, В-субъединицы холерного токсина (СТВ), холерного токсина, детоксифицированных вариантов холерного токсина, белка Sat *E. coli*, домена-пассажира белка Sat *E. coli*, пневмолизина *Streptococcus pneumoniae* и его детоксифицированных вариантов, AcrA *C. jejuni* и природных гликопротеинов *C. jejuni*. В конкретном воплощении белок-носитель, экспрессируемый прокариотической клеткой-хозяином, предложенной в данном описании изобретения, представляет собой детоксифицированный экзотоксин *Pseudomonas* (EPA). В некоторых воплощениях белок-носитель клетки-хозяина, предложенный в данном описании изобретения, содержит сигнальную последовательность для нацеливания белка-носителя в периплазматическое пространство клетки-хозяина. В конкретном воплощении сигнальная последовательность происходит из DsbA *E. coli*, порина А внешней мембраны (OmpA) *E. coli*, мальтозосвязывающего белка (MalE) *E. coli*, пектатлиазы (PelB) *Erwinia carotovora*s, FlgI, NikA или эндоксилазазы (XynA) *Bacillus* sp, термолабильного энтеротоксина LTIIb *E. coli*, эндоксилазазы XynA *Bacillus* или флагеллина (FlgI) *E. coli*. В некоторых воплощениях нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, экспрессируемую клетками-хозяевами, полученными в данном изобретении, конструировали (например рекомбинантными способами) так, чтобы она кодировала одну или более консенсусных последовательностей Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); и/или консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В некоторых воплощениях белки-носители, экспрессируемые клетками-хозяевами, предложенными в данном описании изобретения, содержат два, три, четыре, пять или более указанных консенсусных последовательностей. См. Раздел 5.3.2.

В другом аспекте в данном описании изобретения предложен способ получения N-гликозилированного белка-носителя (также называемого в данном описании изобретения биоконъюгат), который содержит белок-носитель

(например EPA), *N*-связанный с O-антигеном *E. coli* (например O25B *E. coli*), где указанный способ включает культивирование клетки-хозяина, описанной в данном описании изобретения, в условиях, подходящих для получения белков, и очистку *N*-гликозилированного белка-носителя. Способы получения белков с использованием клеток-хозяев, например *E. coli*, и выделение белков, продуцируемых клетками-хозяевами, хорошо известны в данной области техники. См. Раздел 5.3.

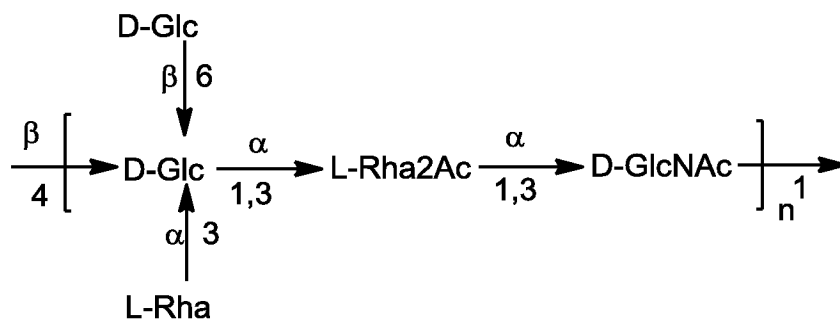
В другом аспекте предложены биоконъюгаты, продуцируемые клетками-хозяевами, предложенными в данном описании изобретения. В конкретном воплощении в данном описании изобретения предложен биоконъюгат, содержащий белок-носитель (например EPA), *N*-связанный с O25B *E. coli*. См. Раздел 5.4.

В конкретном воплощении в данном описании изобретения предложен биоконъюгат, содержащий белок-носитель (например EPA), связанный с соединением формулы O25B, представленной ниже:



где n представляет собой целое число от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20. В конкретном воплощении белок-носитель *N*-связан с O-антигеном формулы O25B.

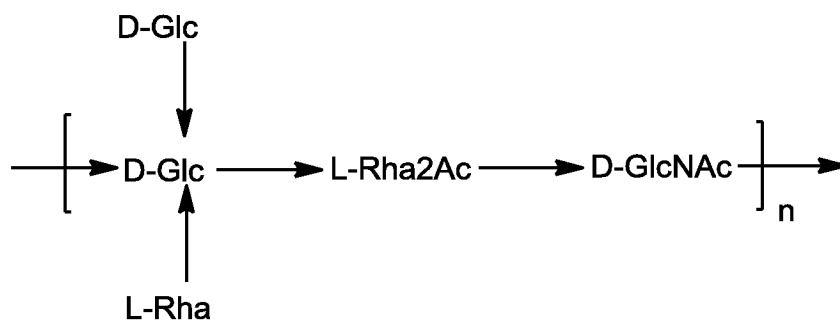
В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложен биоконъюгат, содержащий белок-носитель (например EPA), связанный с соединением формулы O25B', представленной ниже:



где n представляет собой целое число от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20. В конкретном воплощении белок-носитель N -связан с O -антигеном формулы $O25B'$.

В другом аспекте в данном описании изобретения предложен выделенный O -антиген из штамма ExPEC *E. coli*, где указанный штамм продуцирует $O25B$. В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложен выделенный O -антиген из штамма *E. coli* црес138. В конкретном воплощении в данном описании изобретения предложен выделенный O -антиген из штамма *E. coli* црес163. В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложен выделенный O -антиген из штамма *E. coli* црес177. См. Раздел 5.2.

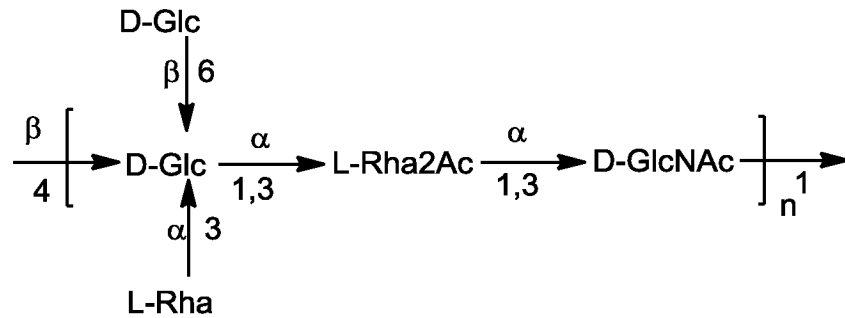
В другом аспекте в данном описании изобретения предложена совокупность выделенных макромолекул формулы $O25B$, представленной ниже:



где n представляет собой целое число от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20. В конкретном воплощении n по меньшей мере у 80% макромолекул в группе составляет от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20

до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20.

В другом аспекте в данном описании изобретения предложена совокупность выделенных макромолекул формулы O25B', представленной ниже:

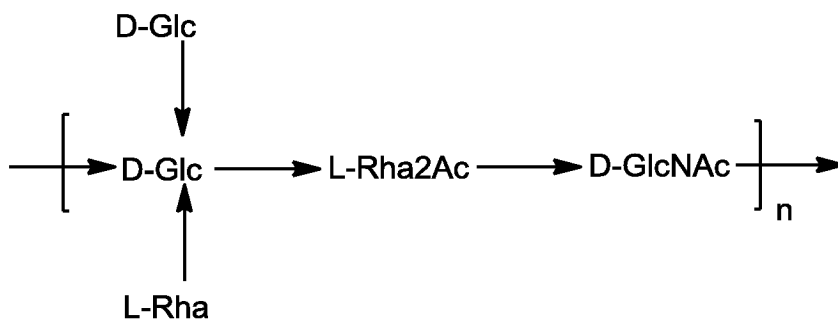


где n представляет собой целое число от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20. В конкретном воплощении n по меньшей мере у 80% макромолекул в группе составляет от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20.

В другом аспекте в данном описании изобретения предложены способы получения анти-O25B антител, с использованием O25B и/или биоконъюгата, содержащего O25B. Кроме того, в данном описании изобретения предложены антитела, продуцируемые согласно таким способам. См. Раздел 5.5.

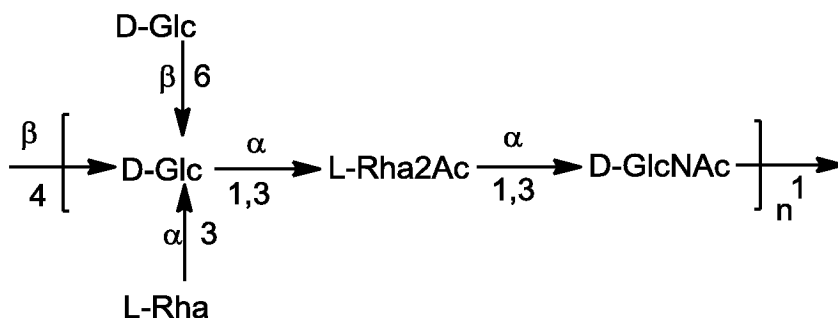
В другом аспекте в данном описании изобретения предложены композиции, например фармацевтические композиции, содержащие биоконъюгаты, предложенные в данном описании изобретения, и/или макромолекулы (или их совокупности), предложенные в данном описании изобретения. См. Раздел 5.6.

В конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена композиция, например фармацевтическая композиция, содержащая макромолекулу, содержащая структуру формулы O25B:



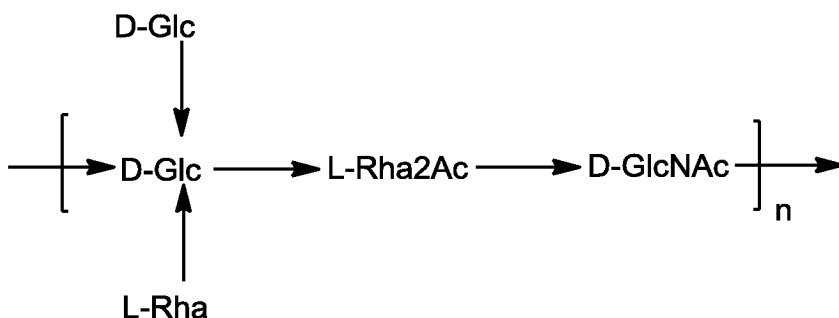
где n представляет собой целое число от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена композиция, например фармацевтическая композиция, содержащая макромолекулу, имеющую структуру формулы O25B':



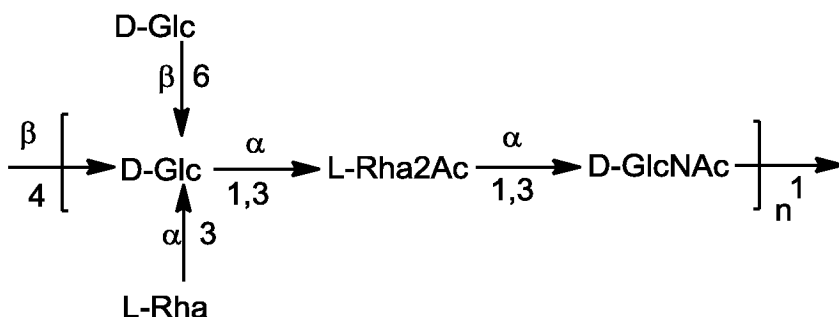
где n представляет собой целое число от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена композиция, например фармацевтическая композиция, содержащая биоконъюгат, описанный в данном описании изобретения, где указанный биоконъюгат содержит белок-носитель (например ЕРА), связанный с соединением формулы O25B, представленной ниже:



где n представляет собой целое число от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20. В конкретном воплощении белок-носитель N -связан с O -антигеном формулы $O25B'$.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена композиция, например фармацевтическая композиция, содержащая биоконъюгат, описанный в данном описании изобретения, где указанный биоконъюгат содержит белок-носитель (например EPA), связанный с соединением формулы $O25B'$, представленной ниже:



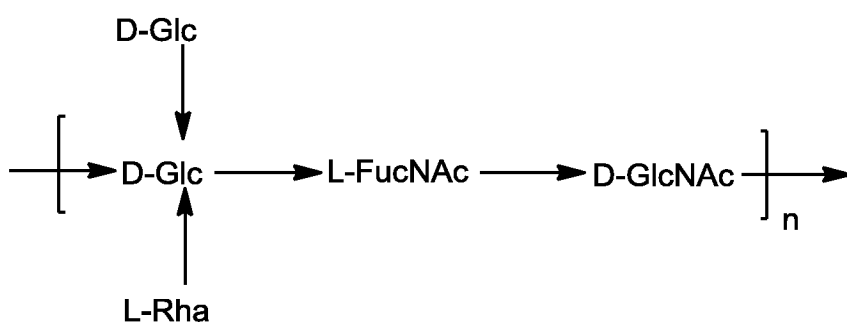
где n представляет собой целое число от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20. В конкретном воплощении белок-носитель N -связан с O -антигеном формулы $O25B'$.

В некоторых воплощениях фармацевтические композиции, предложенные в данном описании изобретения, содержат один или более дополнительных O -антигенов *E. coli*, где указанные антигены не являются $O25B$ (например формулы $O25B$ или формулы $O25B'$), например O -антигены *E. coli* (например ExPEC), отличные от антигенов серотипа $O25B$ *E. coli*, и/или один или более биоконъюгатов, содержащих белок-носитель, связанный с O -антигеном *E. coli*, где указанный антиген не является $O25B$ (например формулы $O25B$ или формулы $O25B'$). Такие композиции могут содержать одну или более дополнительных макромолекул, содержащих O -антиген ExPEC, и/или один или более дополнительных биоконъюгатов, например макромолекулу $O1$, $O2$ и/или $O6$, и/или биоконъюгат $O1A$, $O2$ и/или $O6$.

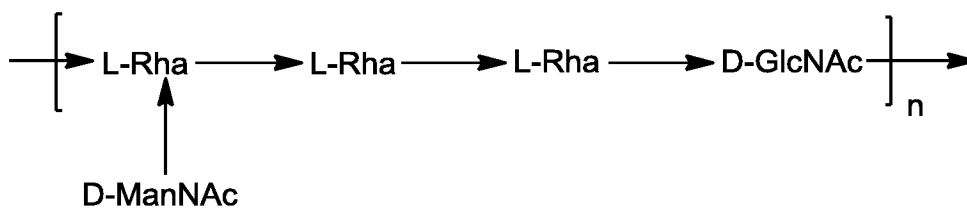
В конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена композиция, например фармацевтическая композиция, содержащая одну или

более дополнительных макромолекул, содержащих О-антиген ExPEC и/или один или более дополнительных биоконъюгатов, в дополнение к макромолекуле O25B (например макромолекуле, имеющей формулу O25B или формулу O25B') и/или биоконъюгату O25B (например биоконъюгату, содержащему белок-носитель, связанный с формулой O25B или формулой O25B'), где указанные дополнительные макромолекулы содержат структуру, выбранную из группы, состоящей из:

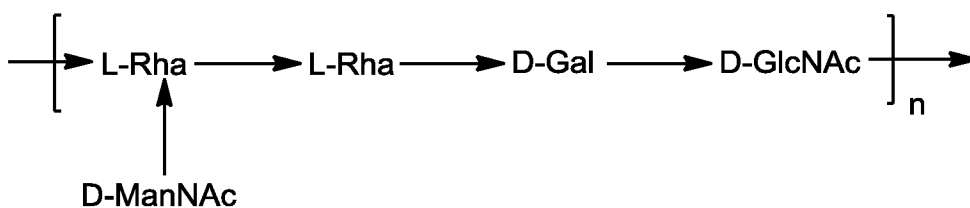
а. Формула O25A



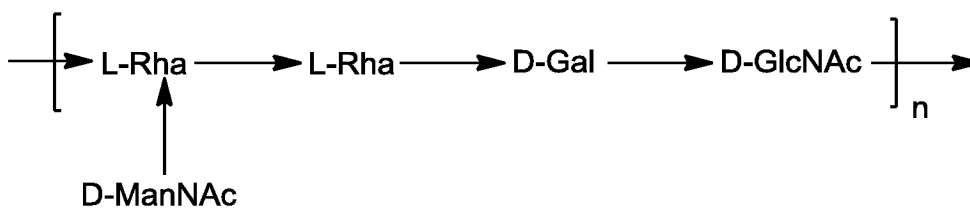
б. Формула O1A



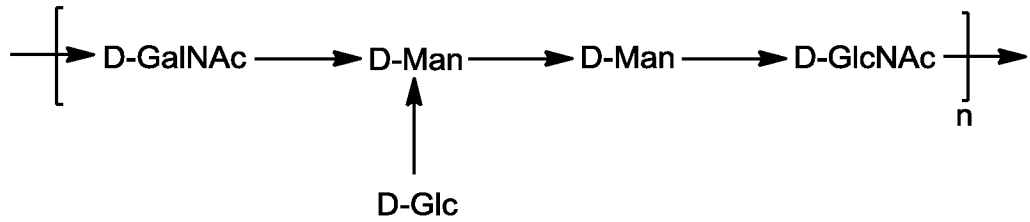
в. Формула O1B



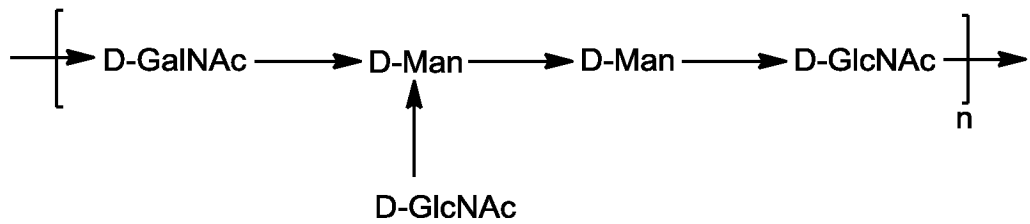
г. Формула O1C



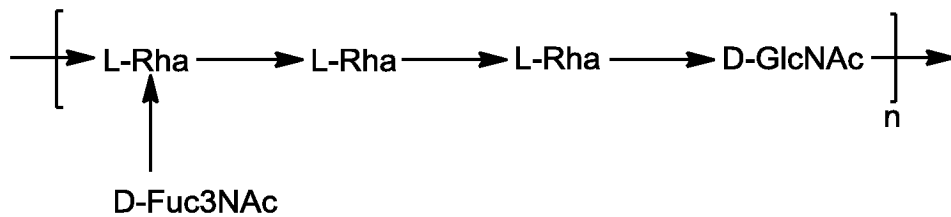
д. Формула O6Glc



е. Формула O6GlcNAc

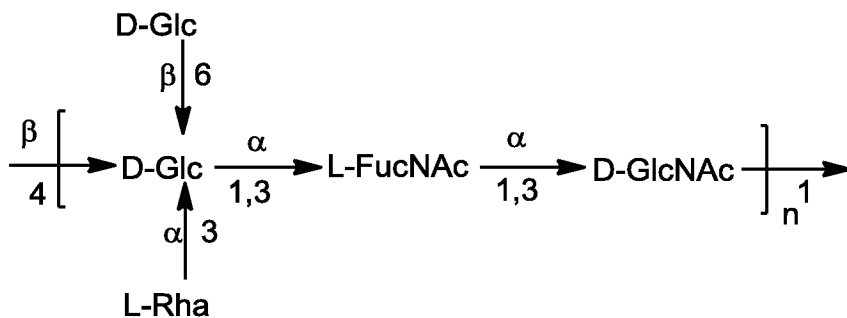


ж. Формула O2

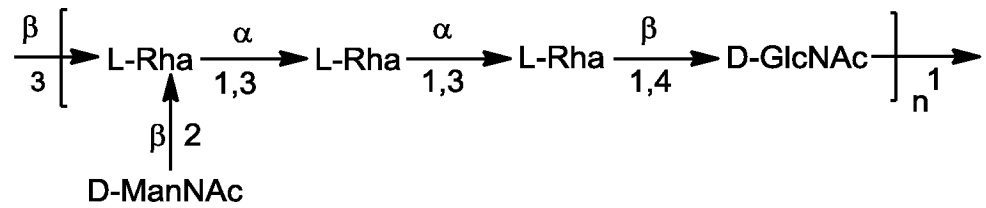


В конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена композиция, например фармацевтическая композиция, содержащая один, два, три, четыре, пять, шесть или семь макромолекул или биоконъюгатов, содержащих указанные макромолекулы в дополнение к макромолекуле O25B (например макромолекуле, содержащей формулу O25B или формулу O25B') и/или биоконъюгату O25B (например биоконъюгату, содержащему белок-носитель, связанный с формулой O25B или с формулой O25B'), где указанные дополнительные макромолекулы имеют структуру, выбранную из группы, состоящей из:

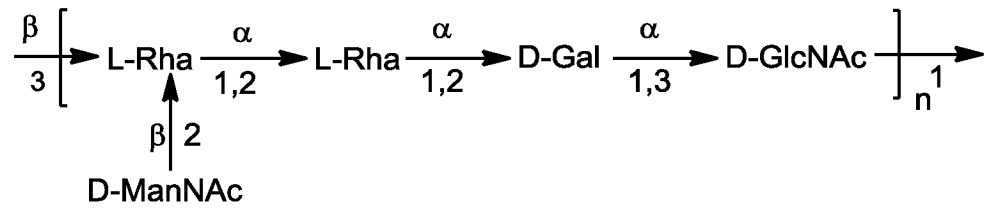
а. Формула O25A'



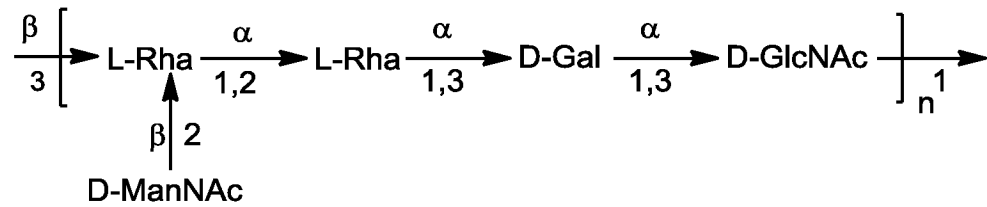
б. Формула O1A'



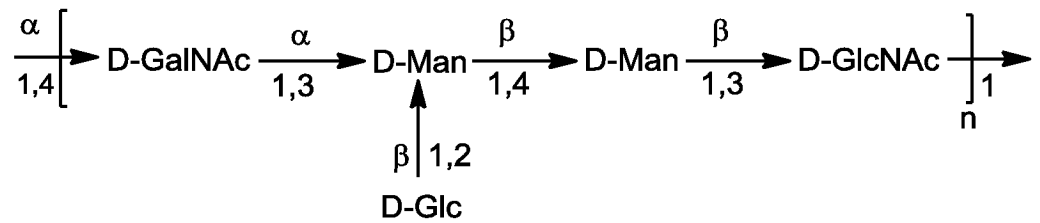
в. Формула O1B'



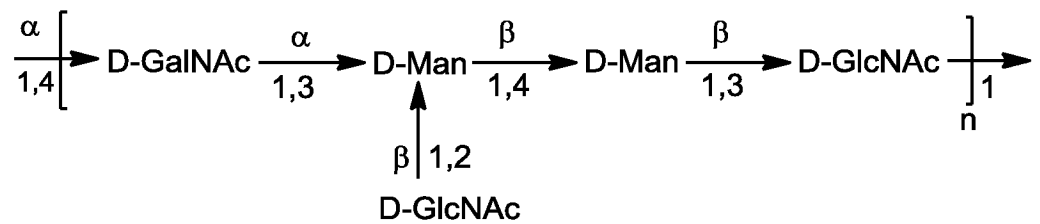
г. Формула O1C'



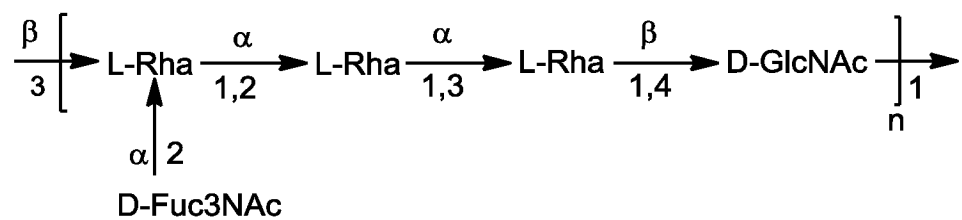
д. Формула O6Glc'



е. Формула O6GlcNAc'



ж. Формула O2'



В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена композиция, например фармацевтическая композиция, содержащая (1) макромолекулу O25 (например O25A или O25B) или биоконъюгат, содержащий O25 (например O25A или O25B), и (2) макромолекулу O1 или биоконъюгат, содержащий O1. В конкретном воплощении указанная макромолекула O25 представляет собой макромолекулу O25B. В другом конкретном воплощении указанная O1-макромолекула представляет собой O1A. В другом конкретном воплощении указанная O1-макромолекула представляет собой O1B. В другом конкретном воплощении указанная O1-макромолекула представляет собой O1C.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена композиция, например фармацевтическая композиция, содержащая (1) макромолекулу O25 (например O25A или O25B) или биоконъюгат, содержащий O25 (например O25A или O25B), и (2) макромолекулу O2 или биоконъюгат, содержащий O2. В конкретном воплощении указанная макромолекула O25 представляет собой макромолекулу O25B.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена композиция, например фармацевтическая композиция, содержащая (1) макромолекулу O25 (например O25A или O25B) или биоконъюгат, содержащий O25 (например O25A или O25B), и (2) макромолекулу O6 (например макромолекулу O6, содержащую разветвленный Glc-моносахарид (O6Glc) или разветвленный GlcNAc-моносахарид (O6GlcNAc)) или биоконъюгат, содержащий O6. В конкретном воплощении указанная макромолекула O25 представляет собой макромолекулу O25B. В другом конкретном воплощении указанная макромолекула O6 представляет собой макромолекулу O6, содержащую разветвленный Glc-моносахарид (O6Glc).

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена композиция, например фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере два из следующих: (1) макромолекулу O25 (например O25A или O25B) или биоконъюгат, содержащий O25 (например O25A или O25B); (2) макромолекулу O1 или биоконъюгат, содержащий O1; (3) O2 или биоконъюгат, содержащий O2; и/или (4) макромолекулу O6 (например

макромолекулу O6, содержащую разветвленный Glc-моносахарид или разветвленный GlcNAc-моносахарид) или биоконъюгат, содержащий O6. В конкретном воплощении указанная макромолекула O25 представляет собой макромолекулу O25B. В другом конкретном воплощении указанная макромолекула O1 представляет собой O1A. В другом конкретном воплощении указанная макромолекула O1 представляет собой O1B. В другом конкретном воплощении указанная макромолекула O1 представляет собой O1C. В другом конкретном воплощении указанная макромолекула O6 представляет собой макромолекулу O6, содержащую разветвленный Glc-моносахарид (также упоминаемый в данном описании изобретения как O6Glc).

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена композиция, например фармацевтическая композиция, содержащая макромолекулу O25B, макромолекулу O1A, макромолекулу O2 и макромолекулу O6, содержащую разветвленный Glc-моносахарид. В некоторых воплощениях указанные макромолекулы конъюгированы с белками-носителями.

В другом аспекте в данном описании изобретения предложены способы предупреждения заражения субъекта, например человека, ExPEC, включающие введение субъекту фармацевтически эффективного количества композиции (например иммунологической композиции), описанной в данном описании изобретения. См. Раздел 5.7.

В другом аспекте в данном описании изобретения предложены способы лечения инфекции у субъекта, например у человека, где субъект инфицирован ExPEC, включающие введение субъекту фармацевтически эффективного количества композиции (например иммунологической композиции), описанной в данном описании изобретения. См. Раздел 5.7.

В другом аспекте в данном описании изобретения предложены способы индукции иммунного ответа против ExPEC у субъекта, например у человека, включающие введение субъекту фармацевтически эффективного количества композиции (например иммунологической композиции), описанной в данном описании изобретения. См. Раздел 5.7.

В другом аспекте в данном описании изобретения предложены способы индукции продуцирования опсонофагоцитирующих антител против ExPEC у

субъекта, например у человека, включающие введение субъекту фармацевтически эффективного количества композиции (например иммунологической композиции), описанной в данном описании изобретения. См. Раздел 5.7.

Термины и сокращения:

OPS: O-полисахарид; O-антиген грамотрицательных бактерий. OPS также упоминается в данном описании изобретения как O-антиген.

кластер *rfb*: кластер генов (например кластер генов *E. coli*), который кодирует ферментативный механизм, способный синтезировать структуру остова O-антигена. Термин "кластер *rfb*" может применяться к любому биосинтетическому кластеру O-антигена, включая кластер бактерий, не принадлежащих к роду *Escherichia*.

waaL: ген лигазы O-антигена, кодирующий связанный с мембраной фермент с активным сайтом, локализованным в периплазме. Кодированный фермент переносит ундекапренилфосфат(UPP)-связанный O-антиген к ядру липида A, образуя липополисахарид.

wecA: первый ген, кодируемый в кластере *wec*. Кодированный белок катализирует перенос GlcNAc-фосфата от UDP-GlcNAc к UPP с образованием UPP-связанного GlcNAc.

ECA: общий энтеробактериальный антиген.

RU: повторяющаяся единица. При использовании в данном описании изобретения RU соответствует биологической повторяющейся единице, BRU. BRU описывает RU O-антигена, как она синтезируется *in vivo*.

UPP: ундекапренилпирофосфат.

LLO: липид-связанный олигосахарид.

2AB: 2-амино-бензамид.

MS: масс-спектрометрия.

O25B: термин O25B относится к антигену O25B из *E. coli*, определенному в настоящем документе (субсеротип серотипа O25 *E. coli*). Ссылка на O25B в данном описании изобретения включает формулу O25B и формулу O25B', как они определены выше.

O25A: термин O25A относится к антигену O25A *E. coli* (субсеротип серотипа O25 *E. coli*). Ссылка на O25A в данном описании изобретения включает формулу O25A и формулу O25A', как они определены выше.

O1A: термин O1A относится к антигену O1A *E. coli* (субсеротип серотипа O1 *E. coli*). Ссылка на O1A в данном описании изобретения включает формулу O1A и формулу O1A', как они определены выше.

O1B: термин O1B относится к антигену O1B *E. coli* (субсеротип серотипа O1 *E. coli*). Ссылка на O1B в данном описании изобретения включает формулу O1B и формулу O1B', как они определены выше.

O1C: термин O1C относится к антигену O1C *E. coli* (субсеротип серотипа O1 *E. coli*). Ссылка на O1C в данном описании изобретения включает формулу O1C и формулу O1C', как они определены выше.

O2: термин O2 относится к антигену O2 *E. coli* (серотипа O2 *E. coli*). Ссылка на O2 в данном описании изобретения включает формулу O2 и формулу O2', как они определены выше.

O6: термин O6 относится к антигену O6 *E. coli* (серотипа O6 *E. coli*). Ссылка на O6 в данном описании изобретения включает формулу O6 и формулу O6', как они определены выше.

Биоконъюгат: термин биоконъюгат относится к конъюгату белка (например белка-носителя) и антигена, например O-антигена (например O25B), полученному в клетке-хозяине, где механизм клетки-хозяина связывает антиген с белком (например образует N-связь). Гликоконъюгаты включают биоконъюгаты, а также конъюгаты сахарный антиген (например олиго- и полисахариды)-белок, полученные другим образом, например посредством химического связывания белка и сахарного антигена.

Термин "примерно", при использовании в сочетании с числом, относится к любому числу в пределах ± 1 , ± 5 или $\pm 10\%$ от указанного числа.

При использовании в данном описании изобретения термин "эффективное количество" в контексте введения терапевтического средства (например композиции, описанной в данном документе) субъекту, относится к количеству терапевтического средства, которое обеспечивает профилактический и/или терапевтический эффект(ы). В некоторых воплощениях "эффективное количество" относится к количеству

терапевтического средства, которое достаточно для достижения одного, двух, трех, четырех или более следующих эффектов: (1) уменьшение или ослабление тяжести инфекции ЕхРЕС или симптома, связанного с ней; (2) уменьшение продолжительности инфекции ЕхРЕС или симптома, связанного с ней; (3) предупреждение развития инфекции ЕхРЕС или симптома, связанного с ней; (4) индукция регрессии инфекции ЕхРЕС или симптома, связанного с ней; (5) предупреждение развития или начала инфекции ЕхРЕС или симптома, связанного с ней; (6) предупреждение повторного возникновения инфекции ЕхРЕС или симптома, связанного с ним; (7) снижение функциональной недостаточности органов, связанной с инфекцией ЕхРЕС; (8) уменьшения уровня госпитализации субъекта с инфекцией ЕхРЕС; (9) уменьшение продолжительности госпитализации субъекта с инфекцией ЕхРЕС; (10) увеличение выживаемости субъекта с инфекцией ЕхРЕС; (11) ликвидация инфекции ЕхРЕС у субъекта; (12) подавление или снижение репликации ЕхРЕС у субъекта; и/или (13) усиление или улучшение профилактического(их) или терапевтического(их) эффекта(ов) другой терапии.

При использовании в данном описании изобретения термин “в комбинации” в контексте введения двух или более терапевтических средств субъекту, относится к применению более чем одного терапевтического средства. Применение термина “в комбинации” не ограничивает порядок, в котором терапевтические средства вводят субъекту. Например, первое терапевтическое средство (например композицию, описанную в данном документе) можно вводит до (например за 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель), одновременно с, или после (например через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) введения второго терапевтического средства субъекту.

При использовании в данном описании изобретения термин “субъект” относится к животному (например к птицам, рептилиям и млекопитающим). В другом воплощении субъект представляет собой млекопитающее, в том числе

не являющееся приматом (например верблюда, осла, зебру, корову, свинью, лошадь, козу, овцу, кошку, собаку, крысу и мышь) и являющееся приматом (например обезьяну, шимпанзе и человека). В некоторых воплощениях субъект представляет собой животное, не являющееся человеком. В некоторых воплощениях субъект представляет собой сельскохозяйственное животное или домашнее животное (например собаку, кошку, лошадь, козу, овцу, свинью, осла или курицу). В другом воплощении субъект представляет собой человека. В другом воплощении субъект представляет собой человеческого младенца. В другом воплощении субъект представляет собой человеческого ребенка. В другом воплощении субъект представляет собой взрослого человека. В другом воплощении субъект представляет собой пожилого человека. В другом воплощении субъект представляет собой недоношенного человеческого младенца. Термины “субъект” и “пациент” могут быть использованы в данном описании изобретения взаимозаменяемо.

При использовании в данном описании изобретения термин “недоношенный человеческий младенец” относится к человеческому младенцу, рожденному ранее 37 недель внутриутробного возраста.

При использовании в данном описании изобретения термин “человеческий младенец” относится к новорожденному младенцу до 1 года.

При использовании в данном описании изобретения термин “человеческий ребенок преддошкольного возраста” относится к человеку в возрасте от 1 до 3 лет.

При использовании в данном описании изобретения термин “человеческий ребенок” относится к человеку в возрасте от 1 года до 18 лет.

При использовании в данном описании изобретения термин “взрослый человек” относится к человеку в возрасте 18 лет или старше.

При использовании в данном описании изобретения термин “пожилой человек” относится к человеку в возрасте 65 лет или старше.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1: Путь биосинтеза O25A. Стрелки указывают отдельные ферментативные превращения, указаны названия ферментов. Нуклеотид-активированные сахара получают в цитоплазме либо посредством ферментов, представленных в кластере O-антигена, либо посредством ферментов

"домашнего хозяйства" (housekeeping) граммотрицательной клетки-хозяина. Гликозилфосфат-трансфераза (WecA) добавляет D-GlcNAc-фосфат к ундекапренил-фосфату (UP), образуя GlcNAc-UPP. Затем конкретные гликозилтрансферазы удлиняют молекулу UPP-GlcNAc путем добавления моносахаридов, образуя биологическую повторяющуюся единицу (BRU) олигосахарида (WekABC WbuB). Указанный порядок ферментов не относится к последовательности событий во время синтеза BRU (обозначен как < >). Затем BRU перемещается в периплазматическое пространство с помощью Wzx. Wzy линейно полимеризует периплазматические BRU с образованием O-антигенного полисахарида. Длина полимера контролируется с помощью Wzz. Многие бактериальные олиго-и полисахариды собираются на UPP и затем перемещаются к другим молекулам, то есть UPP является общей платформой построения олиго- и полисахарида в бактериях. В *E. coli* и в большинстве других граммотрицательных бактерий O-антиген переносится от UPP к ядру липида А посредством фермента WaaL из *E. coli* с образованием липополисахарида (LPS).

Фиг. 2: кластер *rfb*, его структура и путь *wzx/wzy*-зависимого синтеза O-антигена на примере кластере *rfb* O25A *E. coli* и O-антигена. **А.** Показана структура кластера *rfb* штамма E47a *E. coli*, локализованного между генами *galF* and *gnd*. Гены показаны как стрелки и закрашивание указано в соответствии с функцией генных продуктов: черными являются гены биосинтеза нуклеотид-активированного моносахарида, которые не являются частью репертуара "домашнего хозяйства" *E. coli* (которые закодированы в другом месте генома), черно-белые диагональные полосы представляют гликозилтрансферазы, ответственные за добавление отдельных моносахаридных единиц к BRU, флиппазу *wzx* и полимеразу *wzy*. **В.** Химическая структура BRU O-антигена O25A, как предложено (см. Fundin et al., 2003, Magnetic Resonance in Chemistry 41, 4).

Фиг. 3. А. Структуры BRU O25A, O25B и O16. **В.** Сравнение кластера биосинтеза O-антигена (кластер *rfb*) у O25A, O25B и O16. Закрашенные черным гены представляют собой гены, вовлеченные в биосинтез нуклеотид-активированного моносахарида, диагональные полосы представляют собой прогнозируемые гены гликозилтрансфераз, гены, закрашенные серым,

указывают на гены процессинга и перемещения BRU, а вертикальные полосы показывают гомологию O-ацетилтрансфераз. Серые прямоугольники указывает величины гомологии между генами выше 25%; указаны точные значения. Тонкие черные и серые стрелки показывают места отжига олигонуклеотидов ПЦР-типирования для *wzy* (O25A- и O25B-специфические) и 3'-области O25B (O25B-специфический).

Фиг. 4. Распределение серотипов в эпидемиологическом исследовании. O-антигенные серотипы *E. coli*, идентифицированные в образцах внебольничных UTI (инфекции мочеполовых путей) были сгруппированы в соответствии с распространенностью.

Фиг. 5. Окрашивание серебром и анализ посредством вестерн-блоттинга LPS из клинических изолятов с O25-положительным фенотипом агглютинации. Номера штаммов указаны выше гелевых полос. Выращивали отдельные клоны и нормализованную по OD (оптическая плотность) биомассу собирали с помощью центрифугирования. Осадки растворяли в Lämmli буфере для SDS PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) и обрабатывали протеиназой K, чтобы гидролизовать все белки в образце. Стандартное окрашивание серебром применяли к гелю PAGE, как показано на Фиг. 5А, и анализ нитроцеллюлозных мембран, содержащих вещество, перенесенное электрическим током с гелей с одинаковым пробегом, с помощью коммерческой антисыворотки для O25-агглютинации, показан на Фиг. 5В.

Фиг. 6. 2AB HPLC пики образцов O25A и O25B. Были приготовлены 2AB-меченные LLO-образцы из штаммов *crs138* (пунктирная линия) и *crs436* (сплошная линия). Собирали пики и соответствующие структуры BRU, выведенные из картины MS/MS-фрагментации (тандемная масс-спектрометрия), представленной на Фиг. 7, показаны стрелками.

Фиг. 7. Серии ионов MS/MS-фрагментации, полученные из пиков, указанных на Фиг. 6 со временем элюирования 50' и 62' материнских ионов с m/z (масса/заряд)=1022 (А; из штамма *crs138*) или m/z =1021 (В; из *crs_436*). Серии ионов показаны по отношению к изображению предполагаемого BRU.

Фиг. 8. Деацетилирование 2AB-меченного LLO-образца, полученного из O25B положительного клинического изолята. O25B-специфический пик при времени элюирования 50', полученный от 2AB-меченных LLO клинического

изолята с генотипом O25B, собирали и анализировали посредством нормально-фазовой HPLC после обработки (сплошная линия) или без обработки (пунктирная линия) NaOH для гидролиза O-ацетильных групп ND Cal's Special Patent Program.

Фиг. 9. Анализ моносахаридного состава биоконъюгатов O25A и O25B. Биоконъюгаты O25 получали, очищали и обрабатывали для анализа моносахаридного состава. Показаны пики образцов на C18 HPLC. Полученные из O25A (сплошная) и O25B (пунктирная) образцы сравнивали со смесью моносахаридов из торговых источников (Glc, GlcNAc, Rha, FucNAc). Время элюирования моносахаридов показано стрелками.

Фиг. 10. Характеристика биоконъюгатов O25A. Очищенную конечную массу биоконъюгатов 4S-EPA-O25A анализировали с помощью SDS PAGE и визуализировали посредством непосредственного окрашивания Кумасси (С) и Вестерн-блоттинга с использованием анти-EPA антисыворотки или анти-O25 антисыворотки.

Фиг. 11. Характеристика биоконъюгатов O25B. Очищенную конечную массу биоконъюгатов 4S-EPA-O25B анализировали посредством SDS PAGE и визуализировали посредством непосредственного окрашивания Кумасси (С) и Вестерн-блоттинга с использованием анти-EPA антисыворотки или анти-O25 антисыворотки.

Фиг. 12. Генетический биосинтез и химическая структура O-антигена O1. **А.** Показан кластер *rfb* и фланкирующие гены O1A штамма G1632 *E. coli* (учетный номер GU299791). Черные, серые и полосатые обозначения являются такими же, как для фиг. 2, описанной выше. **В.** Показаны химические структуры BRU субсеротипов O1.

Фиг. 13. Анализ LPS из клинических изолятов с фенотипом O1-положительной агглютинации. **А.** Окрашивание серебром и **В.** Вестерн-блоттинг с использованием анти-O1 антисыворотки.

Фиг. 14. Определение O1A в клинических изолятах O1. 2AB-меченные LLO-образцы из клинических изолятов O1 анализировали посредством метода идентификационных отпечатков LLO. **А.** Показаны пики нормально-фазовой HPLC от 60' и далее. Базовый уровень для каждого образца был смещен, чтобы визуализировать совместно мигрирующие пики. Номер урес указывает

клинический штамм. **В.** Серии ионов MS/MS-фрагментации $m/z=1849,6$ (Na^+ аддукт). Изображение определяет картину фрагментации ионов и возможные разрывы гликозидной связи в олигосахариде из 2 BRU из O1A.

Фиг. 15. Биоконъюгаты O1. Мелкомасштабный анализ экспрессии гликопротеина EPA-O1 клетками *E. coli* (W3110 $\Delta rfbO16::rfbO1 \Delta waaL$), трансформированными экспрессионной плазмидой EPA (pGVXN659) и пятью разными экспрессионными плазмидами pglB: **A**, p114: экспрессия кодон-неоптимизированной, содержащей HA-метку pglB; **B**, p939: кодон-оптимизированная, содержащая HA-метку pglB; **C**, p970: кодон-оптимизированная, с удаленной HA-меткой pglB; **D**, кодон-оптимизированная, содержащая HA-метку, с удаленным сайтом природного гликозилирования N534Q pglB; и **E**, кодон-оптимизированная, с удаленной HA-меткой, с удаленным сайтом природного гликозилирования N534Q pglB. Клетки выращивали и индуцировали арабинозой и IPTG (изопропилтиогалактозид), после ночной инкубации при 37°C клетки собирали и получали экстракты периплазматических белков. Затем экстракты разделяли с помощью SDS PAGE, переносили на нитроцеллюлозные мембраны посредством электроблоттинга и иммунологически выявляли, используя анти-EPA сыворотку.

Фиг. 16. Биоконъюгаты, описанные на Фиг. 15, обнаруженные с помощью анти-O1 сыворотки.

Фиг. 17. Генетическая и химическая структура O6. **A.** Биосинтез O-антигенного кластера (кластер *rfb*) и фланкирующих генов *E. coli* CFT073 (Genbank AE014075.1). Показаны предположительные функции генов согласно BLAST и указаны гены, специфичные для биосинтеза O-антигена O6. **B.** Химические структуры описанных структур O6 BRU (Jann et al., Carbohydr. Res. 263 (1994) 217-225).

Фиг. 18. Идентификация O6 с разветвленным Glc. 2AB-меченные образцы LLO из клинических изолятов O6 анализировали посредством метода идентификационных отпечатков LLO. **A.** Показаны пики нормально-фазовой HPLC от 60' и далее. Экстракты получали из эталонных штаммов CCUG11309 (тонкая сплошная линия) и 11311 (прерывистая), содержащих ветви Glc и GlcNAc. Наложение показывает четкие различия во времени элюирования

указанных BRU. **В.** Экстракты из клинических изолятов, указанных номером црес, сравнивают с эталонными штаммами из А.

Фиг. 19. Генетический биосинтез и химические структуры О-антигена О2. **А.** Биосинтез кластера (*rfb* кластер) О-антигена и фланкирующих генов штамма *E. coli* G1674 (учетный номер GU299792). Черные, серые и полосатые обозначения являются такими же, как описано в предыдущих фигурах (например Фиг. 2). **В.** Химическая структура BRU антигена О2.

Фиг. 20. Анализ LPS из клинических изолятов с фенотипом О2-положительной агглютинации. **А.** Окрашивание серебром. **В.** Вестерн-блоттинг с использованием анти-О2 антисыворотки.

Фиг. 21. OPS анализ из штамма W3110 Δ waal Δ rfbW3110::rfbO2 Δ wekS. Показана хроматограмма анализа 2AB-меченного LLO посредством нормально-фазовой HPLC.

Фиг. 22. Распознавание LPS O25A и O25B посредством анти-O25A and анти-O25B MBP(мальтозосвязывающий белок)-антисыворотки в анализе Вестерн-блоттинга. Две нитроцеллюлозные мембраны, которые были получены после электропереноса образцов LPS, полученных из црес436 (O25A) и црес138 (O25B) и разделенных посредством SDS-PAGE. Картина загрузки была одинаковой для обеих мембран, левая дорожка: LPS O25A из црес438, средняя дорожка: LPS O25B из црес 138. MBP биоконъюгаты использовали для иммунизации кроликов. **Левая панель:** анти O25B-MBP антисыворотка; **правая панель:** анти O25A-MBP антисыворотка.

Фиг. 23. MS/MS-спектр BRU OPS O2. MS/MS-спектр Na⁺ аддукта с $m/z=989,4$ из пика элюирования при 43,5 мин из 2AB-меченных LLO-экстрактов штамма CCUG25. Показано изображение BRU O2 и ассоциированные Y-ионные серии, подтверждающие ожидаемую последовательность моносахаридов.

Фиг. 24. Биоконъюгаты EPA, содержащие антигены O1A, O2 и O6, используемые в доклиническом исследовании. OPS-гликаны были произведены, очищены и проанализированы посредством SDS PAGE и визуализированы с помощью окрашивания Кумасси.

На Фиг. 25 показаны средние титры ELISA, полученные с сывороткой из крыс, иммунизированных O1A-EPA (G1), одним белком-носителем(G10), TBS (G11) или тетравалентной композиции, содержащей EPA-O1A, O2, O6Glc и

O25B (G12), испытанных против планшета ELISA, покрытого O1A-LPS, очищенного из штамма црес032.

На Фиг. 26 показаны средние титры ELISA, полученные с сывороткой из крыс, иммунизированных O2-EPA (G4), одним белком-носителем (G10), TBS (G11) или тетравалентной композицией, содержащей EPA-O1A, O2, O6Glc и O25B (G12), испытанных против планшета ELISA, покрытого O2-LPS, очищенного из штаммов CCUG25.

На Фиг. 27 показаны средние титры ELISA, полученные с сывороткой из крыс, иммунизированных O6Glc-EPA (G7), одним белком-носителем (G10), TBS (G11) или тетравалентной композицией, содержащей EPA-O1A, O2, O6Glc и O25B (G12), испытанных против планшета ELISA, покрытого O6Glc-LPS, очищенного из штамма CCUG11309.

На Фиг. 28 показаны средние титры ELISA, полученные с сывороткой из крыс, иммунизированных O25B-EPA (G9), одним белком-носителем (G10), TBS (G11) или тетравалентной композицией, содержащей O1A, O2, O6Glc и O25B (G12), испытанных против планшета ELISA, покрытого O25B-LPS, очищенного из штамма црес177.

Фиг. 29: Показатели опсонизации сывороток, полученных от крыс до иммунизации (незакрашенные кружки) по сравнению с 42 сутками после иммунизации (закрашенные квадраты) с одной примирующей дозой и двумя бустерными дозами указанных доз моновалентной вакцины. (A) иммунизация O2-EPA; (B) иммунизация O6-EPA; (C) иммунизация O25B-EPA.

Фиг. 30: Титры ELISA, полученные с сывороткой от людей, вакцинированных тетравалентной вакциной, содержащей антигены *E. coli* O1A, O2, O6Glc и O25B. Значительное увеличение титров ELISA после (через 30 суток после инъекции) по сравнению с титрами до инъекции (сутки 1) наблюдалось только в вакцинированных группах (*, представляет статистическую значимость).

Фиг. 31: Опсонический индекс (OI), полученный с сывороткой у людей, вакцинированных тетравалентной вакциной, содержащей антигены *E. coli* O1A, O2, O6Glc и O25B. Иммунный ответ показан как OI против плацебо и компонентов тетравалентной вакцины (O1A-EPA (31A), O2-EPA (31B), O6Glc-EPA (31C) и O25B-EPA (31D)) до и после инъекции. Момент времени до

инъекции, определенный как сутки 1, представлен как V2 (визит 2), и момент времени после инъекции, определенный как сутки 30, представлен как V4 (визит 4). Значительное увеличение ОI в промежутке времени между моментом времени после инъекцией и моментом времени до инъекции (обозначенное как *, где несколько * представляет повышенную степень значимости) наблюдали только в вакцинированных группах. NS-нет значимой разницы.

Фиг. 32: Титры ELISA (выраженные как значения EC50) сыворотки из вакцинированных субъектов к LPS O25A (черные полосы) и LPS O25B (серые полосы) в сутки 1 (до вакцинации) и через 30 суток (после вакцинации). Статистически значимое увеличение титров ELISA между моментом времени после инъекции (через 30 суток после инъекции) и моментом времени до инъекции (сутки 1) наблюдалось для обоих серотипов: LPS O25A (черные полосы) и LPS O25B (серые полосы).

Фиг. 33: Реакционная способность сыворотки от вакцинированных субъектов в отношении O25A- (черные линии) и O25B- (серые линии) экспрессирующих штаммов *E. coli*. Пунктирная серая линия: штамм серотипа O75, отрицательный контроль. На Фиг. 33 показано, что индуцируемые вакциной сывороточные IgG-антитела из вакцинированных субъектов имеют сильную реакцию на штаммы O25A и O25B.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем документе раскрыта структура антигена O25B *E. coli*, а также применения O25B, способы получения O25B, и биоконъюгаты, содержащие O25B. Заявители идентифицировали кластер генов *E. coli*, ответственный за продуцирование O25B и полностью охарактеризовали структуру антигена O25B. Соответственно, в данном описании изобретения предложены нуклеиновые кислоты, способные продуцировать O25B в клетках-хозяевах. Также в данном описании изобретения предложены клетки-хозяева, например рекомбинантно сконструированные клетки-хозяева, содержащие нуклеиновые кислоты, способные продуцировать O25B. Такие клетки-хозяева можно использовать для получения биоконъюгатов, содержащих O25B, связанный с белком-носителем, которые можно использовать, например, в изготовлении лекарственных препаратов (например вакцин). Антиген O25B, описанный в данном документе также может быть использован в получении

антител, которые можно использовать, например, в терапевтических способах, таких как пассивная иммунизация субъектов. Кроме того, в данном описании изобретения предложены композиции, содержащие O25B, отдельно или в комбинации с другими антигенами *E. coli* (например O1, O2 и O6, а также их субсеротипами) для применения в терапевтических способах, например в вакцинации хозяев против инфекции *E. coli* (например уропатогенными *E. coli*).

5.1 Нуклеиновые кислоты и белки

В одном аспекте в данном описании изобретения предложены выделенные нуклеиновые кислоты, связанные с продуцированием O25B, например нуклеиновые кислоты, кодирующие один или более белков кластера *rfb* O25B *E. coli*. Специалистам в данной области техники понятно, что из-за вырожденности генетического кода, белок, имеющий определенную последовательность аминокислот, может быть закодирован с помощью нескольких разных нуклеиновых кислот. Таким образом, специалистам в данной области техники понятно, что нуклеиновая кислота, предложенная в данном описании изобретения, может быть изменена таким образом, что ее последовательность отличается от последовательности, предложенной в данном описании изобретения, без влияния на аминокислотную последовательность белка, кодируемого этой нуклеиновой кислотой.

В конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая кластер *rfb* O25B *E. coli*. В конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая кластер генов *rfb*(*urac138*) *E. coli* (SEQ ID NO: 12). В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая кластер генов, который примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен или гомологичен SEQ ID NO: 12. *Urac138* является примером штамма *E. coli* серотипа O25B. Специалисту понятно, что другие штаммы этого серотипа теперь могут быть легко получены из клинических изолятов в соответствии со способами, описанными в данном документе, и примерами таких других штаммов являются *urac177* и *urac163*. Таким образом, везде, где в данном документе упоминаются кластер генов *rfb* или отдельные гены из такого кластера таких O25B-штаммов, подразумевается включение соответствующих генных

кластеров или генов из других O25B-штаммов. Также предложенные последовательности могут быть найдены посредством секвенирования кластеров генов *rfb* или, при необходимости, отдельных генов из таких других изолятов и будут представлять гомологичные последовательности, кодирующие гомологичные белки, такие как кластер генов или ген. В любых воплощениях, где упоминается гомологичный кластер генов или ген со ссылкой на кластер генов или ген с определенным процентом, такая гомологичная последовательность предпочтительно кодирует белок(и) с той же функцией, что и относящиеся к эталонному штамму или последовательности.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая кластер *rfb* O25B *E. coli*. В конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая кластер генов *rfb*(*урес163*) *E. coli*. В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая кластер генов, который примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен или гомологичен кластеру генов *rfb* (*урес163*) *E. coli*.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая кластер *rfb* O25B *E. coli*. В конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая кластер генов *rfb*(*урес177*) *E. coli*. В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая кластер генов, который примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен или гомологичен кластеру генов *rfb*(*урес177*) *E. coli*.

В другом воплощении в данном описании изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая белки кластера *rfb* O25B *E. coli*.

В конкретном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая белок кластера *rfb* O25B *E. coli*, предложенного в данном описании изобретения, содержит или состоит из SEQ ID NO: 1, гена *rmlB* кластера *rfb* O25B *E. coli*. В другом конкретном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая белок кластера *rfb* O25B *E. coli*, предложенного в данном описании изобретения, на

75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична или гомологична SEQ ID NO: 1.

В конкретном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая белок кластера *rfb* O25B *E. coli*, предложенного в данном описании изобретения, содержит или состоит из SEQ ID NO: 2, гена *rmlD* кластера *rfb* O25B *E. coli*. В другом конкретном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая белок кластера *rfb* O25B *E. coli*, предложенного в данном описании изобретения, на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична или гомологична SEQ ID NO: 2.

В конкретном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая белок кластера *rfb* O25B *E. coli*, предложенного в данном описании изобретения содержит или состоит из SEQ ID NO: 3, гена *rmlA* кластера *rfb* O25B *E. coli*. В другом конкретном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая белок кластера *rfb* O25B *E. coli*, предложенного в данном описании изобретения, на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична или гомологична SEQ ID NO: 3.

В конкретном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая белок кластера *rfb* O25B *E. coli*, предложенного в данном описании изобретения содержит или состоит из SEQ ID NO: 4, гена *rmlC* кластера *rfb* O25B *E. coli*. В другом конкретном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая белок кластера *rfb* O25B *E. coli*, предложенного в данном описании изобретения, на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% идентична или гомологична SEQ ID NO: 4.

В конкретном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая белок кластера *rfb* O25B *E. coli*, предложенного в данном описании изобретения, содержит или состоит из SEQ ID NO: 5, гена *wzx* кластера *rfb* O25B *E. coli*. В другом конкретном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая белок кластера *rfb* O25B *E. coli*, предложенного в данном описании изобретения, на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична или гомологична SEQ ID NO: 5.

В конкретном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая белок кластера *rfb* O25B *E. coli*, предложенного в данном описании изобретения содержит или состоит из SEQ ID NO: 6, ген *wekA* кластера *rfb* O25B *E. coli*. В

другом конкретном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая белок кластера *rfb* O25B *E. coli*, предложенного в данном описании изобретения, на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична или гомологична SEQ ID NO: 6.

В конкретном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая белок кластера *rfb* O25B *E. coli*, предложенного в данном описании изобретения содержит или состоит из SEQ ID NO: 7, гена *wekB* кластера *rfb* O25B *E. coli*. В другом конкретном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая белок кластера *rfb* O25B *E. coli*, предложенного в данном описании изобретения на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична или гомологична SEQ ID NO: 7.

В конкретном воплощении, нуклеиновая кислота, кодирующая белок кластера *rfb* O25B *E. coli*, предложенного в данном описании изобретения, содержит или состоит из SEQ ID NO: 8, гена *wzy* кластера *rfb* O25B *E. coli*. В другом конкретном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая белок кластера *rfb* O25B *E. coli*, предложенного в данном описании изобретения на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична или гомологична SEQ ID NO: 8.

В конкретном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая белок кластера *rfb* O25B *E. coli*, предложенного в данном описании изобретения, содержит или состоит из SEQ ID NO: 9, гена *wbbJ* кластера *rfb* O25B *E. coli*. В другом конкретном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая белок кластера *rfb* O25B *E. coli*, предложенного в данном описании изобретения, на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична или гомологична SEQ ID NO: 9.

В конкретном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая белок кластера *rfb* O25B *E. coli*, предложенного в данном описании изобретения содержит или состоит из SEQ ID NO: 10, гена *wbbK* кластера *rfb* O25B *E. coli*. В другом конкретном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая белок кластера *rfb* O25B *E. coli*, предложенного в данном описании изобретения, на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична или гомологична SEQ ID NO: 10.

В конкретном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая белок кластера *rfb* O25B *E. coli*, предложенного в данном описании изобретения, содержит или состоит из SEQ ID NO: 11, гена *wbbL* кластера *rfb* O25B *E. coli*. В другом конкретном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая белок кластера *rfb* O25B *E. coli*, предложенного в данном описании изобретения, на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична или гомологична SEQ ID NO: 11.

В другом аспекте в данном описании изобретения предложены белки, кодируемые нуклеиновыми кислотами, предложенными в данном описании изобретения. В конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена dTDP-глюкозо-4,6-дегидратаза, кодируемая SEQ ID NO: 1. В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена dTDP-6-дезоксид-глюкозо-3,5-эпимераза, кодируемая SEQ ID NO: 2. В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена глюкозо-1-фосфат-тимидилитрансфераза, кодируемая SEQ ID NO: 3. В другом конкретном воплощении предложена dTDP-4-дегидрорамнозо-3,5-эпимераза, кодируемая SEQ ID NO: 4. В другом конкретном воплощении предложена O-антиген-флиппаза, кодируемая SEQ ID NO: 5. В другом конкретном воплощении предложена dTDP-Rha:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP α -1,3-рамнозилтрансфераза, кодируемая SEQ ID NO: 6. В другом конкретном воплощении предложена UDP-Glc:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP β -1,6-гликозилтрансфераза, кодируемая SEQ ID NO: 7. В другом конкретном воплощении предложена O-антиген-полимераза, кодируемая SEQ ID NO: 8. В другом конкретном воплощении предложена O-ацетилтрансфераза, кодируемая SEQ ID NO: 9. В другом конкретном воплощении предложена UDP-Glc:Rha-GlcNAc-UPP α -1,3-гликозилтрансфераза, кодируемая SEQ ID NO: 10. В другом конкретном воплощении предложена dTDP-Rha:GlcNAc-UPP α -1,3-рамнозилтрансфераза, кодируемая SEQ ID NO: 11.

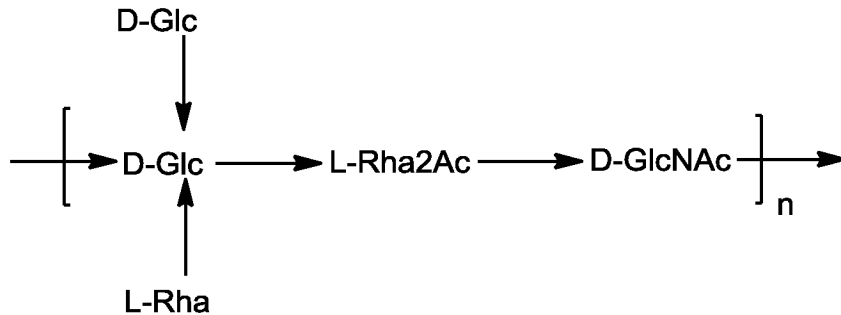
5.2 O-Антигены *E. coli*

В одном аспекте в данном описании изобретения предложены выделенные антигены *E. coli* серотипов O25, O1, O2 и O6.

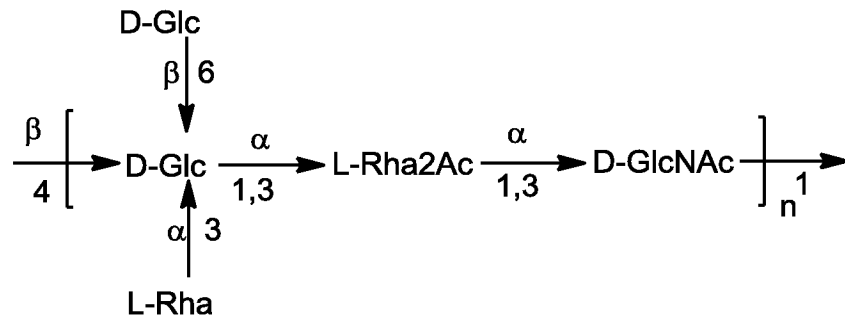
В конкретном воплощении в данном описании изобретения предложен выделенный O-антиген из штамма *E. coli* урес138. В другом конкретном

воплощении в данном описании изобретения предложен выделенный О-антиген из штамма *E. coli* ирес163. В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложен выделенный О-антиген из штамма *E. coli* ирес177.

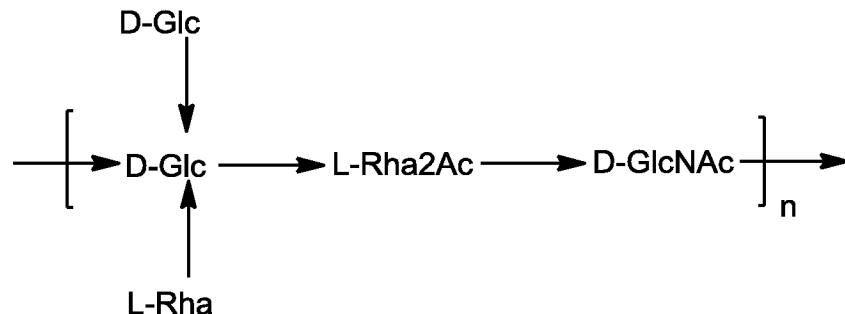
В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложен выделенный антиген O25B *E. coli* с формулой O25B:



В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложен выделенный антиген O25B *E. coli* с формулой O25B':



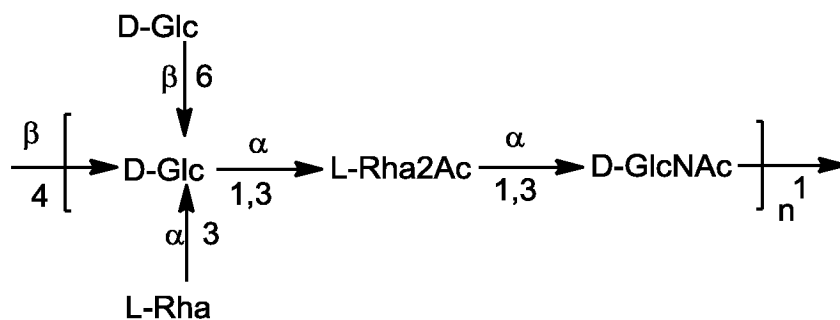
В другом аспекте в данном описании изобретения предложена группа выделенных макромолекул формулы O25B, представленной ниже:



где n представляет собой целое число от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20. В конкретном воплощении, n по меньшей мере для 80% макромолекул в этой группе

составляет от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20.

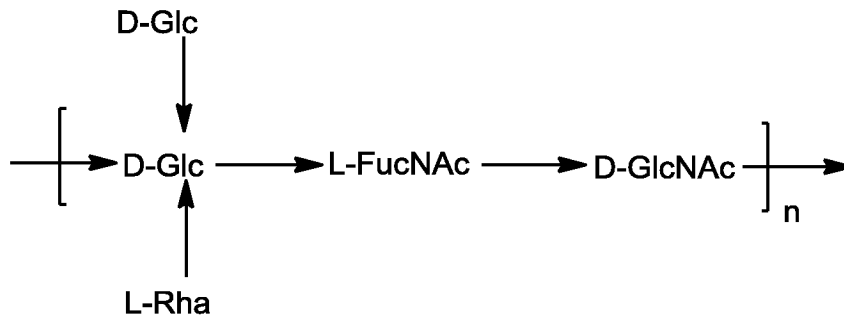
В другом аспекте в данном описании изобретения предложена группа выделенных макромолекул с формулой O25B', представленной ниже:



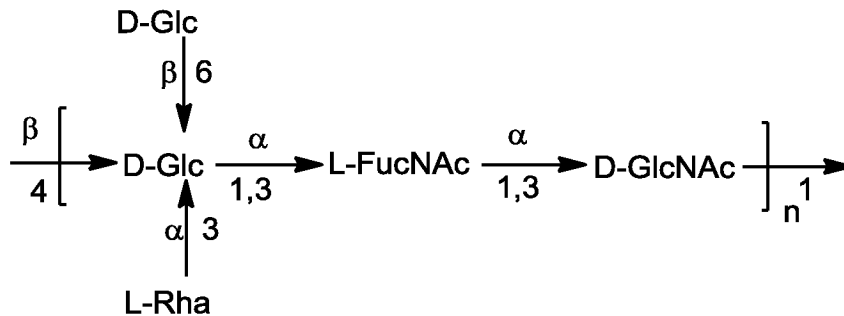
где n представляет собой целое число от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20. В конкретном воплощении, n по меньшей мере для 80% макромолекул в группе составляет от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20.

Другие антигены *E. coli*, используемые в композициях, описанных в данном документе (например в терапевтических композициях, например в вакцинах; см. Раздел 5.6), включают антигены O25A, а также O1, O2 и O6, и их субсеротипы.

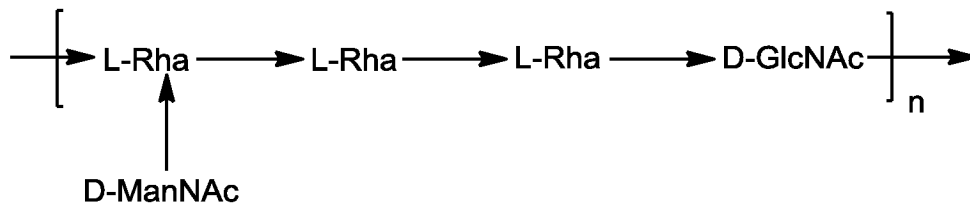
В одном воплощении антиген O25A (например в выделенной форме или как часть биоконъюгата) используют в композиции, предложенной в данном описании изобретения (например в комбинации с антигеном O25B (или биоконъюгатом, содержащим антиген O25B)). В конкретном воплощении антиген O25A имеет формулу O25A:



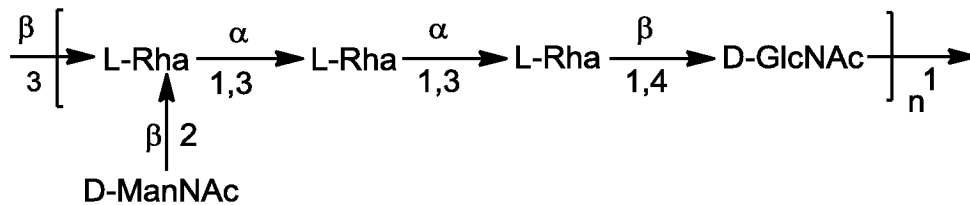
В другом конкретном воплощении антиген O25A имеет формулу O25A':



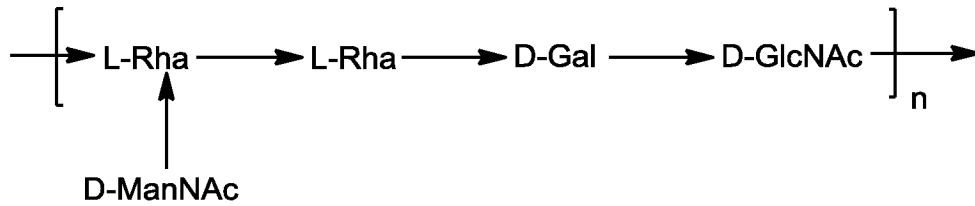
В одном воплощении антиген O1A (например в выделенной форме или как часть биоконъюгата) используют в композиции, предложенной в данном описании изобретения (например в комбинации с антигеном O25B (или биоконъюгатом, содержащим антиген O25B)). В конкретном воплощении антиген O1A имеет формулу O1A:



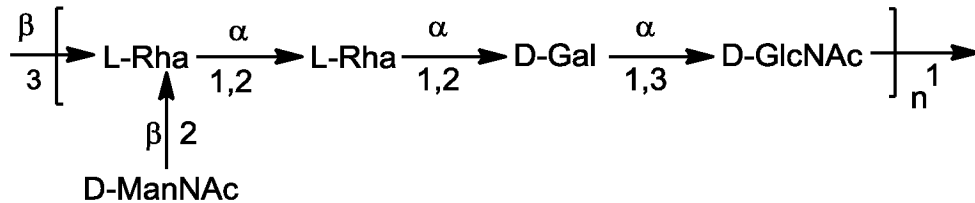
В другом конкретном воплощении антиген O1A имеет формулу O1A':



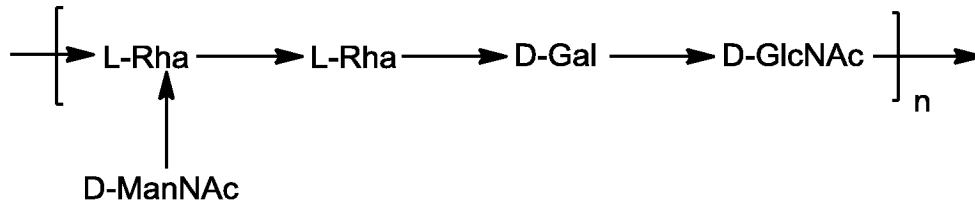
В одном воплощении антиген O1B (например в выделенной форме или как часть биоконъюгата) используют в композиции, предложенной в данном описании изобретения (например в комбинации с антигеном O25B (или биоконъюгатом, содержащим антиген O25B)). В конкретном воплощении антиген O1B имеет формулу O1B:



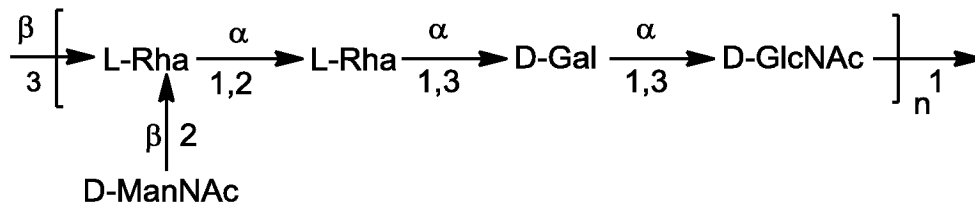
В другом конкретном воплощении антиген O1B имеет формулу O1B':



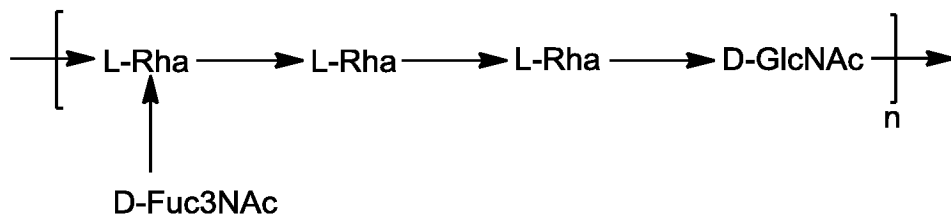
В одном воплощении антиген O1C (например в выделенной форме или как часть биоконъюгата) используют в композиции, предложенной в данном описании изобретения (например в комбинации с антигеном O25B (или биоконъюгатом, содержащим антиген O25B)). В конкретном воплощении антиген O1C имеет формулу O1C:



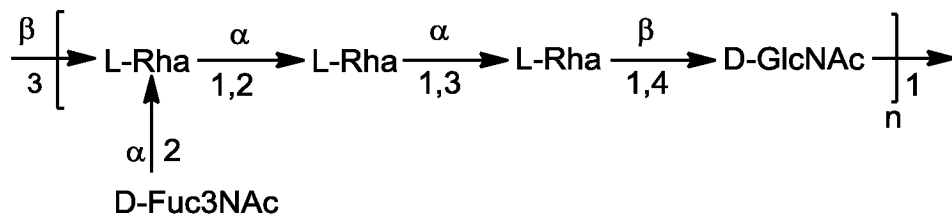
В другом конкретном воплощении антиген O1C имеет формулу O1C':



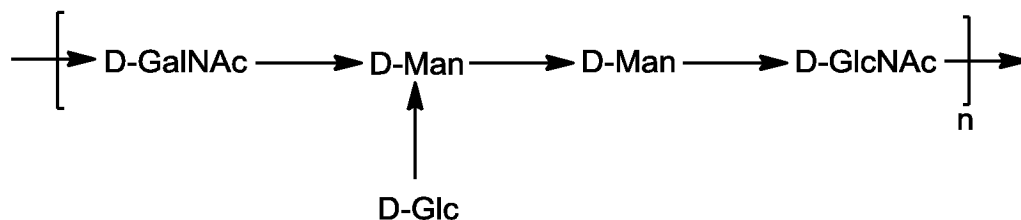
В одном воплощении антиген O2 (например в выделенной форме или как часть биоконъюгата) используют в композиции, предложенной в данном описании изобретения (например в комбинации с антигеном O25B (или биоконъюгатом, содержащим O25B антиген)). В конкретном воплощении антиген O2 имеет формулу O2:



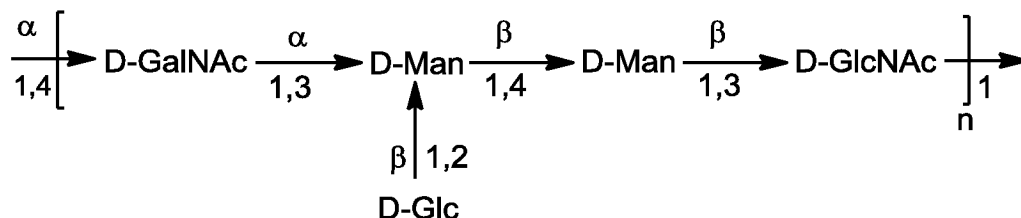
В другом конкретном воплощении антиген O2 имеет формулу O2':



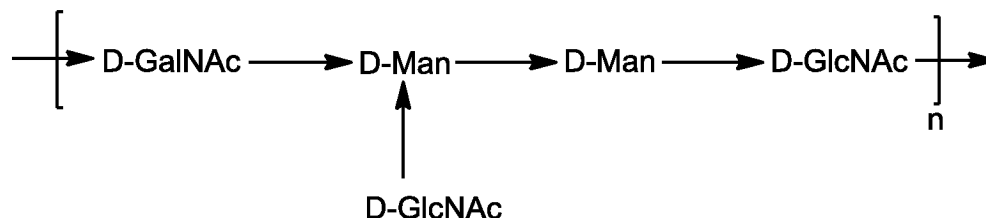
В одном воплощении антиген O6 (например в выделенной форме или как часть биоконъюгата) используют в композиции, предложенной в данном описании изобретения (например в комбинации с антигеном O25B (или биоконъюгатом, содержащим антиген O25B)). В конкретном воплощении антиген O6 имеет формулу O6K2 (также упоминаемую в данном описании изобретения, как O6Glc):



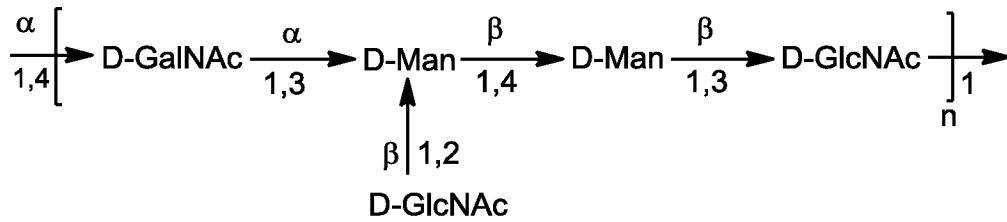
В другом конкретном воплощении антиген O6 имеет формулу O6K2' (также упоминаемую в данном описании изобретения, как O6Glc'):



В другом конкретном воплощении антиген O6 имеет формулу O6K54 (также упоминаемую в данном описании изобретения, как O6GlcNAc):



В другом конкретном воплощении антиген O6 имеет формулу O6K54' (также упоминаемую в данном описании изобретения, как O6GlcNAc'):



5.3 Клетки-хозяева

В данном документе предложены клетки-хозяева, например прокариотические клетки-хозяева, способные продуцировать О-антигены *E. coli*, и биоконъюгаты, содержащие такие О-антигены *E. coli*. В некоторых воплощениях клетки-хозяева, предложенные в данном описании изобретения, содержат (например естественным образом или посредством генной инженерии) одну или более нуклеиновых кислот, описанных в данном документе. См. Раздел 5.1. В некоторых воплощениях клетки-хозяева, предложенные в данном описании изобретения, продуцируют один или более О-антигенов *E. coli*, описанных в данном документе, и/или продуцируют биоконъюгаты, содержащие один или более О-антигенов *E. coli*, описанных в данном документе. См. Раздел 5.2.

В одном аспекте в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, содержащая нуклеиновые кислоты, кодирующие ферменты (например гликозилтрансферазы), способные продуцировать новый полисахарид, раскрытый в данном описании изобретения, O25B *E. coli*. В данном документе также предложены клетки-хозяева, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие ферменты (например гликозилтрансферазы), способные продуцировать другие антигены *E. coli*, например O25A, O1, O2 и O6 и их субсеротипы (см. Раздел 5.2). Клетки-хозяева, предложенные в данном описании изобретения, могут естественно экспрессировать нуклеиновые кислоты, способные продуцировать представляющий интерес О-антиген, или клетки-хозяева могут быть сконструированы, чтобы экспрессировать такие нуклеиновые кислоты, то есть в некоторых воплощениях указанные нуклеиновые кислоты гетерологичны клеткам-хозяевам и введены в клетки-хозяева с использованием генетических подходов, известных в данной области. В некоторых воплощениях клетки-хозяева, предложенные в данном описании изобретения, содержат

нуклеиновые кислоты, кодирующие дополнительные ферменты, проявляющие активность в *N*-гликозилировании белков, например, клетка-хозяин, предложенная в данном описании изобретения, может дополнительно содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую олигосахарил-трансферазу или нуклеиновые кислоты, кодирующие другие гликозилтрансферазы. См., например, Раздел 5.3.3. В некоторых воплощениях клетки-хозяева, предложенные в данном описании изобретения, содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-носитель, например белок, к которому могут быть присоединены олиго- и полисахариды с образованием биоконъюгата. См., например, Раздел 5.3.2 для описания белков-носителей и Раздел 5.4 для описания биоконъюгатов. В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

Урес138 представляет собой штамм *E. coli*, определенный в данном описании изобретения, как принадлежащий к серотипу O25B, и кластер *rfb* генов этого штамма (и штаммов серотипа O25B в целом) был идентифицирован в данном описании изобретения впервые, как содержащий гены, которые продуцируют новый полисахарид O25B *E. coli*. В конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, содержащая кластер генов *rfb* (урес138) *E. coli* (SEQ ID NO: 12) или кластер генов, который примерно или по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен или гомологичен SEQ ID NO: 12. В конкретном воплощении кластер генов *rfb* (урес138) *E. coli* (SEQ ID NO: 12) вводят в клетку-хозяина с помощью генетических манипуляций (например кластер генов экспрессируется на плазмиде или плаزمидах или интегрирован в геном клетки-хозяина (см., например международная заявка на патент PCT/EP2013/068737)). В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14), или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность или Asp(Glu)-X-Asn-

Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В другом конкретном воплощении некоторые или все гены *rfb* кластера гетерологичны по отношению к клетке-хозяину. В другом конкретном воплощении указанная олигосахарил-трансфераза гетерологична клетке-хозяину. В другом конкретном воплощении указанный белок-носитель гетерологичен клетке-хозяину. В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

Урес163 представляет собой штамм *E. coli*, определенный в данном описании изобретения, как принадлежащий к серотипу O25B, а кластер генов *rfb* штамма (и штаммов серотипа O25B в целом) был и идентифицирован в данном описании изобретения впервые, как содержащий гены, которые продуцируют новый полисахарид O25B *E. coli*. В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяина, содержащая кластер генов *rfb* (урес163) *E. coli* или кластер генов, которые примерно или по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны или гомологичны кластеру генов *rfb* (урес163) *E. coli*. В конкретном воплощении кластер генов *rfb* (урес163) *E. coli* вводят в клетку-хозяина с помощью генетических манипуляций (например, кластер генов экспрессируется на плазмиде или на плаزمидах, или интегрирован в геном клетки-хозяина (см., например, международную заявку на патент PCT/EP2013/068737)). В другом воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В еще одном конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14), или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность или Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В другом конкретном воплощении некоторые или все гены кластера *rfb* гетерологичны по отношению к клетке-хозяину. В другом конкретном воплощении указанная олигосахарил-трансфераза гетерологична по отношению к клетке-хозяину. В

другом конкретном воплощении указанный белок-носитель гетерологичен по отношению к клетке-хозяину. В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

Урес177 представляет собой штамм *E. coli*, определенный в данном описании изобретения, как принадлежащий к серотипу O25B, а кластер генов *rfb* штамма (и штаммов серотипа O25B в целом) идентифицирован в данном описании изобретения впервые, как содержащий гены, которые продуцируют новый полисахарид O25B *E. coli*. В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, содержащая кластер генов *rfb* (урес177) *E. coli* или кластер генов, который примерно или по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен или гомологичен кластеру генов *rfb* (урес177) *E. coli*. В конкретном воплощении кластер генов *rfb* (урес177) *E. coli* введен в клетку-хозяина с помощью генетических манипуляций (например кластер генов экспрессируется на плазмиде или плаزمидах, или введен в геном клетки-хозяина (см., например, международную заявку на патент РСТ/ЕР2013/068737)). В другом воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14), или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность или Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В другом конкретном воплощении некоторые или все гены кластера *rfb* гетерологичны по отношению к клетке-хозяину. В другом конкретном воплощении указанная олигосахарил-трансфераза гетерологична по отношению к клетке-хозяину. В другом конкретном воплощении указанный белок-носитель гетерологичен по отношению к клетке-хозяину. В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин (например рекомбинантно сконструированная прокариотическая клетка-хозяин), которая продуцирует O25B, где указанная клетка-хозяин содержит *rmlB*, *rmlD*, *rmlA*, *rmlC*, *wzx*, *wekA*, *wekB*, *wzy*, *wbbJ*, *wbbK* и/или *wbbL*. Такие клетки-хозяева могут быть сконструированы с использованием рекомбинантных подходов так, чтобы содержать одной или более плазмид, содержащих гены *rmlB*, *rmlD*, *rmlA*, *rmlC*, *wzx*, *wekA*, *wekB*, *wzy*, *wbbJ*, *wbbK* и/или *wbbL*. В некоторых воплощениях указанные одна или более плазмид интегрированы в геном клетки-хозяина. В конкретном воплощении указанный *rmlB* содержит SEQ ID NO: 1 или состоит из нее, или на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен или гомологичен SEQ ID NO: 1. В конкретном воплощении указанный *rmlD* содержит SEQ ID NO: 2 или состоит из нее, или на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен или гомологичен SEQ ID NO: 2. В конкретном воплощении указанный *rmlA* содержит SEQ ID NO: 3 или состоит из нее, или на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен или гомологичен SEQ ID NO: 3. В конкретном воплощении указанный *rmlC* содержит SEQ ID NO: 4 или состоит из нее, или на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен или гомологичен SEQ ID NO: 4. В конкретном воплощении указанный *wzx* содержит SEQ ID NO: 5 или состоит из нее, или на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен или гомологичен SEQ ID NO: 5. В конкретном воплощении указанный *wekA* содержит SEQ ID NO: 6 или состоит из нее, или на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен или гомологичен SEQ ID NO: 6. В конкретном воплощении указанный *wekB* содержит SEQ ID NO: 7 или состоит из нее, или на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен или гомологичен SEQ ID NO: 7. В конкретном воплощении указанный *wzy* содержит SEQ ID NO: 8 или состоит из нее, или на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен или гомологичен SEQ ID NO: 8. В конкретном воплощении указанный *wbbJ* содержит SEQ ID NO: 9 или состоит из нее, или на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен или гомологичен SEQ ID NO: 9. В конкретном воплощении указанный *wbbK* содержит SEQ ID NO: 10 или состоит из нее, или на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен

или гомологичен SEQ ID NO: 10. В конкретном воплощении указанный *wbbL* содержит SEQ ID NO: 11 или состоит из нее, или на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен или гомологичен SEQ ID NO: 11. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14), или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность или Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В другом конкретном воплощении некоторые или все гены, *rmlB*, *rmlD*, *rmlA*, *rmlC*, *wzx*, *wekA*, *wekB*, *wzy*, *wbbJ*, *wbbK*, и *wbbL* гетерологичны по отношению к клетке-хозяину. В другом конкретном воплощении указанная олигосахарил-трансфераза гетерологична по отношению к клетке-хозяину. В другом конкретном воплощении указанный белок-носитель гетерологичен по отношению к клетке-хозяину. В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин (например рекомбинантно сконструированная прокариотическая клетка-хозяин), которая продуцирует O25B, где указанная клетка-хозяин содержит один, два, три, четыре или более, например все, из следующих генов (или нуклеиновую кислоту, которая примерно или по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична или гомологична одному из следующих генов и предпочтительно кодирует белок с такой же функцией): *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) и/или *wbbL* (SEQ ID NO: 11). В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-

хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин (например рекомбинантно сконструированная прокариотическая клетка-хозяин), способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновокислотную последовательность *rmlB* (SEQ ID NO: 1). В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с O25B антигеном *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновокислотную последовательность, которая кодирует dTDP-глюкозо-4,6-дегидратазу, например dTDP-глюкозо-4,6-дегидратазу, которую кодирует *rmlB*. В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновую кислоту, которая примерно или по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 1. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель,

содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин (например рекомбинантно сконструированная прокариотическая клетка-хозяин), способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновокислотную последовательность *rmlD* (SEQ ID NO: 2). В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновокислотную последовательность, которая кодирует dTDP-6-дезоксид-D-глюкозо-3,5-эпимеразу, например dTDP-6-дезоксид-D-глюкозо-3,5-эпимеразу, которую кодирует *rmlD*. В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновую кислоту, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 2. В другом конкретном воплощении, прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или белок-

носитель, содержащий консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин (например рекомбинантно сконструированная прокариотическая клетка-хозяин), способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновокислотную последовательность *rmlA* (SEQ ID NO: 3). В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, способная продуцировать O25B, и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую глюкозо-1-фосфат-тимидилтрансферазу, например глюкозо-1-фосфат-тимидилтрансферазу, которую кодирует *rmlA*. В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновую кислоту, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 3. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за

исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин (например рекомбинантно сконструированная прокариотическая клетка-хозяин), способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновокислотную последовательность *rmlC* (SEQ ID NO: 4). В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую dTDP-4-дегидрорамнозо-3,5-эпимеразу, например dTDP-4-дегидрорамнозо-3,5-эпимеразу, которую кодирует *rmlC*. В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновую кислоту, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 4. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин (например рекомбинантно сконструированная прокариотическая клетка-хозяин), способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновокислотную последовательность *wzx* (SEQ ID NO: 5). В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую O-антиген-флиппазу, например O-антиген-флиппазу, которую кодирует *wzx*. В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, способная продуцировать O25B, и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновую кислоту, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 5. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин (например рекомбинантно сконструированная прокариотическая клетка-хозяин), способная продуцировать

O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновокислотную последовательность *wekA* (SEQ ID NO: 6). В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую рамнозилтрансферазу, например dTDP-Rha:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP α -1,3-рамнозилтрансферазу, которую кодирует *wekA*. В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или разработан для того, чтобы содержать нуклеиновые кислоты, которые по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны SEQ ID NO: 6. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин (например рекомбинантно сконструированная прокариотическая клетка-хозяин), способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или

сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновокислотную последовательность *wekB* (SEQ ID NO: 7). В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновокислотную последовательность, которая кодирует *wekB*-гликозилтрансферазу, например UDP-Glc:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP β -1,6-гликозилтрансферазу, которую кодирует *wekB*. В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновую кислоту, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 7. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин (например рекомбинантно сконструированная прокариотическая клетка-хозяин), способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновокислотную последовательность *wzy* (SEQ ID NO: 8). В другом конкретном воплощении в

данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую O-антиген-полимеразу, например O-антиген-полимеразу, которую кодирует *wzy*. В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновые кислоты, которые по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны SEQ ID NO: 8. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин (например рекомбинантно сконструированная прокариотическая клетка-хозяин), способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновокислотную последовательность *wbbJ* (SEQ ID NO: 9). В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-

носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую O-ацетилтрансферазу, например O-ацетилтрансферазу, которую кодирует *wbbJ*. В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновые кислоты, которые по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны SEQ ID NO: 9. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин (например рекомбинантно сконструированная прокариотическая клетка-хозяин), способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновокислотную последовательность *wbbK* (SEQ ID NO: 10). В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать

нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую гликозилтрансферазу, например UDP-Glc:Rha-GlcNAc-UPP α -1,3-гликозилтрансферазу, которую кодирует *wbbK*. В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновые кислоты, которые по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны SEQ ID NO: 10. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин (например рекомбинантно сконструированная прокариотическая клетка-хозяин), способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновокислотную последовательность *wbbL* (SEQ ID NO: 11). В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую рамнозилтрансферазу, например dTDP-Rha:GlcNAc-UPP α -1,3-

рамнозилтрансферазу, которую кодирует *wbbL*. В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин, способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать нуклеиновые кислоты, которые по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны SEQ ID NO: 11. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин (например рекомбинантно сконструированная прокариотическая клетка-хозяин), способная продуцировать O25B и/или биоконъюгат O25B (то есть белок-носитель, связанный с антигеном O25B *E. coli*), где указанная клетка-хозяин естественным образом содержит или сконструирована так, чтобы содержать по меньшей мере один, два, три, четыре или более, например все, из следующих: (1) нуклеиновокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 1; (2) нуклеиновокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 2; (3) нуклеиновокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%,

99% или 100% идентична SEQ ID NO: 3; (4) нуклеиновокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 4; (5) нуклеиновокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 5; (6) нуклеиновокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 6; (7) нуклеиновокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 7; (8) нуклеиновокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 8; (9) нуклеиновокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 9; (10) нуклеиновокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 10; и/или (11) нуклеиновокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 11. В конкретном воплощении указанная клетка-хозяин была разработана так, чтобы включать каждую из указанных последовательностей, то есть указанные последовательности являются гетерологичными по отношению к указанной клетке-хозяину. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность

Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин (например рекомбинантно сконструированная прокариотическая клетка-хозяин), которая продуцирует O25B, где указанная клетка-хозяин содержит по меньшей мере два из следующих объектов (1) *wbbJ* (SEQ ID NO: 9) или нуклеиновую кислоту, которая примерно или по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична или гомологична SEQ ID NO: 9; (2) *wbbK* (SEQ ID NO: 10) или нуклеиновую кислоту, которая примерно или по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична или гомологична SEQ ID NO: 10; и/или (3) *wbbL* (SEQ ID NO: 11) или нуклеиновую кислоту, которая примерно или по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична или гомологична SEQ ID NO: 11. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин (например рекомбинантно сконструированная прокариотическая клетка-хозяин), которая продуцирует O25B, где указанная клетка-хозяин содержит каждый из (1) *wbbJ* (SEQ ID NO: 9) или нуклеиновую кислоту, которая примерно или по меньшей мере на 75%,

80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична или гомологична SEQ ID NO: 9; (2) *wbbK* (SEQ ID NO: 10) или нуклеиновую кислоту, которая примерно или по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична или гомологична SEQ ID NO: 10; и (3) *wbbL* (SEQ ID NO: 11) или нуклеиновую кислоту, которая примерно или по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична или гомологична SEQ ID NO: 11. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащую консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин (например рекомбинантно сконструированная прокариотическая клетка-хозяин), которая продуцирует O25B, где указанная клетка-хозяин содержит (1) dTDP-глюкозо-4,6-дегидратазу; (2) dTDP-6-дезоксид-глюкозо-3,5-эпимеразу; (3) глюкозо-1-фосфат-тимидилитрансферазу; (4) dTDP-4-дегидрорамнозо-3,5-эпимеразу; (5) O-антиген-флипазу; (6) dTDP-Rha:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP α -1,3-рамнозилтрансферазу; (7) UDP-Glc:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP β -1,6-гликозилтрансферазу; (8) O-антиген-полимеразу; (9) O-ацетилтрансферазу; (10) UDP-Glc:Rha-GlcNAc-UPP α -1,3-гликозилтрансферазу и/или (11) dTDP-Rha:GlcNAc-UPP α -1,3-рамнозилтрансферазу. В конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X

может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14), или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность или Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В другом конкретном воплощении некоторые или все из (1) dTDP-глюкозо-4,6-дегидратазы; (2) dTDP-6-дезоксид-глюкозо-3,5-эпимеразы; (3) глюкозо-1-фосфат тимидилитрансферазы; (4) dTDP-4-дегидрорамнозо-3,5-эпимеразы; (5) O-антиген-флиппазы; (6) dTDP-Rha:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP α -1,3-рамнозилтрансферазы; (7) UDP-Glc:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP β -1,6-гликозилтрансферазы (8) O-антиген-полимеразы; (9) O-ацетилтрансферазы; (10) UDP-Glc:Rha-GlcNAc-UPP α -1,3-гликозилтрансферазы и/или (11) dTDP-Rha:GlcNAc-UPP α -1,3-рамнозилтрансферазы являются гетерологичными по отношению к клетке-хозяину. В другом конкретном воплощении указанная олигосахарил-трансфераза гетерологична по отношению к клетке-хозяину. В другом конкретном воплощении указанный белок-носитель гетерологичен по отношению к клетке-хозяину. В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

В другом аспекте в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин (например рекомбинантно сконструированная прокариотическая клетка-хозяин), которая продуцирует O25A *E. coli*, то есть указанная клетка-хозяин содержит ферменты, способные синтезировать O25A *E. coli* (см., например Фиг. 3). В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

В другом аспекте в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин (например рекомбинантно сконструированная прокариотическая клетка-хозяин), которая продуцирует O1 *E. coli*, то есть указанная клетка-хозяин содержит ферменты, способные синтезировать O1 *E. coli* (см., например Фиг. 12). В конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена клетка-хозяин, которая продуцирует O1A *E. coli*. В конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена клетка-хозяин, которая продуцирует O1B *E. coli*. В конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена клетка-хозяин, которая продуцирует O1C *E. coli*. В другом конкретном воплощении, прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

В другом аспекте в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин (например рекомбинантно сконструированная прокариотическая клетка-хозяин) которая продуцирует O2 *E. coli*, то есть указанная клетка-хозяин содержит ферменты, способные синтезировать O2 *E. coli* (см., например Фиг. 19). В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной

аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

В другом аспекте в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин (например рекомбинантно сконструированная прокариотическая клетка-хозяин), которая продуцирует O6 *E. coli*, то есть указанная клетка-хозяин содержит ферменты, способные синтезировать O6 *E. coli* (см., например Фиг. 17). В конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена клетка-хозяин, которая продуцирует O6 *E. coli*, содержащий разветвленный Glc-моносахарид, или O6-антиген, содержащий разветвленный GlcNAc-моносахарид. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

Кроме того, в данном описании изобретения предложена прокариотическая клетка-хозяин (например рекомбинантно сконструированная прокариотическая клетка-хозяин), способная продуцировать более одного типа O-антигенов *E. coli*. В конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена клетка-хозяин, способная продуцировать по меньшей мере два из следующих типов: O25B, O25A, O1 (например O1A, O1B, O1C), O2 и O6. В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена клетка-хозяин, способная продуцировать O25B и один или более из O25A, O1 (например O1A, O1B, O1C), O2 и O6. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу. В другом конкретном воплощении прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую белок-

носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). В конкретном воплощении клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

5.3.1 Генетический фон

Все клетки-хозяева, известные специалисту в данной области, можно использовать для получения О-антигенов *E. coli*, описанных в данном документе (например O25B), и биоконъюгатов, содержащих О-антигены *E. coli*, описанные в данном документе (например O25B), в том числе археи, прокариотические клетки-хозяева и эукариотические клетки-хозяева. Типичные прокариотические клетки-хозяева для применения в продуцировании О-антигенов *E. coli*, описанных в данном документе, и биоконъюгатов, содержащих О-антигены *E. coli*, описанных в данном документе, включают без ограничения ими, виды *Escherichia*, виды *Shigella*, виды *Klebsiella*, виды *Xhantomonas*, виды *Salmonella*, виды *Yersinia*, виды *Lactococcus*, виды *Lactobacillus*, виды *Pseudomonas*, виды *Corynebacterium*, виды *Streptomyces*, виды *Streptococcus*, виды *Staphylococcus*, виды *Bacillus* и виды *Clostridium*. В конкретном воплощении клетка-хозяин, используемая для продуцирования О-антигенов *E. coli*, описанных в данном документе, и биоконъюгатов, содержащих О-антигены *E. coli*, описанных в данном документе, представляет собой *E. coli*.

В некоторых воплощениях клетки-хозяева, используемые для получения О-антигенов *E. coli* и биоконъюгатов, описанных в данном документе, сконструированы так, чтобы содержать гетерологичные нуклеиновые кислоты, например гетерологичные нуклеиновые кислоты, которые кодируют один или более белков-носителей, и/или гетерологичные нуклеиновые кислоты, которые кодируют один или более белков, например гены, кодирующие один или более белков. В конкретном воплощении гетерологичные нуклеиновые кислоты, которые кодируют белки, участвующие в путях гликозилирования (например прокариотических и/или эукариотических путях гликозилирования), могут быть введены в клетки-хозяева, описанные в данном документе. Такие нуклеиновые

кислоты могут кодировать белки, включающие, без ограничения ими, олигосахарил-трансферазы и/или гликозилтрансферазы. Гетерологичные нуклеиновые кислоты (например нуклеиновые кислоты, которые кодируют белки-носители, и/или нуклеиновые кислоты, которые кодируют другие белки, например белки, вовлеченные в гликозилирование) могут быть введены в клетки-хозяева, описанные в данном документе, с использованием любых методов, известных специалистам в данной области, например электропорации, химической трансформации посредством теплового шока, естественной трансформации, фаговой трансдукции и конъюгации. В конкретных воплощениях гетерологичные нуклеиновые кислоты вводят в клетки-хозяева, описанные в данном документе, используя плазмиду, например гетерологичные нуклеиновые кислоты экспрессируются в клетках-хозяевах с помощью плазмиды (например экспрессионного вектора). В другом конкретном воплощении гетерологичные нуклеиновые кислоты вводят в клетки-хозяева, описанные в данном документе, используя способ введения, описанный в международной заявке на патент PCT/EP2013/068737.

В некоторых воплощениях могут быть введены дополнительные модификации (например с использованием рекомбинантных методов) в клетки-хозяева, описанные в данном документе. Например нуклеиновые кислоты клетки-хозяина (например гены), которые кодируют белки, составляющие часть возможно конкурирующего или интерферирующего пути гликозилирования (например конкурирующие или интерферирующие с одним или более гетерологичным генам, вовлеченным в гликозилирование, которые рекомбинантно введены в клетки-хозяева), могут быть удалены или модифицированы в фоне клетки-хозяина (геноме) способом, который делает их неактивными/дисфункциональными (то есть нуклеиновые кислоты клетки-хозяина, которые удалены/модифицированы, не кодируют функциональный белок или не кодируют никакого белка). В некоторых воплощениях, когда нуклеиновые кислоты делетированы из генома клеток-хозяев, предложенных в данном описании изобретения, их замещают нужной последовательностью, например последовательностью, которую можно использовать для получения гликопротеина.

Типичные гены, которые могут быть делетированы в клетках-хозяевах (и в некоторых случаях замещены другими нужными последовательностями нуклеиновых кислот), включают гены клеток-хозяев, вовлеченные в биосинтез гликолипидов, такие как *waaL* (см., например Feldman et al., 2005, PNAS USA 102:3016-3021), кластер биосинтеза ядра липида А (*waa*), кластер галактозы (*gal*), кластер арабинозы (*ara*), кластер колановой кислоты (*wc*), кластер капсульного полисахарида, гены биосинтеза ундекапrenoла-р (например *uppS*, *uppP*), гены рециклинга und-P, метаболические ферменты, вовлеченные в биосинтез нуклеотид-активированного сахара, кластер энтеробактериального общего антигена и кластеры модификации O-антигена профага, такие как кластер *gtrABS*. В конкретном воплощении клетки-хозяева, описанные в данном документе, модифицированы таким образом, что они не продуцируют никаких O-антигенов, отличных от необходимого O-антигена из ExPEC, например O25B. В конкретном воплощении один или более из кластеров гена *waaL*, гена *gtrA*, гена *gtrB*, гена *gtrS* или гена *rfa* делетирован или функционально инактивирован в геноме прокариотической клетки-хозяина, предложенной в данном описании изобретения. В одном воплощении клетка-хозяин, используемая в данном описании изобретения, представляет собой *E. coli*, которая продуцирует антиген O25B, где ген *waaL*, ген *gtrA*, ген *gtrB* и ген *gtrS* делетированы или функционально инактивированы в геноме клетки-хозяина. В другом воплощении клетка-хозяин, используемая в данном описании изобретения, представляет собой *E. coli*, которая продуцирует антиген O25B, где ген *waaL* и ген *gtrS* делетированы или функционально инактивированы в геноме клетки-хозяина.

В некоторых воплощениях модифицированные клетки-хозяева, предложенные в данном описании изобретения, могут быть использованы для гликозилирования белка. Гликозилирование белка может быть предназначено для получения биоконъюгатов для применения в вакцинных композициях, например в вакцинах, которые содержат полисахаридный(е) антиген(ов) *E. coli*, например O25 (например O25B), O1, O2 и O6.

5.3.2 Белки-носители

Любой белок-носитель, подходящий для применения в продуцировании конъюгатных вакцин (например биоконъюгатов для применения в вакцинах),

может быть использован в данном описании изобретения, например нуклеиновые кислоты, кодирующие белок-носитель, могут быть введены в хозяина, предложенного в данном описании изобретения, для получения биоконъюгата, содержащего белок-носитель, связанный с антигеном ExPEC (например O25B). Типичные белки-носители включают, без ограничения ими, детоксифицированный экзотоксин А из *P. aeruginosa* (EPA; см., например Ihssen, et al., (2010) *Microbial cell factories* 9, 61), CRM197, мальтозосвязывающий белок (MBP), дифтерийный анатоксин, столбнячный анатоксин, детоксифицированный гемолизин А из *S. aureus*, фактор агглютинации А, фактор агглютинации В, FimH *E. coli*, FimHC *E. coli*, термолабильный энтеротоксин *E. coli*, детоксифицированные варианты термолабильного энтеротоксина *E. coli*, субъединицу В холерного токсина (СТВ), холерный токсин, детоксифицированные варианты холерного токсина, белок Sat *E. coli*, домен-пассажир белка Sat *E. coli*, пневмолизин *Streptococcus pneumoniae* и его детоксифицированные варианты, AcrA *C. jejuni* и природные гликопротеины *C. jejuni*. Различные детоксифицированные варианты белка EPA описаны в литературе и могут быть использованы в качестве белков-носителей.

В некоторых воплощениях белки-носители, используемые в получении биоконъюгатов, описанных в данном документе, являются модифицированными, например модифицированными таким образом, что белок является менее токсичным и/или более чувствительным к гликозилированию. В конкретном воплощении белки-носители, используемые в получении биоконъюгатов, описанных в данном документе, являются модифицированными так, что число сайтов гликозилирования в белках-носителях максимизировано таким образом, который делает возможным введение более низкой концентрации белка, например в иммуногенной композиции, в его биоконъюгатной форме.

В некоторых воплощениях белки-носители, описанные в данном документе, модифицированы так, чтобы включать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более сайтов гликозилирования, которые обычно ассоциированы с белком-носителем (например, относительно числа сайтов гликозилирования, ассоциированных с белком-носителем в его нативном/природном состоянии, например в состоянии "дикого типа"). В конкретных воплощениях введение

сайтов гликозилирования осуществляется путем введения консенсусных последовательностей гликозилирования (например Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987)) в любом месте первичной структуры белка. Введение таких сайтов гликозилирования может быть осуществлено посредством, например, добавления новых аминокислот к первичной структуре белка (то есть добавлены сайты гликозилирования, полностью или частично) или посредством мутаций существующих аминокислот в белке так, чтобы образовались сайты гликозилирования (то есть аминокислоты не добавляются к белку, а выбранные аминокислоты белка подвергнуты мутации так, чтобы образовались сайты гликозилирования). Специалистам в данной области техники понятно, что аминокислотная последовательность белка может быть легко модифицирована с использованием подходов, известных в данной области, например рекомбинантных подходов, которые включают модификацию нуклеиновокислотной последовательности, кодирующей белок. В конкретных воплощениях консенсусные последовательности гликозилирования вводят в определенные области белка-носителя, например в поверхностные структуры белка, на N- или C-конце белка, и/или в петли, которые стабилизированы дисульфидными мостиками в основе белка. В некоторых воплощениях классическая консенсусная последовательность гликозилирования из 5 аминокислот может быть удлинена с помощью остатков лизина для более эффективного гликозилирования и, таким образом, вставленная консенсусная последовательность может кодировать 5, 6 или 7 аминокислот, которые должны быть вставлены или которые замещают аминокислоты акцепторного белка. В одном конкретном воплощении белок-носитель представляет собой детоксифицированный EPA, содержащий 4 консенсусные последовательности гликозилирования Asp/Glu-X-Asn-Z-Ser/Thr (SEQ ID NO: 15), и имеют аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 13.

В некоторых воплощениях белки-носители, используемые в образовании биоконъюгатов, описанных в данном документе, содержат "метку", то есть последовательность аминокислот, которая позволяет выделить и/или

идентифицировать белок-носитель. Например, добавление метки к белку-носителю, описанному в данном документе, может быть полезным в очистке такого белка и, следовательно, очистки конъюгатных вакцин, содержащих меченый белок-носитель. Типичные метки, которые можно использовать в данном изобретении, включают, без ограничения ими, гистидиновые (HIS) метки (например гексагистидиновую метку или 6XHis-Tag), FLAG-TAG и HA-метки. В некоторых воплощениях метки, используемые в настоящем документе, являются удаляемыми, например их удаляют с помощью химических агентов или ферментативными средствами, когда они больше не нужны, например, после того как белок был очищен.

В некоторых воплощениях белки-носители, описанные в данном документе, содержат сигнальную последовательность, которая направляет белок-носитель в периплазматическое пространство клетки-хозяина, экспрессирующей белок-носитель. В конкретном воплощении сигнальная последовательность происходит из DsbA *E. coli*, порина A внешней мембраны *E. coli* (OmpA), мальтозосвязывающего белка (MalE) *E. coli*, пектат-лиазы *Erwinia carotovora* (PelB), FlgI, NikA или эндоксиланазы (XynA) *Bacillus* sp., термолабильного энтеротоксина LTIIb *E. coli*, эндоксиланазы XynA *Bacillus* или флагеллина (FlgI) *E. coli*.

5.3.3 Механизм гликозилирования

Клетки-хозяева, предложенные в данном описании изобретения, содержат, и/или могут быть модифицированы так чтобы включать, нуклеиновые кислоты, которые кодируют генетический механизм (например гликозилтрансферазы), способный продуцировать O-антигены из ExPEC, например антигены O25 (например O25B), O1, O2, и/или O6. См. Раздел 5.1.

Гликозилтрансферазы

Клетки-хозяева, предложенные в данном описании изобретения, содержат нуклеиновые кислоты, которые кодируют гликозилтрансферазы, способные продуцировать O-антигены ExPEC, например O-антиген из *E. coli* серотипа O25 (например O25A или O25B, см. Фиг. 3B), O1 (см. Фиг. 12), O2 (см. Фиг. 19) и O6 (например серотип O6, продуцирующий O6-антиген, содержащий разветвленный Glc-моносахарид, или O6-антиген, содержащий разветвленный GlcNAc-моносахарид, см. Фиг. 17). Типичные нуклеиновые кислоты описаны в

Разделе 5.1. В некоторых воплощениях некоторые или все нуклеиновые кислоты, которые кодируют гликозилтрансферазы, способные продуцировать О-антиген ExPEC, естественно экспрессируются клетками-хозяевами, предложенными в данном описании изобретения (например нуклеиновые кислоты присутствуют в фоне клетки-хозяина “дикого типа”). В некоторых воплощениях некоторые или все нуклеиновые кислоты, которые кодируют гликозилтрансферазы, способные продуцировать О-антиген ExPEC, в естественных условиях не экспрессируются клетками-хозяевами, предложенными в данном описании изобретения, то есть некоторые или все нуклеиновые кислоты являются гетерологичными по отношению к клетке-хозяину. Клетки-хозяева могут быть сконструированы так, чтобы содержать конкретные нуклеиновые кислоты, например нуклеиновые кислоты, описанные в Разделе 5.1, с использованием способов, известных в данной области, например способов, описанных в Разделе 5.3.

В конкретном воплощении клетки-хозяева, предложенные в данном описании изобретения, содержат нуклеиновые кислоты, которые кодируют гликозилтрансферазы, способные продуцировать О-антиген *E. coli* серотипа O25B, то есть O25B-антиген, описанный в данном документе. В конкретном воплощении указанные нуклеиновые кислоты кодируют кластер *rfb* из *ucres138* (SEQ ID NO: 12) или кластер генов, который примерно или по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен или гомологичен SEQ ID NO: 12.

В конкретном воплощении указанные нуклеиновые кислоты кодируют кластер *rfb* из *ucres163* или кластер генов, который примерно или по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен или гомологичен кластеру *rfb* из *ucres163*. В другом конкретном воплощении указанные нуклеиновые кислоты кодируют кластер *rfb* из *ucres177* или кластер генов, который примерно или по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен или гомологичен кластеру *rfb* из *ucres177*.

В другом конкретном воплощении указанные нуклеиновые кислоты, которые кодируют гликозилтрансферазы, способные продуцировать О-антиген серотипа O25B *E. coli*, представляют собой гены серотипа O25B, где указанные гены представляют собой *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) и *wbbL* (SEQ ID NO: 11). См. таблицы 3 и 9.

В конкретном воплощении клетки-хозяева, предложенные в данном описании изобретения, содержат нуклеиновые кислоты, которые кодируют белки (например гликозилтрансферазы), способные продуцировать О-антиген серотипа O25A *E. coli*, то есть антиген O25A, описанный в данном документе. В другом конкретном воплощении указанные нуклеиновые кислоты, которые кодируют белки (например гликозилтрансферазы), способные продуцировать О-антиген *E. coli* серотипа O25A, представляют собой гены серотипа O25, где указанные гены представляют собой *rmlB*, *rmlD*, *rmlA*, *rmlC*, *wzx*, *wekA*, *wekB*, *wekC*, *wzy*, *fnlA*, *fnlB*, *fnlC*, *wbuB*, *u/ulu wbuC*. См. Wang, et al. (2010) J Clin Microbiol 48, 2066-2074; GenBank GU014554; и Таблицу 2.

В другом конкретном воплощении клетки-хозяева, предложенные в данном описании изобретения, содержат нуклеиновые кислоты, которые кодируют гликозилтрансферазы, способные продуцировать О-антиген *E. coli* серотипа O2. В другом конкретном воплощении указанные нуклеиновые кислоты, которые кодируют гликозилтрансферазы, способные продуцировать О-антиген *E. coli* серотипа O2, представляют собой гены серотипа O2, где указанные гены представляют собой *rmlB*, *rmlD*, *rmlA*, *rmlC*, *wzx*, *wekP*, *wekQ*, *wekR*, *wzy*, *fdtA*, *fdtB*, *u/ulu fdtC*. См. Li, et al., (2010) J Microbiol Methods 82, 71-77; Fratamico, et al., 2010, Canadian Journal of Microbiology 56, 308-316; и Таблицу 5.

В другом конкретном воплощении клетки-хозяева, предложенные в данном описании изобретения, содержат нуклеиновые кислоты, которые кодируют гликозилтрансферазы, способные продуцировать О-антиген *E. coli* серотипа O6. См. Welch et al., 2002, PNAS USA 99(26):17020-17024; Jann et al., Carbohydr. Res. 263 (1994) 217-225 и Jansson et al., Carbohydr. Res. 131 (1984) 277-283. В конкретном воплощении указанный серотип O6 содержит разветвленный Glc-моносахарид.

В другом конкретном воплощении клетки-хозяева, предложенные в данном описании изобретения, содержат нуклеиновые кислоты, которые кодируют гликозилтрансферазы, способные продуцировать О-антиген *E. coli*

серотипа O1. В конкретном воплощении указанный серотип O1 представляет собой O1A. В другом конкретном воплощении указанные нуклеиновые кислоты, которые кодируют гликозилтрансферазы, способные продуцировать O-антиген *E. coli* серотипа O1 представляют собой гены серотипа O1, где указанные гены представляют собой *rmlB*, *rmlD*, *rmlA*, *rmlC*, *wzx*, *mnaA*, *wekM*, *wzy*, *wekN* и/или *wekO*.

Олигосахарил-трансферазы

Олигосахарил-трансферазы переносят липид-связанные олигосахариды на остаток аспарагина образующихся полипептидных цепей, которые содержат консенсусный мотив *N*-гликозилирования, например Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15) (см. WO 2006/119987). См., например WO 2003/074687 and WO 2006/119987, описания которых включены в данное описание посредством ссылки во всей их полноте.

В некоторых воплощениях клетки-хозяева, предложенные в данном описании изобретения, содержат нуклеиновую кислоту, которая кодирует олигосахарил-трансферазу. Нуклеиновая кислота, которая кодирует олигосахарил-трансферазу, может быть природной для клетки-хозяина или может быть введена в клетку-хозяина с использованием генетических подходов, как описано выше. Олигосахарил-трансфераза может происходить из любого источника, известного в данной области. В конкретном воплощении олигосахарил-трансфераза представляет собой олигосахарил-трансферазу из *Campylobacter*. В другом конкретном воплощении олигосахарил-трансфераза представляет собой олигосахарил-трансферазу из *Campylobacter jejuni* (то есть *pglB*; см., например, Wacker et al., 2002, Science 298:1790-1793; см. также, например, NCBI Gene ID: 3231775, учетный номер. O86154 UniProt). В другом конкретном воплощении олигосахарил-трансфераза представляет собой олигосахарил-трансферазу из *Campylobacter lari* (см., например, NCBI Gene ID: 7410986).

5.4 Биоконъюгаты

В некоторых воплощениях клетки-хозяева, описанные в данном документе, могут быть использованы для получения биоконъюгатов,

содержащих О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (например O25B; см. Раздел 5.2), связанный с белком-носителем. Способы получения таких биоконъюгатов с использованием клеток-хозяев известны в данной области. См., например WO 2003/074687 и WO 2006/119987.

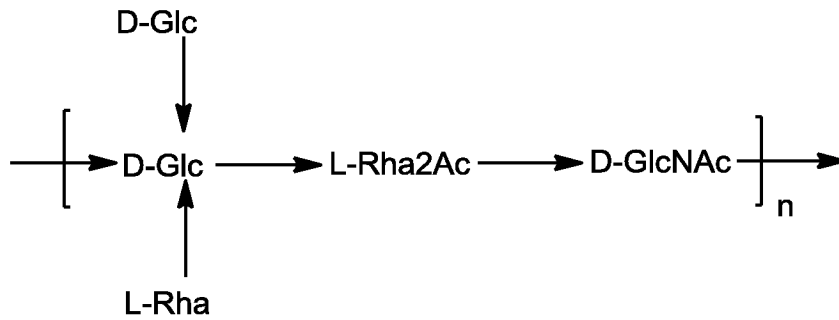
Альтернативно, гликоконъюгаты могут быть получены посредством химического синтеза, то есть получены вне клеток-хозяев (*in vitro*). Например, О-антигены *E. coli*, описанные в данном документе, например O25B, могут быть конъюгированы с белками-носителями с использованием способов, известных специалистам в данной области, включая использование активации реакционноспособных групп в полисахариде/олигосахариде, а также в белке-носителе. См., например Pawlowski et al., 2000, Вакцина 18:1873-1885; и Robbins, et al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106:7974-7978), описания которых включены в данное описание изобретения посредством ссылки. Такие подходы включают экстракцию антигенных полисахаридов/олигосахаридов из клеток-хозяев, очистку полисахаридов/олигосахаридов, химическую активацию полисахаридов/олигосахаридов и конъюгацию полисахаридов/олигосахаридов с белком-носителем.

Биоконъюгаты, описанные в данном документе, обладают более полезными свойствами по сравнению с гликоконъюгатами, например для изготовления биоконъюгатов требуется меньше химических веществ, и они являются более совместимыми с точки зрения полученного конечного продукта. Таким образом, биоконъюгаты являются более предпочтительными по сравнению с химически получаемыми гликоконъюгатами.

В конкретном воплощении в данном описании изобретения предложены биоконъюгаты, содержащие белок-носитель, связанный с О-антигеном ExPEC, описанным в данном документе. См. Раздел 5.2.

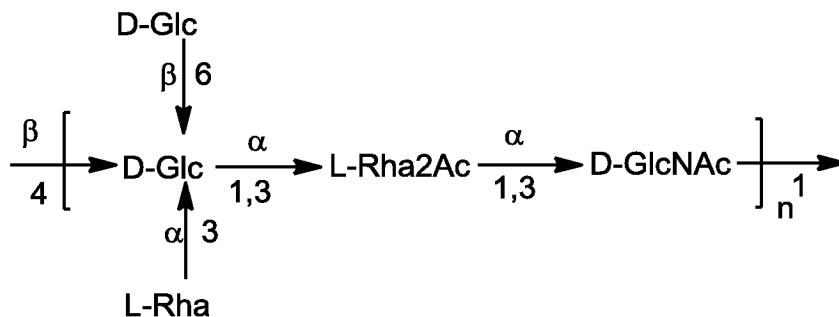
В конкретном воплощении в данном описании изобретения предложен биоконъюгат, содержащий белок-носитель (например EPA), N-связанный с O25B *E. coli*.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложен биоконъюгат, содержащий белок-носитель (например EPA), связанный с соединением формулы O25B, представленной ниже:



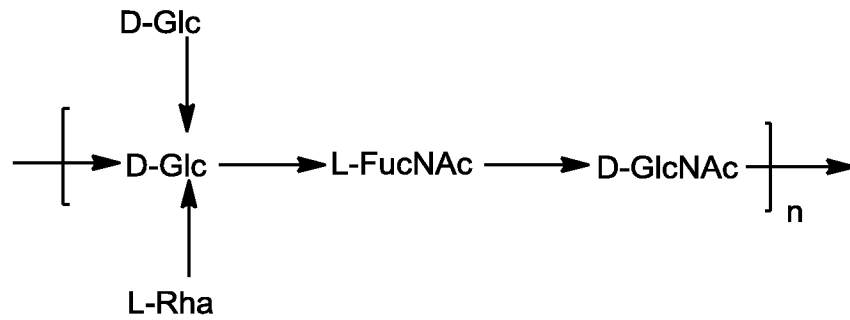
где n представляет собой целое число от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20. В конкретном воплощении белок-носитель N -связан с O -антигеном формулы O25B, то есть O25B связан с остатком Asn белка-носителя, содержащего последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14); или белка-носителя, содержащего консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15).

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложен биоконъюгат, содержащий белок-носитель (например EPA), связанный с соединением формулы O25B', представленной ниже:

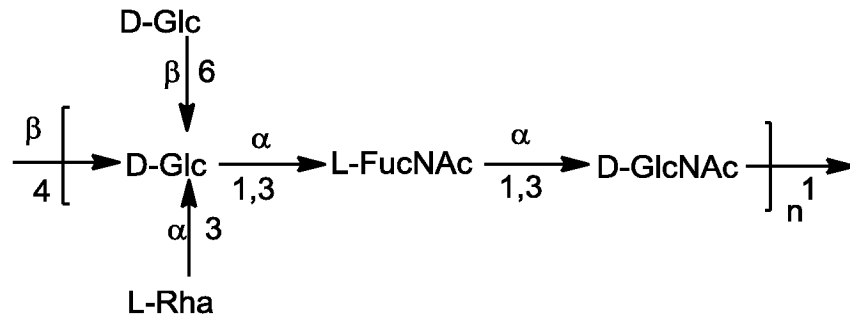


где n представляет собой целое число от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20. В конкретном воплощении, белок-носитель N -связан с O -антигеном формулы O25B'.

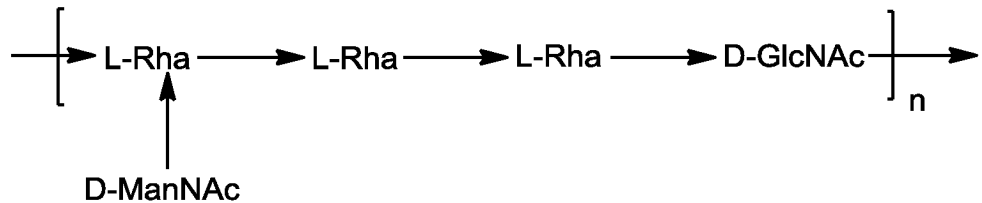
В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложен биоконъюгат, содержащий белок-носитель (например EPA), связанный с антигеном O25A. В конкретном воплощении указанный антиген O25A содержит формулу O25A:



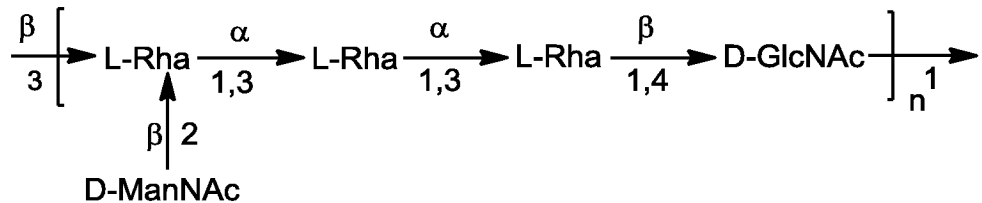
или O25A':



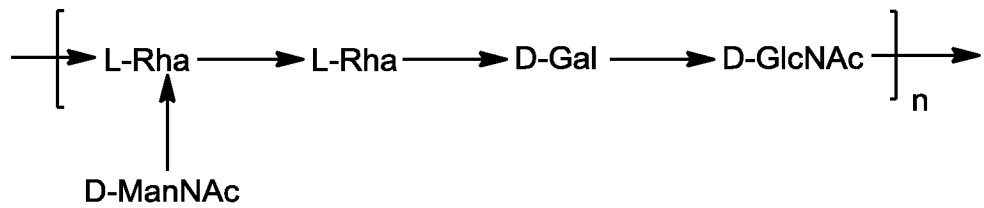
В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложен биоконъюгат, содержащий белок-носитель (например EPA), связанный с антигеном O1. В конкретном воплощении указанный антиген O1 представляет собой O1A, например указанный антиген имеет формулу O1A:



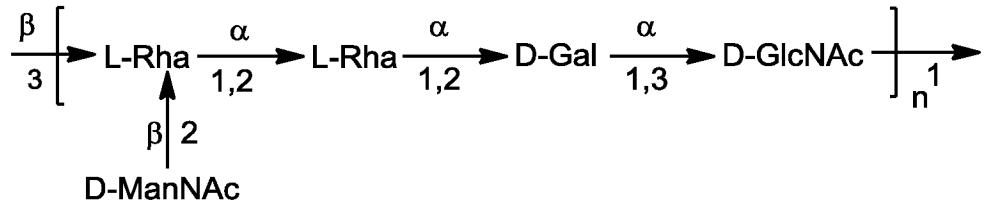
или O1A':



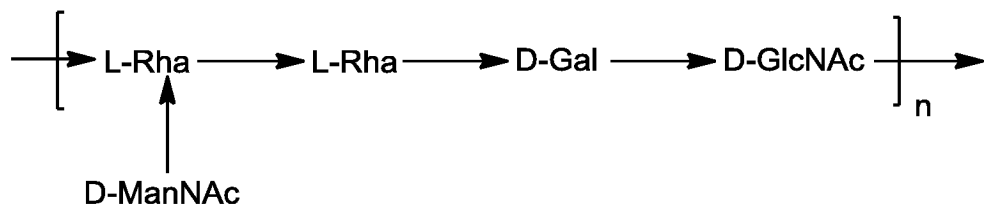
В другом конкретном воплощении указанный O1-антиген представляет собой O1B, например указанный антиген имеет формулу O1B:



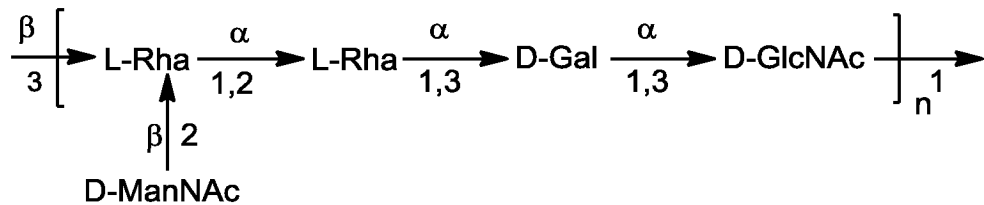
или O1B':



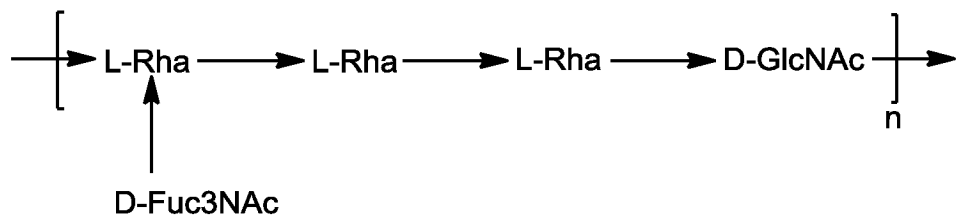
В другом конкретном воплощении указанный O1-антиген представляет собой O1C, например указанный антиген имеет формулу O1C:



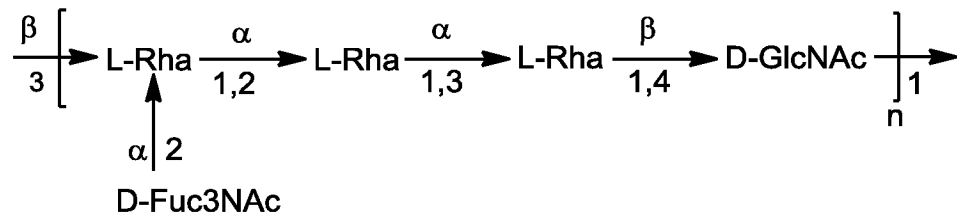
или O1C':



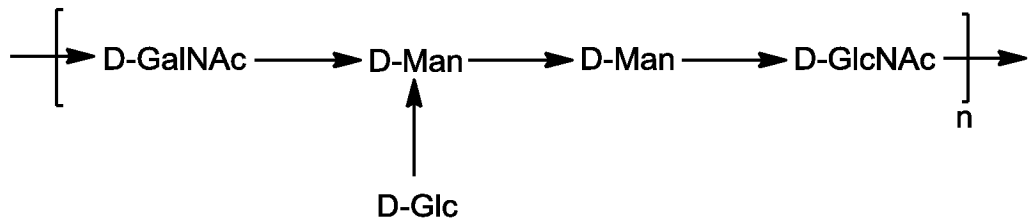
В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложен биоконъюгат, содержащий белок-носитель (например EPA), связанный с антигеном O2. В конкретном воплощении указанный антиген O2 имеет формулу O2:



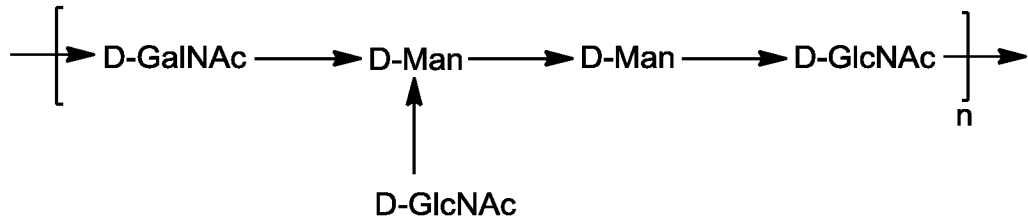
или O2'



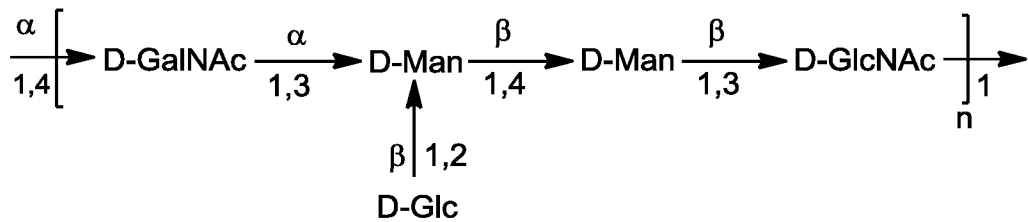
В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложен биоконъюгат, содержащий белок-носитель (например ЕРА), связанный с антигеном О6. В конкретном воплощении указанный антиген О6 имеет формулу О6Glc:



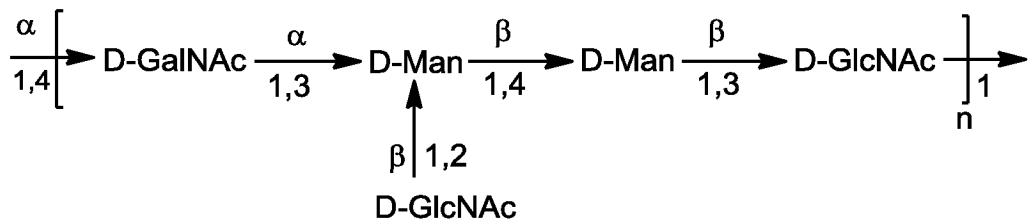
О6GlcNAc:



О6Glc':



или О6GlcNAc':



Биоконъюгаты, описанные в данном документе, могут быть очищены любым способом очистки белка, известным в данной области техники, например посредством хроматографии (например ионообменной,

анионообменной, аффинной и гель-фильтрационной хроматографии), центрифугирования, дифференциальной растворимости или посредством любого другого стандартного метода очистки белков. См., например, Saraswat et al., 2013, Biomed. Res. Int. ID#312709 (p. 1-18); см. также способы, описанные в WO 2009/104074. Кроме того, биоконъюгаты могут быть слиты с гетерологичными полипептидными последовательностями, описанными в данном документе или иным образом, известным в данной области, для облегчения очистки. Фактические условия, используемые для очистки конкретного биоконъюгата, зависят, в частности, от стратегии синтеза (например синтетического получения или рекомбинантного получения), а также от таких факторов, как суммарный заряд, гидрофобность и/или гидрофильность биоконъюгата, и понятны специалистам в данной области техники.

5.5 Антитела против O25B

Антиген O25B, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), и/или биоконъюгаты, содержащие антиген O25B, описанные в данном документе (см. Раздел 5.4), могут быть использованы для индукции нейтрализующих антител против ExPEC. В конкретном воплощении антиген O25B, описанный в данном документе, и/или биоконъюгаты, содержащие антиген O25B, описанные в данном документе, можно вводить субъекту (например человеку, мыши, кролику, крысе, морской свинке и т.д.) для индукции иммунного ответа, который включает продуцирование антител. Такие антитела могут быть выделены с использованием методов, известных специалисту в данной области (например иммуноаффинной хроматографии, центрифугирования, осаждения и т.п.).

Кроме того, антиген O25B, описанный в данном документе, может быть использован для скрининга антител из библиотек антител. Например, выделенный O25B может быть иммобилизован на твердом носителе (например силикагеле, смоле, дериватизированной пластмассовой пленке, стеклянном шарике, хлопке, пластмассовом шарике, шарике из полистирола, геле оксида алюминия или полисахариде, магнитном шарике) и подвергнут скринингу на связывание с антителами. Альтернативно, антитела для скрининга могут быть иммобилизованы на твердом носителе и подвергнуты скринингу на связывание с O25B. Любой скрининговый анализ, такой как пэннинг-анализ, ELISA ((иммуноферментный твердофазный анализ), поверхностный плазмонный

резонанс или другой скрининговый анализ антител, известный в данной области техники, может быть использован для скрининга антител, которые связываются с O25B. Библиотека антител для скрининга может быть имеющейся в продаже библиотекой, *in vitro* полученной библиотекой или библиотекой, полученной посредством идентификации и клонирования выделенных антител из субъекта, инфицированного ЕХРЕС. Библиотеки антител могут быть получены в соответствии со способами, известными в данной области. В конкретном воплощении библиотека антител получена посредством клонирования антител и использования их в библиотеках фагового дисплея или библиотеке фагмидного дисплея.

Антитела, идентифицируемые или индуцируемые с использованием O25B и/или биоконъюгата O25B, могут включать молекулы иммуноглобулина и иммунологически активные части молекул иммуноглобулина, то есть молекулы, которые содержат антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается с O25B. Иммуноглобулиновые молекулы могут быть любого типа (например IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ and IgA₂) или субкласса иммуноглобулиновых молекул. Антитела включают, без ограничения ими, моноклональные антитела, поливалентные антитела, человеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, одноцепочечные Fvs (scFv), одноцепочечные антитела, Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, дисульфид-связанные Fvs (sdFv) и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id антитела к антителам, индуцируемым или идентифицируемым с использованием способа, описанного в данном документе) и эпитопсвязывающие фрагменты любого из вышеперечисленных. В конкретном воплощении антитело, индуцируемое или распознаваемое с использованием O25B и/или биоконъюгата O25B, представляет собой человеческое или гуманизированное моноклональное антитело.

Антитела, индуцируемые или идентифицируемые с использованием O25B и/или биоконъюгата O25B, можно использовать для определения эффективности терапии и/или развития заболевания. Любая система иммуноанализа, известная в данной области, может быть использована для этой цели, включая, без ограничения ими, конкурентные и неконкурентные

системы анализа с использованием таких способов, как радиоиммуноанализ, ELISA (твёрдофазный иммуноферментный анализ), “сэндвич”-иммуноанализ, реакции преципитации, реакции диффузной преципитации в геле, иммунодиффузные анализы, иммунорадиометрические анализы, флуоресцентные иммунологические анализы, иммуноанализы с протеином А и иммуноэлектрофоретические анализы.

Антитела, индуцируемые или идентифируемые с использованием O25B и/или биоконъюгата O25B, могут быть использованы для детекции штаммов O25B *E. coli*, например из множества штаммов *E. coli*, и/или для диагностики инфекции штаммом O25B *E. coli*.

5.6 Композиции

5.6.1 Композиции, содержащие клетки-хозяева

В одном аспекте в данном описании изобретения предложены композиции, содержащие клетки-хозяева, описанные в данном документе. Такие композиции могут быть использованы в способах получения биоконъюгатов, описанных в данном документе (см. Раздел 5.4), например композиции можно культивировать в условиях, подходящих для получения белков. Затем биоконъюгаты могут быть выделены из указанных композиций с использованием способов, известных в данной области техники.

Композиции, содержащие клетки-хозяева, предложенные в данном описании изобретения, могут содержать дополнительные компоненты, подходящие для поддержания и выживания клеток-хозяев, описанных в данном документе, и могут дополнительно содержать дополнительные компоненты, необходимые или полезные для получения белков клетками-хозяевами, например индукторы индуцибельных промоторов, такие как арабиноза, IPTG (изопрропилтиогалактозид).

5.6.2 Композиции, содержащие антигены и/или биоконъюгаты

В другом аспекте в данном описании изобретения предложены композиции (например фармацевтические композиции), содержащие один или более O-антигенов *E. coli*, описанных в данном документе (см. Раздел 5.2), и композиции (например фармацевтические композиции), содержащие один или более биоконъюгатов, описанных в данном документе (см. Раздел 5.4). В конкретном воплощении композиция, предложенная в данном описании

изобретения, содержит один или более О-антигенов *E. coli*, описанных в данном документе (см. Раздел 5.2). В другом конкретном воплощении композиция, предложенная в данном описании изобретения, содержит один или более биоконъюгатов, описанных в данном документе (см. Раздел 5.4). В другом конкретном воплощении композиция, предложенная в данном описании изобретения, содержит один или более О-антигенов *E. coli*, описанных в данном документе (см. Раздел 5.2), и один или более биоконъюгатов, описанных в данном документе (см. Раздел 5.4). Композиции, описанные в данном документе, полезны для лечения и предупреждения инфекции субъектов (например людей) внекишечными патогенными *E. coli* (ExPEC). См. Раздел 5.7.

В некоторых воплощениях в дополнение к содержащемуся О-антигену *E. coli*, описанному в данном документе (см. Раздел 5.2), и/или биоконъюгату, описанному в данном документе (см. Раздел 5.4), композиции (например фармацевтические композиции), описанные в данном документе, содержат фармацевтически приемлемый носитель. При использовании в данном описании изобретения термин “фармацевтически приемлемый” означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или зарегистрированный в фармакопее США или в других общепризнанных фармакопеях для применения у животных и более конкретно для применения у людей. Термин “носитель” при использовании в данном описании изобретения в контексте фармацевтически приемлемого носителя, относится к разбавителю, адъюванту, эксципиенту или наполнителю, с которым вводят фармацевтическую композицию. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, в частности, для инъекционных растворов. Подходящие эксципиенты включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, глицеролмоностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и т.п.. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в “Remington's Pharmaceutical Sciences” E.W. Martin.

В конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена композиция, содержащая белок-носитель (например белок-носитель,

описанный в Разделе 5.3.2), связанный с антигеном, описанным в данном документе, например с О-антигеном ExPEC, описанный в Разделе 5.2.

В другом конкретном воплощении композиция, предложенная в данном описании изобретения, содержит белок-носитель (например белок-носитель, описанный в Разделе 5.3.2, например ЕРА или МВР), связанный с O25B *E. coli* (см. Раздел 5.2).

В другом конкретном воплощении композиция, предложенная в данном описании изобретения, содержит белок-носитель (например белок-носитель, описанный в Разделе 5.3.2, например ЕРА или МВР), связанный с O25A *E. coli* (см. Раздел 5.2).

В другом конкретном воплощении композиция, предложенная в данном описании изобретения, содержит белок-носитель (например белок-носитель, описанный в Разделе 5.3.2, например ЕРА или МВР), связанный с O1 *E. coli* (см. Раздел 5.2). В другом конкретном воплощении указанная макромолекула O1 представляет собой O1A. В другом конкретном воплощении указанная макромолекула O1 представляет собой O1B. В другом конкретном воплощении указанная макромолекула O1 представляет собой O1C.

В другом конкретном воплощении композиция, предложенная в данном описании изобретения, содержит белок-носитель (например белок-носитель, описанный в Разделе 5.3.2, например ЕРА или МВР), связанный с O2 *E. coli* (см. Раздел 5.2).

В другом конкретном воплощении композиция, предложенная в данном описании изобретения, содержит белок-носитель (например белок-носитель, описанный в Разделе 5.3.2, например ЕРА или МВР), связанный с O6 *E. coli* (см. Раздел 5.2). В конкретном воплощении, указанная макромолекула O6 представляет собой макромолекулу O6, содержащую разветвленный Glc-моносахарид.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена композиция, например фармацевтическая композиция, содержащая (1) макромолекулу O25 (например O25A или O25B), или биоконъюгат, содержащий O25 (например O25A или O25B), и (2) макромолекулу O1 или биоконъюгат, содержащий O1. См. Раздел 5.2. В конкретном воплощении указанная макромолекула O25 представляет собой

макромолекулу O25B. В другом конкретном воплощении указанная макромолекула O1 представляет собой O1A. В другом конкретном воплощении указанная макромолекула O1 представляет собой O1B. В другом конкретном воплощении указанная макромолекула O1 представляет собой O1C.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена композиция, например фармацевтическая композиция, содержащая (1) макромолекулу O25 (например O25A или O25B) или биоконъюгат, содержащий O25 (например O25A или O25B), и (2) макромолекулу O2 или биоконъюгат, содержащий O2. См. Разделы 5.2 и 5.4. В конкретном воплощении указанная макромолекула O25 представляет собой макромолекулу O25B.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена композиция, например фармацевтическая композиция, содержащая (1) макромолекулу O25 (например O25A или O25B) или биоконъюгат, содержащий O25 (например O25A или O25B), и (2) макромолекулу O6 (например макромолекулу O6, содержащую разветвленный Glc-моносахарид или разветвленный GlcNAc-моносахарид), или биоконъюгат, содержащий O6. См. Разделы 5.2 и 5.4. В конкретном воплощении указанная макромолекула O25 представляет собой макромолекулу O25B. В другом конкретном воплощении указанная макромолекула O6 представляет собой макромолекулу O6, содержащую разветвленный Glc-моносахарид.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена композиция, например фармацевтическая композиция, содержащая O25B *E. coli* (см. Раздел 5.2), или биоконъюгат, содержащий O25 (см. Раздел 5.4), и по меньшей мере один из следующих: (1) O1 *E. coli* или биоконъюгат, содержащий O1 (см. Разделы 5.2 и 5.4); (2) O2 *E. coli* или биоконъюгат, содержащий O2 (см. Разделы 5.2 и 5.4); и/или (3) O6 *E. coli* или биоконъюгат, содержащий O6 (см. Разделы 5.2 и 5.4). В другом конкретном воплощении указанный O1 представляет собой O1A. В другом конкретном воплощении указанный O1 представляет собой O1B. В другом конкретном воплощении указанный O1 представляет собой O1C. В другом конкретном воплощении указанный O6 представляет собой O6, содержащий разветвленный Glc-моносахарид.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена композиция, например фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере два из следующих: (1) макромолекулу O25 (например O25A или O25B) или биоконъюгат, содержащий O25 (например O25A или O25B); (2) макромолекулу O1 или биоконъюгат, содержащий O1; (3) макромолекулу O2 или биоконъюгат, содержащий O2; и/или (4) макромолекулу O6 (например макромолекулу O6, содержащую разветвленный Glc-моносахарид или разветвленный GlcNAc-моносахарид), или биоконъюгат, содержащий O6. В конкретном воплощении указанная макромолекула O25 представляет собой макромолекулу O25B. В другом конкретном воплощении указанная макромолекула O1 представляет собой O1A. В другом конкретном воплощении указанная макромолекула O1 представляет собой O1B. В другом конкретном воплощении указанная макромолекула O1 представляет собой O1C. В другом конкретном воплощении указанная макромолекула O6 представляет собой макромолекулу O6, содержащую разветвленный Glc-моносахарид.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена композиция, например фармацевтическая композиция, содержащая биоконъюгат, содержащий O25B *E. coli*, и биоконъюгат, содержащий O1A *E. coli*. Такие биоконъюгаты описаны в Разделе 5.4.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена композиция, например фармацевтическая композиция, содержащая биоконъюгат, содержащий O25B *E. coli*, и биоконъюгат, содержащий O1B *E. coli*. Такие биоконъюгаты описаны в Разделе 5.4.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена композиция, например фармацевтическая композиция, содержащая биоконъюгат, содержащий O25B *E. coli*, и биоконъюгат, содержащий O1C *E. coli*. Такие биоконъюгаты описаны в Разделе 5.4.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена композиция, например фармацевтическая композиция, содержащая биоконъюгат, содержащий O25B *E. coli*, и биоконъюгат, содержащий O2 *E. coli*. Такие биоконъюгаты описаны в Разделе 5.4.

В другом конкретном воплощении в данном описании изобретения предложена композиция, например фармацевтическая композиция, содержащая биоконъюгат, содержащий O25B *E. coli*, и биоконъюгат, содержащий O6 *E. coli*. Такие биоконъюгаты описаны в Разделе 5.4.

В другом конкретном воплощении композиция, предложенная в данном описании изобретения, содержит белок-носитель (например белок-носитель, описанный в Разделе 5.3.2, например ЕРА или МВР), связанный с O25B *E. coli* (см. Раздел 5.2), (2) белок-носитель (например белок-носитель, описанный в Разделе 5.3.2, например ЕРА или МВР), связанный с О-антигеном *E. coli* серотипа O1, например O1A (см. Раздел 5.2), (3) белок-носитель (например белок-носитель, описанный в Разделе 5.1.2, например ЕРА или МВР), связанный с О-антигеном *E. coli* серотипа O2 (см. Раздел 5.2) и (4) белок-носитель (например белок-носитель, описанный в Разделе 5.3.2, например ЕРА или МВР), связанный с О-антигеном *E. coli* серотипа O6 (см. Раздел 5.2).

В некоторых воплощениях вышеуказанные композиции содержат белок-носитель (например белок-носитель, описанный в Разделе 5.3.2, например ЕРА или МВР), связанный с О-антигеном *E. coli* серотипа, не являющегося O1, O2, O6 или O25. Другие применимые серотипы *E. coli* описаны, например, в Примере 1 и в Таблице 1 ниже.

В другом конкретном воплощении композиция, предложенная в данном описании изобретения, содержит макромолекулу O25 (например O25A или O25B).

В другом конкретном воплощении композиция, предложенная в данном описании изобретения, содержит макромолекулу O1 (например O1A, O1B или O1C).

В другом конкретном воплощении композиция, предложенная в данном описании изобретения, содержит макромолекулу O2.

В другом конкретном воплощении композиция, предложенная в данном описании изобретения, содержит макромолекулу O6 (например макромолекулу O6, содержащую разветвленный Glc-моносахарид или разветвленный GlcNAc-моносахарид).

В другом конкретном воплощении композиция, предложенная в данном описании изобретения, содержит макромолекулу O25 (например O25A или

O25B), макромолекулу O1, макромолекулу O2 и макромолекулу O6 (например макромолекулу O6, содержащую разветвленный Glc-моносахарид или разветвленный GlcNAc-моносахарид). В конкретном воплощении указанная макромолекула O25 представляет собой макромолекулу O25B. В другом конкретном воплощении указанная макромолекула O1 представляет собой O1A. В другом конкретном воплощении указанная макромолекула O6 представляет собой макромолекулу O6, содержащую разветвленный Glc-моносахарид.

Композиции, предложенные в данном описании изобретения, могут быть использованы для индукции иммунного ответа у хозяина, которому вводят композицию, то есть они являются иммуногенными. Таким образом, композиции, описанные в данном документе, можно использовать в качестве вакцин против инфекции ExPEC или можно использовать в лечении инфекции ExPEC и можно, соответственно, приготовить в виде фармацевтических композиций. См. Раздел 5.7.

Композиции, содержащие биоконъюгаты и/или макромолекулы, описанные в данном документе, могут содержать любые дополнительные компоненты, подходящие для применения при фармацевтическом введении. В конкретных воплощениях композиции, описанные в данном документе, являются моновалентными композициями. В других воплощениях композиции, описанные в данном документе, являются мультивалентными композициями, например бивалентными, трехвалентными и тетравалентными композициями. Например, мультивалентная композиция содержит более одного биоконъюгата или O-антигена *E. coli*, описанных в данном документе. См. описание O-антигенов *E. coli* и биоконъюгатов в разделах 5.2 и 5.4, соответственно. В конкретном воплощении композиция, описанная в данном документе, представляет собой тетравалентную композицию, содержащую макромолекулу или биоконъюгат, где указанные валентности обусловлены O-антигенами *E. coli* серотипов/субсеротипов O25B, O1A, O6 и O2.

В некоторых воплощениях композиции, описанные в данном документе, дополнительно содержат консервант, например производное ртути тимеросал. В конкретном воплощении фармацевтические композиции, описанные в данном документе, содержат от 0,001% до 0,01% тимеросала. В других воплощениях

фармацевтические композиции, описанные в данном документе, не содержат консервант.

В некоторых воплощениях композиции, описанные в данном документе (например иммуногенные композиции), содержат или вводят в комбинации с адъювантом. Адъювант для введения в комбинации с композицией, описанной в данном документе, можно вводить до введения, одновременно с введением или после введения указанной композиции. В некоторых воплощениях термин “адъювант” относится к компоненту, который при введении в комбинации с композицией, описанной в данном документе, или как часть этой композиции дополняет, усиливает и/или поддерживает иммунный ответ на биоконъюгат, но при введении одного этого компонента, он не индуцирует иммунный ответ на биоконъюгат. В некоторых воплощениях адъювант вызывает иммунный ответ на полипептид биоконъюгата и не вызывает аллергии или других побочных реакций. Адъюванты могут усилить иммунный ответ посредством нескольких механизмов, включающих, например, рекрутмент лимфоцитов, стимуляцию В-и/или Т-клеток и стимуляцию макрофагов.

Конкретные примеры адъювантов включают, без ограничения ими, соли алюминия (квасцы) (такие как гидрат окиси алюминия, фосфат алюминия и сульфат алюминия), 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А (MPL) (см. патент Великобритании GB2220211), MF59 (Novartis), AS03 (GlaxoSmithKline), AS04 (GlaxoSmithKline), полисорбат 80 (Tween 80; ICL Americas, Inc.), имидазопиридиновые соединения (см. международную заявку PCT/US2007/064857, опубликованную как международная публикация WO2007/109812), имидазохиноксалиновые соединения (см. международную заявку PCT/US2007/064858, опубликованную как международная публикация WO2007/109813) и сапонины, такие как QS21 (см. Kensil *et al.*, in *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); патент US 5057540). В некоторых воплощениях адъювант представляет собой адъювант Фрейнда (полный или неполный). Другие адъюванты представляют собой эмульсии масло-в-воде (такие как сквален или арахисовое масло), возможно в комбинации с иммуностимуляторами, такими как монофосфориллипид А (см. Stoute *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)). Другой адъювант представляет собой CpG (Bioworld Today, Nov. 15, 1998).

В некоторых воплощениях композиции, описанные в данном документе, готовят в виде препарата, подходящего для предполагаемого пути введения субъекту. Например, композиции, описанные в данном документе, могут быть приготовлены в виде препарата, подходящего для подкожного, парентерального, перорального, внутрикожного, трансдермального, колоректального, внутрибрюшинного и ректального введения. В конкретном воплощении фармацевтическая композиция может быть приготовлена в виде препарата для внутривенного, перорального, внутрибрюшинного, интраназального, внутритрахеального, подкожного, внутримышечного, местного, внутрикожного, транскожного или легочного введения.

В некоторых воплощениях композиции, описанные в данном документе, дополнительно содержат один или более буферов, например фосфатный буфер и сахарозо-фосфатно-глутаматный буфер. В других воплощениях композиции, описанные в данном документе, не содержат буфер.

В некоторых воплощениях композиции, описанные в данном документе, дополнительно содержат одну или более солей, например хлорид натрия, хлорид кальция, фосфат натрия, мононатрия глутамат, и соли алюминия (например гидрат окиси алюминия, фосфат алюминия, квасцы (алюмосульфат калия) или смесь таких солей алюминия). В других воплощениях композиции, описанные в данном документе, не содержат солей.

Композиции, описанные в данном документе, могут быть включены в контейнер, пакет или дозатор вместе с инструкциями по введению.

Композиции, описанные в данном документе, можно хранить перед использованием, например, композиции можно хранить замороженными (например примерно при -20°C или примерно при -70°C); хранить в охлажденном состоянии (например примерно при 4°C); или хранить при комнатной температуре.

5.7 Профилактические и терапевтические применения

В данном описании изобретения предложены способы лечения и предупреждения инфекции внекишечной *E. coli* (ExPEC) субъекта, включающие введение субъекту O-антигена *E. coli*, описанного в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгата, описанного в данном документе (см. Раздел 5.4) или композиции, описанной в данном документе (см. Раздел 5.6.2). В

конкретном воплощении композиции, описанные в данном документе (см. Раздел 5.6.2) используют для предупреждения ЕхРЕС-инфекции субъекта (например людей), то есть композиции, описанные в данном документе, используют для вакцинации субъекта против ЕхРЕС-инфекции. В другом конкретном воплощении композиции, описанные в данном документе (см. Раздел 5.6.2), используют в лечении субъекта, который инфицирован ЕхРЕС.

В данном описании изобретения также предложены способы индукции иммунного ответа у субъекта против ЕхРЕС, включающие введение субъекту О-антигена *E. coli*, описанного в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгата, описанного в данном документе (см. Раздел 5.4), или композиции, описанной в данном документе (см. Раздел 5.6.2). В одном воплощении указанный субъект инфицирован ЕхРЕС во время введения. В другом воплощении указанный субъект не инфицирован ЕхРЕС во время введения.

В данном описании изобретения также предложены способы индукции продуцирования опсонофагоцитирующих антител против ЕхРЕС у субъекта, включающие введение субъекту О-антигена *E. coli*, описанного в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгата, описанного в данном документе (см. Раздел 5.4), или композиции, описанной в данном документе (см. Раздел 5.6.2). В одном воплощении указанный субъект инфицирован ЕхРЕС во время введения. В другом воплощении указанный субъект не инфицирован ЕхРЕС во время введения.

В конкретном воплощении в данном описании изобретения предложен способ предупреждения инфекции *E. coli* (например ЕхРЕС) субъекта, где указанный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества композиции, описанной в Разделе 5.6.2. Способы предупреждения инфицирования ЕхРЕС субъекта, предложенные в данном описании изобретения, приводят к индукции иммунного ответа у субъекта, и включают введение субъекту композиции, описанной в Разделе 5.6.2. Специалисту в данной области понятно, что способы индукции иммунного ответа у субъекта, описанного в данном документе, приводят к вакцинации субъекта против инфекции штаммами ЕхРЕС, О-антигены которых присутствуют в композиции(ях).

В конкретном воплощении в данном описании изобретения предложен способ лечения инфекции *E. coli* (например ExPEC) субъекта, где указанный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества композиции, описанной в Разделе 5.6.2.

В некоторых воплощениях иммунный ответ, индуцированный О-антигеном *E. coli*, описанным в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгатом, описанным в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицией, описанной в данном документе (см. Раздел 5.6.2), является эффективным для предупреждения и/или лечения инфекции ExPEC, вызванной любым серотипом, субсеротипом или штаммом ExPEC. В некоторых воплощениях иммунный ответ, индуцированный О-антигеном *E. coli*, описанным в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгатом, описанным в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицией, описанной в данном документе (см. Раздел 5.6.2), является более эффективным для предупреждения и/или лечения инфекции ExPEC, чем один серотип ExPEC.

В конкретном воплощении иммунный ответ, индуцированный О-антигеном *E. coli*, описанным в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгатом, описанным в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицией, описанной в данном документе (см. Раздел 5.6.2), является эффективным для предупреждения и/или лечения инфекции, вызванной *E. coli* серотипа O25. В конкретном воплощении указанный серотип O25 представляет собой O25B. В конкретном воплощении указанный серотип O25 представляет собой O25A.

В конкретном воплощении иммунный ответ, индуцированный О-антигеном *E. coli*, описанным в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгатом, описанным в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицией, описанной в данном документе (см. Раздел 5.6.2), является эффективным для предупреждения и/или лечения инфекции, вызванной *E. coli* серотипа O1. В конкретном воплощении указанный серотип O1 представляет собой O1A. В другом конкретном воплощении, указанный серотип O1 представляет собой O1B. В другом конкретном воплощении, указанный серотип O1 представляет собой O1C.

В конкретном воплощении иммунный ответ, индуцированный О-антигеном *E. coli*, описанным в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгатом, описанным в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицией, описанной в данном документе (см. Раздел 5.6.2), является эффективным для предупреждения и/или лечения инфекции, вызванной *E. coli* серотипа O2.

В конкретном воплощении иммунный ответ, индуцированный О-антигеном *E. coli*, описанным в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгатом, описанным в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицией, описанной в данном документе (см. Раздел 5.6.2), является эффективным для предупреждения и/или лечения инфекции, вызванной *E. coli* серотипа O6.

В конкретном воплощении иммунный ответ, индуцированный О-антигеном *E. coli*, описанным в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгатом, описанным в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицией, описанной в данном документе (см. Раздел 5.6.2), является эффективным для предупреждения и/или лечения инфекции, вызванной двумя или более из следующих серотипов *E. coli*: O25 (например O25B и O25A), O1 (например O1A, O1B и O1C), O2 и/или O6.

В конкретном воплощении иммунный ответ, индуцированный О-антигеном *E. coli*, описанным в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгатом, описанным в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицией, описанной в данном документе (см. Раздел 5.6.2), является эффективным для предупреждения и/или лечения инфекции, вызванной каждым из следующих серотипов *E. coli*: O25 (например O25B и O25A), O1 (например O1A, O1B и O1C), O2 и O6.

Для того чтобы лечить субъекта, имеющего ExPEC-инфекцию, или иммунизировать субъекта против ExPEC-инфекции, субъекту можно вводить одну композицию, описанную в данном документе, где указанная композиция содержит один, два, три, четыре или более антигенов *E. coli*, описанных в данном документе. См. Раздел 5.2. Альтернативно, чтобы лечить субъекта, имеющего ExPEC-инфекцию или иммунизировать субъекта против ExPEC-инфекции, субъекту можно вводить несколько биоконъюгатов, описанных в

данном документе, например субъекту можно вводить два, три, четыре или более биоконъюгатов, описанных в Разделе 5.4. Альтернативно, для лечения субъекта с ExPEC-инфекцией или иммунизации субъекта против ExPEC-инфекции, субъекту можно вводить несколько композиций, описанных в данном документе, например субъекту можно вводить две, три, четыре или более композиций, описанных в Разделе 5.6.2.

В некоторых воплощениях иммунный ответ, индуцированный у субъекта после введения O-антигена *E. coli*, описанного в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгата, описанного в данном документе (см. Раздел 5.4), или композиции, описанной в данном документе (см. Раздел 5.6.2), является эффективным для уменьшения симптомов, вызванных ExPEC-инфекцией. Симптомы ExPEC-инфекции могут варьироваться в зависимости от природы инфекции и могут включать, без ограничения ими: дизурию, повышение частоты мочеиспускания или неотложный позыв, пиурию, гематурию, боль в спине, боль при мочеиспускании, лихорадку, озноб и/или тошноту (например у субъектов с инфекциями мочевых путей, вызванными ExPEC); высокую температуру, головную боль, ригидность затылочных мышц, тошноту, рвоту, судороги, сонливость и/или светочувствительность (например у субъектов с менингитом, вызванным ExPEC); лихорадку, увеличение частоты сердечных сокращений, увеличение частоты дыхания, снижение диуреза, снижение количества тромбоцитов, боль в животе, затруднение дыхания и/или нарушение функции сердца (например у субъектов с сепсисом, вызванным ExPEC).

В некоторых воплощениях иммунный ответ, индуцированный у субъекта после введения O-антигена *E. coli*, описанного в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгата, описанного в данном документе (см. Раздел 5.4), или композиции, описанной в данном документе (см. Раздел 5.6.2), является эффективным для снижения вероятности госпитализации субъекта, страдающего от ExPEC-инфекции. В некоторых воплощениях иммунный ответ, индуцируемый у субъекта после введения O-антигена *E. coli*, описанного в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгата, описанного в данном документе (см. Раздел 5.4), или композиции, описанной в данном документе

(см. Раздел 5.6.2), является эффективным для сокращения продолжительности госпитализации субъекта, страдающего от ЕхРЕС-инфекции.

В другом аспекте в данном описании изобретения предложены способы предупреждения и/или лечения ЕхРЕС-инфекции у субъекта, вызванной *E. coli* серотипа O25В, путем введения антитела, описанного в данном документе, то есть анти-O25В антитела, описанного в данном документе. В конкретных воплощениях нейтрализующее антитело представляет собой моноклональное антитело.

5.7.1 Комбинированные терапевтические средства

В некоторых воплощениях О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанная в данном документе (см. Раздел 5.6.2), вводят субъекту в комбинации с одним или более другими терапевтическими средствами (например антибактериальными или иммуномодулирующими терапевтическими средствами). Одно или более других терапевтических средства могут быть полезными в лечении или предупреждении ЕхРЕС-инфекции или могут улучшить симптом или состояние, связанное с ЕхРЕС-инфекцией. В некоторых воплощениях один или более других терапевтических средств представляют собой обезболивающие или жаропонижающие терапевтические средства. В некоторых воплощениях терапевтические средства вводят с интервалом менее 5 минут, с интервалом менее 30 минут, с интервалом менее 1 часа, с интервалом примерно 1 час, с интервалом от примерно 1 до примерно 2 часов, с интервалом от примерно 2 часов до примерно 3 часов, с интервалом от примерно 3 часов до примерно 4 часов, с интервалом от примерно 4 часов до примерно 5 часов, с интервалом от примерно 5 часов до примерно 6 часов, с интервалом от примерно 6 часов до примерно 7 часов, с интервалом примерно 7 часов до примерно 8 часов, с интервалом примерно 8 часов до примерно 9 часов, с интервалом примерно 9 часов до примерно 10 часов, с интервалом от примерно 10 часов до примерно 11 часов, с интервалом от примерно 11 часов до примерно 12 часов, с интервалом от примерно 12 часов до 18 часов, с интервалом от 18 часов до 24 часов, с интервалом от 24 часов до 36 часов, с интервалом от 36 часов до 48 часов, с интервалом от 48 часов до 52 часов, с интервалом от 52 часов до 60

часов, с интервалом от 60 часов до 72 часов, с интервалом от 72 часов до 84 часов, с интервалом от 84 часов до 96 часов или с интервалом от 96 часов до 120 часов.

Любые антибактериальные агенты, известные специалистам в данной области, могут быть использованы в комбинации с О-антигеном *E. coli*, описанным в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгатом, описанным в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицией, описанной в данном документе (см. Раздел 5.6.2). Неограничивающие примеры антибактериальных агентов включают Амикацин, Амоксициллин, Амоксициллин-клавулановая кислота, Амфотерицин-В, Ампициллин, Ампициллин-сульбактам, Апрамицин, Азитромицин, Азтреонам, Бацитрацин, Бензилпенициллин, Каспофунгин, Цефаклор, Цефадроксил, Цефалексин, Цефалотин, Цефазолин, Цефдинир, Цефепим, Цефиксим, Цефменоксим, Цефоперазон, Цефоперазон-сульбактам, Цефотаксим, Цефокситин, Цефпиром, Цефподоксим, Цефподоксим-клавулановая кислота, Цефподоксим-сульбактам, Цефпрозил, Цефкином, Цефтазидим, Цефтибутен, Цефтиофур, Цефтобипрол, Цефтриаксон, Цефуроксим, Хлорамфеникол, Флорфеникол, Ципрофлоксацин, Кларитромицин, Клинафлоксацин, Клиндамицин, Клоксациллин, Колистин, Котримоксазол (Триметоприм/сульфаметоксазол), Далбаванцин, Дальфопристин/Хинупристин, Даптомицин, Дибекацин, Диклоксациллин, Дорипенем, Доксициклин, Энрофлоксацин, Эртапенем, Эритромицин, Флуклоксациллин, Флуконазол, Флуцитозин, Фосфомицин, фусидовая кислота, Гареноксацин, Гатифлоксацин, Гемифлоксацин, Гентамицин, Имипенем, Итраконазол, Канамицин, Кетоконазол, Левофлоксацин, Линкомицин, Линезолид, Лоракарбеф, Мециллинам (амдиноциллин), Меропенем, Метронидазол, Мезлоциллин, Мезлоциллин-сульбактам, Миноциклин, Моксифлоксацин, Мупироцин, Налидиксовая кислота, Неомицин, Нетилмицин, Нитрофурантоин, Норфлоксацин, Офлоксацин, Оксациллин, Пефлоксацин, Пенициллин V, Пиперациллин, Пиперациллин-сульбактам, Пиперациллин-тазобактам, Рифампицин, Рокситромицин, Спарфлоксацин, Спектиномицин, Спирамицин, Стрептомицин, Сульбактам, Сульфаметоксазол, Тейкопланин, Телаванцин, Телитромицин, Темоциллин, Тетрациклин, Тикарциллин,

Тикарциллин-клавулановая кислота, Тигециклин, Тобрамицин, Триметоприм, Тровафлоксацин, Тилозин, Ванкомицин, Виргиниамицин и Вориконазол.

В некоторых воплощениях комбинированная терапия включает введение двух или более О-антигенов *E. coli*, описанных в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгатов, описанных в данном документе (см. Раздел 5.4), и/или композиций, описанных в данном документе (см. Раздел 5.6.2).

5.7.2 Группы пациентов

В некоторых воплощениях О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), вводят "наивному" субъекту, то есть субъекту, который не имеет ExPEC-инфекции или не имел ранее ExPEC-инфекции. В одном воплощении О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), вводят "наивному" субъекту, у которого есть риск инфицирования ExPEC.

В некоторых воплощениях О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), вводят субъекту, у которого диагностирована ExPEC-инфекция. В некоторых воплощениях О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), вводят субъекту, инфицированному ExPEC, до появления симптомов или до того, как симптомы становятся серьезными (например до того, как пациенту потребуется госпитализация).

В некоторых воплощениях О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), вводят субъекту, у которого диагностирована UPEC-инфекция. В некоторых воплощениях О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), вводят

субъекту, страдающему от рецидивов инфекции мочевыводящих путей. В некоторых воплощениях О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), вводят субъекту, страдающему от рецидивов инфекции мочевыводящих путей, но здоровому в момент лечения. В некоторых воплощениях О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), вводят субъекту, имеющему бактериемию или сепсис или рискующему их приобрести.

В некоторых воплощениях субъект, которому вводят О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), представляет собой животное. В некоторых воплощениях животное представляет собой птицу. В некоторых воплощениях животное представляет собой собаку. В некоторых воплощениях животное представляет собой кошку. В некоторых воплощениях животное представляет собой лошадь. В некоторых воплощениях животное представляет собой корову. В некоторых воплощениях животное представляет собой млекопитающее, например лошадь, свинью, мышь или примата. В конкретном воплощении субъект представляет собой человека.

В некоторых воплощениях субъект, которому вводят О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), представляет собой взрослого человека. В некоторых воплощениях субъект, которому вводят О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), представляет собой взрослого человека в возрасте старше 50 лет. В некоторых воплощениях субъект, которому вводят О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), представляет собой пожилого человека.

В некоторых воплощениях субъект, которому вводят О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), представляет собой ребенка. В некоторых воплощениях субъект, которому вводят О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), представляет собой младенца. В некоторых воплощениях субъект, которому вводят О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), представляет собой недоношенного младенца. В некоторых воплощениях субъект, которому вводят О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), представляет собой ребенка преддошкольного возраста. В некоторых воплощениях субъект, которому вводят О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), не является младенцем младше 6 месяцев.

В некоторых воплощениях субъект, которому вводят О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), является беременным. В некоторых воплощениях субъект, которому вводят О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), представляет собой женщину, которая родила на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель раньше срока.

В некоторых воплощениях субъект, которому вводят О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), представляет собой субъекта с повышенным риском ЕХРЕС (например иммунокомпрометированного или

иммунодефицитного субъекта). В некоторых воплощениях субъект, которому вводят О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), представляет собой субъекта, находящегося в близком контакте с субъектом, имеющим ExPEC-инфекцию, или с повышенным риском ExPEC-инфекции.

В некоторых воплощениях субъект, которому вводят О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), является медицинским работником (например врачом или медсестрой). В некоторых воплощениях субъект, которому вводят О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), представляет собой иммунокомпрометированного (например страдающего от HIV-инфекции) или иммуносупрессированного субъекта.

В некоторых воплощениях субъект, которому вводят О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), имеет диабет. В некоторых воплощениях субъект, которому вводят О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), имеет рассеянный склероз.

В некоторых воплощениях субъект, которому вводят О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), имеют состояние, требующее использования катетера. В некоторых воплощениях субъект, которому вводят О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), имеет повреждение спинного мозга.

5.7.3 Доза и частота введения

Количество О-антигена *E. coli*, описанного в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгата, описанного в данном документе (см. Раздел 5.4), или композиции, описанной в данном документе (см. Раздел 5.6.2), которое является эффективным для лечения и/или предупреждения ExPEC-инфекции, зависит от природы заболевания и может быть определено стандартными клиническими методами. Введение О-антигена, биоконъюгата и/или композиции может быть выполнено различными путями, известными клиницисту, например подкожно, парентерально, внутривенно, внутримышечно, местно, перорально, внутрикожно, чрескожно, интраназально и т.п. В одном воплощении введение осуществляется посредством внутримышечной инъекции.

Точная доза для использования в композиции также зависит от пути введения и серьезности инфекции и должна быть определена в соответствии с оценкой лечащего врача и состоянием каждого субъекта. Например эффективные дозы также могут варьироваться в зависимости от средств введения, места введения, физиологического состояния пациента (включая возраст, массу тела, состояние здоровья), независимо от того, является пациент человеком или животным, от других введенных терапевтических средств и от того, является лечение профилактическим или терапевтическим. Лечебные дозы оптимально титруют для оптимизации безопасности и эффективности.

В некоторых воплощениях используют анализ *in vitro*, чтобы способствовать определению оптимальных диапазонов доз. См. Раздел 5.8. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых доза-ответ, полученных *in vitro* или на животных модельных аналитических системах.

В некоторых воплощениях типичные дозы вакцин на основе гликоконъюгатов (например композиций, содержащих биоконъюгаты), варьируются примерно от 0,1 мкг до 400 мкг углевода на дозу. В других воплощениях примерные дозы вакцин на основе гликоконъюгатов (например композиций, содержащих биоконъюгаты), варьируются примерно от 0,1 мкг до 4000 мкг белка(ов) на дозу. В некоторых воплощениях типичная доза вакцины на основе гликоконъюгата (например композиции, содержащей биоконъюгаты) содержит 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 или 50 мкг углевода(ов) на дозу. В некоторых воплощениях примерная доза вакцины на основе гликоконъюгата (например композиции, содержащей биоконъюгаты) содержит 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 мкг белка(ов) на дозу. В некоторых типичных воплощениях доза для введения человеку соответствует 0,5 мл, содержащим примерно 1-10, например примерно 2-6, например примерно 4 мкг полисахарида на каждый включенный гликоконъюгат.

В некоторых воплощениях О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), вводят субъекту однократно в виде единичной дозы. В некоторых воплощениях О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), вводят субъекту в виде единичной дозы, за которой следует вторая доза через 3-6 недель. В соответствии с этими воплощениями бустерные введения могут быть введены субъекту с интервалами от 6 до 12 месяцев после второго введения. В некоторых воплощениях в бустерных введениях можно использовать разные О-антигены *E. coli*, биоконъюгаты или композиции. В некоторых воплощениях введение одного и того же О-антигена *E. coli*, биоконъюгата или композиции можно повторять и эти введения могут быть разделены по меньшей мере 1 сутками, 2 сутками, 3 сутками, 5 сутками, 7 сутками, 10 сутками, 15 сутками, 30 сутками, 45 сутками, 2 месяцами, 75 сутками, 3 месяцами или по меньшей мере 6 месяцами. В некоторых воплощениях О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), вводят субъекту в виде единичной дозы один раз в год.

В некоторых воплощениях О-антиген *E. coli*, описанный в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгат, описанный в данном документе (см. Раздел 5.4), или композицию, описанную в данном документе (см. Раздел 5.6.2), вводят субъекту в виде 2, 3, 4, 5 или более доз с интервалом 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель или 6 недель. В некоторых воплощениях 2, 3, 4, 5

или более доз О-антигена *E. coli*, описанного в данном документе (см. Раздел 5.2), биоконъюгата, описанного в данном документе (см. Раздел 5.4), или композиции, описанной в данном документе (см. Раздел 5.6.2), вводят субъекту с интервалом 2, 3, 4, 5 или 6 недель в дозе от 0,1 мкг до 0,5 мг, от 0,1 мкг до 0,4 мг, от 0,1 мкг до 0,3 мг, от 0,1 мкг до 0,2 мг или от 0,1 мкг до 0,1 мг углеводного содержимого. В некоторых воплощениях введенные О-антиген *E. coli*, биоконъюгат или композицию каждый раз являются одними и теми же. В некоторых воплощениях введенные О-антиген *E. coli*, биоконъюгат или композиция каждый раз являются разными.

Для пассивной иммунизации антителом (например анти-O25В антителом) доза может варьироваться примерно от 0,0001 до 100 мг антитела на кг массы тела или от 0,01 до 5 мг антитела на кг массы тела. Например, доза может составлять 1 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или находиться в диапазоне 1-10 мг/кг или, другими словами, 70 мг или 700 мг или в диапазоне 70-700 мг, соответственно, для пациента с массой тела 70 кг. Типичный режим лечения включает введение один раз каждые две недели, или один раз в месяц, один раз каждые 3-6 месяца в течение одного года или нескольких лет или с интервалами в несколько лет. Интервалы могут быть неодинаковыми и изменяться в зависимости от уровня антитела в крови пациента.

5.8 Анализы

Анализ для определения способности биоконъюгатов индуцировать иммунный ответ

Способность биоконъюгатов/композиций, описанных в данном документе, индуцировать иммунный ответ у субъекта, может быть определена с использованием подхода, известного специалисту в данной области или описанного в данном документе. В некоторых воплощениях способность биоконъюгата индуцировать иммунный ответ у субъекта может быть определена путем иммунизации субъекта (например мыши) или группы субъектов биоконъюгатом, описанным в данном документе, и иммунизации дополнительного субъекта (например мыши) или группы субъектов контролем (PBS). Затем этих субъектов или группу субъектов можно провокационно инфицировать ExPEC и определить способность ExPEC вызывать заболевание (например UTI) у этих субъектов или группы субъектов. Специалистам в данной

области понятно, что если субъект или группа субъектов, иммунизированных контролем, страдает(ют) от заболевания после провокационного инфицирования ExPEC, а субъект или группа субъектов, иммунизированных биоконъюгатом(ами) или их композицией, описанной в данном документе, страдает в меньшей степени или не страдает от заболевания, тогда биоконъюгат способен индуцировать иммунный ответ у субъекта. Способность биоконъюгата(ов) или их композиции, описанных в данном документе, индуцировать образование антисыворотки, которая перекрестно реагирует с O-антигеном из ExPEC, может быть проанализирована посредством, например, иммунного анализа, такого как ELISA.

Бактериальные анализы *in vitro*

Способность биоконъюгатов, описанных в данном документе, индуцировать иммунный ответ у субъекта, можно оценить с использованием сывороточного бактерицидного теста (SBA) или опсоно-фагоцитарного киллинг-анализа (ОПК), который представляет собой общепризнанный и принятый способ, который был использован для получения одобрения вакцин на основе гликоконъюгатов. Такие анализы хорошо известны в данной области техники и, в нескольких словах, включают стадии получения и выделения антител против интересующей мишени (например O-антигена, например O25B, *E. coli*), путем введения субъекту (например мыши) соединения, которое вызывает такие антитела. Затем бактерицидную способность антител можно определить посредством, например, культивирования рассматриваемых бактерий (например *E. coli* релевантного серотипа) в присутствии указанных антител и комплемента и – в зависимости от анализа - нейтрофилов и анализа способности антител убивать и/или нейтрализовать эти бактерии, например с использованием стандартных микробиологических подходов.

5.9 НАБОРЫ

В данном описании изобретения предложен фармацевтическая упаковка или набор, содержащие один или более контейнеров, заполненных одним или более ингредиентами композиций, описанных в данном документе (см. Раздел 5.6.2), такими как один или более антигенов *E. coli* (см. Раздел 5.2) и/или биоконъюгатов (см. Раздел 5.4), предложенных в данном описании изобретения. С таким контейнером(ами) при необходимости может быть

связано уведомление в форме, предписанной правительственным учреждением, регулирующим изготовление, применение или продажу фармацевтических средств или биологических продуктов, которое отражает одобрение этим учреждением изготовления, применения или продажи для введения человеку. Наборы, включенные в данное изобретение, могут быть использованы в вышеописанных способах лечения и иммунизации субъектов.

6. ПРИМЕРЫ

МЕТОДЫ

Агглютинация

Процесс, в котором клетки или лизированную клеточную массу смешивают с антисывороткой, содержащей антитела, специфичные к полимерной структуре, например к О-антигену. Когда антисыворотка распознает клеточные структуры, образуются видимые, нерастворимые агрегаты. Этот метод обычно используют для идентификации серотипов О, К и Н. См. DebRoy, et al., (2011) Animal health research reviews/Conference of Research Workers in Animal Diseases 12, 169-185

Получение образца LPS для анализа посредством SDS PAGE

LPS грамотрицательных клеток состоит из липида А в качестве основы, модифицированного коровым олигосахаридом, обеспечивающим присоединение О-антигена. Для анализа LPS клинических изолятов, клетки выращивали в стандартной среде LB (Лурия-Бертани) при 37°C в течение 24 ч и биомассу, соответствующую 1 мл культуры, с OD600 равной 2, собирали и лизировали в 1х буфере Lämmli для образцов и инкубировали при 95°C в течение 10 минут. Экстракты затем обрабатывали в течение 1 часа при 65°C для удаления какого-либо сигнала белка с использованием 1 г/л протеиназы К. Обработанные экстракты разделяли с помощью SDS PAGE, и LPS визуализировали посредством окрашивания серебром или Вестерн-блоттинга с использованием подходящей антисыворотки.

LPS препарат для покрытия планшетов ELISA

LPS получали с использованием способа, описанного у Apicella, (2008) Methods Mol Biol 431, 3-13, и затем очищали, как описано у Perdomo and Montero, (2006) Biotecnología Aplicada 23:124-129.

2AB OPS HPLC: 'LLO-метод идентификационных отпечатков'

Этот метод используют для анализа структуры UPP-связанного OPS.

Для экстракции UPP-связанных гликанов, клетки *E. coli* промывали 0,9% NaCl и лиофилизировали. Высушенные клетки экстрагировали органическим растворителем (метанол:вода (M:W = от 17:3 до 19:1, об/об) и/или смесями хлороформ:метанол:вода с оптимизированным соотношением (например X:M:V = 10:10:3 об/об/об)). Экстракты сушили под потоком N₂ и ресуспендировали в C:M:W=3:48:47. Для очистки экстрагированных гликолипидов ресуспендирующую смесь 3:48:47 пропускали через картридж tC₁₈ Sep-PAK. Картридж кондиционировали 10 мл метанола, затем уравнивали 10 мл 3:48:47 (C:M:W). После нанесения образца картридж промывали 10 мл 3:48:47 (C:M:W) и элюировали 5 мл метанола и 5 мл 10:10:3 (X:M:V). Объединенные элюаты сушили в атмосфере N₂. Образцы гликолипида гидролизовали путем растворения высушенных образцов в 2 мл смеси N-пропанол:2 M трифторуксусной кислоты (1:1), нагревали до 50°C в течение 15 мин, и затем выпаривали досуха в атмосфере N₂ (Glover, et al., Proc Natl Acad Sci U S A 102(40): 14255-9). Высушенные образцы еще раз ресуспендировали в 3:48:47 и пропускали через картридж tC₁₈, и поток сушили в атмосфере N₂. Мечение с помощью 2-AB и очистку гликана проводили, используя метод бумажных дисков, как описано (Bigge, et al., Anal Biochem 230(2): 229-38; Merry, et al., Anal Biochem 304(1): 91-9).

2-AB меченые гликаны разделяли с помощью HPLC с использованием нормально-фазовой колонки GlycoSep-N согласно Royle et al., но модифицированной к системе из трех растворителей (Royle, et al., Anal Biochem 304(1): 70-90). Растворителем А был 10 мМ формиат аммония, рН 4,4, в 80% ацетонитриле. Растворителем В был 30 мМ формиат аммония, рН 4,4, в 40% ацетонитриле. Растворителем С была 0,5% муравьиная кислота. Температура колонки составляла 30°C и 2-AB-меченые гликаны обнаруживали по флуоресценции (возбуждение λ_{ex} = 330 нм, испускание λ_{em} = 420 нм). Градиентные условия представляли собой линейный градиент от 100% А до 100% В в течение 160 мин при скорости потока 0,4 мл/мин, затем 2 мин от 100% В до 100% С при увеличении скорости потока до 1 мл/мин. Колонку промывали в течение 5 мин 100% С, возвращались к 100% А за 2 мин и пропуская образец

в течение 15 мин при 100% А при скорости потока 1 мл/мин, затем возвращая скорость потока до 0,4 мл/мин за 5 мин. Образцы вводили в воде.

Анализ деацетилирования:

Эквивалент 2-AB меченого гликана сушили при 30°C, ресуспендировали в 50 мкл воды с (образец) или без (имитация) 200 мМ NaOH (pH ≈ 14) и инкубировали в течение 25 часов при 37°C. Раствор затем доводили до комнатной температуры и нейтрализовали добавлением раствора 200 мМ HCl (pH≈1). После скоростной вакуумной сушки при 30°C образец перемаркировали 2AB и анализировали с помощью HPLC.

Гидразинолиз посредством HPLC

Тот же самый метод нормально-фазовой HPLC, описанный выше, использовали для отделения OPS, высвобождаемого из биоконъюгатов после гидразинолиза. Перед гидразинолизом биоконъюгаты, соответствующие 1 мг белка, полностью сушили под потоком N₂. Высвобождение полисахарида осуществляли, используя набор Ludger Liberate Hydrazinolysis Glycan Release kit (Ludger #LL-HYDRAZ-A2) в соответствии с инструкциями изготовителя. В кратком изложении, 450 мкл гидразина добавляли к высушенным образцам под слоем N₂ и инкубировали в течение 16 часов при температуре 85°C. Гидразин удаляли выпариванием в атмосфере N₂ при 45°C. Повторное N-ацетилирование полисахаридов выполняли посредством инкубации в 471 мкл 4,5% уксусного ангидрида в 1 М бикарбонате натрия в течение двух часов на льду. Затем добавляли 600 мкл 5% раствора TFA (трифторуксусная кислота) и образцы гидролизировали в течение еще одного часа на льду. Очистку проводили на колонке EB20 с использованием соответствующих буферов EB20 А и В.

Высвобожденные и очищенные полисахариды метили с помощью 2-AB и анализировали посредством НФ-HPLC, как описано для образцов LLO. Интересующие пики собирали и идентифицировали посредством MS/MS.

MS (масс-спектрометрия) и MS/MS (тандемная масс-спектрометрия) пиков HPLC

Для анализа моносахаридной последовательности интересующей молекулы OPS выполняли масс-спектрометрический анализ. Высушенные, собранные фракции, соответствующие конкретным пикам HPLC,

ресуспендировали в 5 мкл 10% ацетонитрила (ACN), 0,1% трифторуксусной кислоты (TFA) и смешивали 1:1 с матричным раствором (40 мг/мл DHB в 50% ACN, 0,1% TFA) на целевом планшете. Данные MS и MS/MS были получены вручную в режиме сканирования положительных ионов на масс-спектрометре Ultraflex-II MALDI-ToF/ToF (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). MS/MS получали с использованием метода LIFT. Стандартную смесь пептидов (Bruker Daltonik GmbH) использовали для внешней калибровки. Спектры экспортировали с использованием программного обеспечения Flex Analysis (Bruker Daltonik GmbH) и анализировали вручную.

Клетки-хозяева

Биоконъюгаты получали с помощью рекомбинантных клеток *E. coli*, экспрессирующих посредством плазмид(ы) белок(и)-носитель(и) и олигосахарил-трансферазу из *C. jejuni* (PglB), и OPS из космид или мутантов с хромосомными вставками.

Генетически детоксифицированный EPA (Экзотоксин A из *Pseudomonas aeruginosa*, содержащий мутации L552V, ΔE553) использовали в качестве белка-носителя и модифицировали так, чтобы он включал 2 или 4 сайтов гликозилирования (упоминаются в данном описании изобретения как 2S-EPA и 4S-EPA, соответственно) и С-концевую HIS-метку, и экспрессировали с использованием полученной на основе pBR322, арабиноза-индуцибельной плазмиды (см. Ihssen, et al., (2010) *Microbial cell factories* 9, 61).

MBP (мальтозосвязывающий белок), нативный периплазматический, растворимый белок *E. coli* экспрессировали с помощью pGVXN579. pGVXN579 представляет собой модифицированную плазмиду pMAL-p2X (New England Biolabs), кодирующую три бактериальные консенсусные последовательности N-гликозилирования, расположенные в ряд, с последующим тэгом Мус-Tag, слитым на С-конце с ORF (открытая рамка считывания) мальтозосвязывающего белка, кодируемой плазмидой. Такое расположение обеспечивало возможность аффинной очистки MBP биоконъюгата независимо от HIS-метки. Индукция экспрессии контролируется промотором *tac* и индуцируется IPTG (изопрропилтиогалактозид).

Белок PglB, экспрессируемый с помощью плазмиды pEXT21 (фрагмент *EcoRII/BamHI* из pMAF10 (Feldman et al., 2005, *PNAS USA* 102(8):3016-3021),

клонировали в рEXT21 с С-терминально слитой НА-меткой. Вариантами экспрессионной плазмиды являются оптимизация кодонов (pGVXN939), оптимизация кодонов с делецией сайта гликозилирования (pGVXN948), и удаленной НА-Тметкой (pGVXN970) и оптимизация кодонов и делеция НА-метки (pGVXN971).

Клинические изоляты анализировали на их способность синтезировать некоторые OPS с использованием агглютинации, Вестерн-блоттинга, окрашивания серебром, идентификационных отпечатков LLO, ПЦР-серотипирования или подобных методов, которые позволяют идентифицировать структурные характеристики OPS, и также на их фенотип резистентности к антибиотикам. В некоторых клинических изолятах был удален фрагмент хромосомы для фермента лигазы, *WaaL*, для увеличения доступности OPS для гликозилирования белка или OPS анализа.

Для дополнительного анализа клинических изолятов, кластер *rfb* лабораторного штамма W3110 заменяли кластером *rfb*, клонированным из клинических изолятов, и анализировали биосинтез OPS. Удаляли ген *waaL* для повышения эффективности получения биоконъюгата.

Обмен кластеров и делеции *waaL* осуществляли посредством гомологичной рекомбинации, используя оптимизированный метод (см. международную заявку на патент PCT/EP2013/068737) или опубликованные методики (Datsenko and Wanner, (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97, 6640-6645). Для обмена кластера OPS, интересующий кластер *rfb* из клинического изолята клонировали в плазмиду контрселекции pDOC-C, наряду с кассетой резистентности к антибиотикам, для последующей интеграции в локус *rfb* штамма W3110 *E. coli* (Kuhlman and Cox, 2010, Nucleic acids research 38, e92; Lee et al, 2009, BMC Microbiol 9, 252). Гомологичную рекомбинацию больших интересующих кластеров *rfb* выполняли, используя фланкирующую ДНК последовательность кодирования кластера *rfb* из W3110 длиной от 0,5 до 1,5 т.п.н. и линейаризацию *in vivo* вставки ДНК из плазмиды, несущей *rfb*. Полученный штамм, содержащий замененный кластер *rfb* (с кассетой резистентности к антибиотикам и без нее), то есть в кластере *rfb* из W3110 молекула ДНК между генами *gale* и *gnd* была заменена на аналогичный участок, выделенный из клинического изолята *E. coli*.

В некоторых экспериментах штаммы W3110, содержащие космиду, кодирующую кластер *rfb* данного серотипа *E. coli*, использовали в качестве штаммов-хозяев.

Для получения рекомбинантно экспрессированных биоконъюгатов в штаммах на основе W3110, удаляли находящиеся в W3110 гены, которые мешают рекомбинантному продуцированию OPS. Например, для получения клеткой-хозяином биоконъюгатов O25B, удаляли из W3110 кластер *gtrABS*. Для достижения этой цели использовали гомологичную рекомбинацию в соответствии с опубликованным способом (Bloor AE, Cranenburgh RM. Appl Environ Microbiol. 2006 Apr;72(4):2520-5.), используя гомологичные фланкирующие последовательности выше гена *gtrA* и ниже гена *gtrS*.

Для сборки продуцирующих штаммов, штамм-хозяин трансформировали *pglB* и плазмидой для экспрессии носителя, посредством трансформации. См. Wacker et al., 2002, Science 298:1790-1793.

Получение биоконъюгата

Получение биоконъюгата осуществляли путем выращивания клеток-хозяев и очистки биоконъюгатов, продуцируемых в периплазматическом пространстве. Культивирование происходило либо во встряхиваемых колбах, либо в периодическом процессе ферментации с подпиткой промышленного масштаба.

Культивирование во встряхиваемых колбах выполняли при 37°C, используя среду, состоящую из соответствующих антибиотиков в среде ТВ (terrific broth), иногда с добавлением 5 мМ MgCl₂. В среду высевали ночную культуру при значении OD, равном 0,05, из свежетрансформированных продуцирующих клеток, выращенных до середины фазы логарифмического роста, индуцированной 0,2% арабинозой и 1 мМ IPTG, дополнительно культивировали и собирали после 20 часов выращивания.

Периодические ферментации с подпиткой

Аликвоту из банка продуцирующей клеточной линии использовали для инокуляции встряхиваемой колбы, содержащей соевую LB среду с соответствующими антибиотиками. Встряхиваемую колбу инкубировали при 180 об./мин, 37°C, в течение приблизительно 12 часов. Среды для серии опытов без добавок стерилизовали непосредственно внутри биореактора (33

мин при $\geq 121^{\circ}\text{C}$), охлаждали и добавляли добавки. 4 М КОН или 25% фосфорную кислоту присоединяли к ферментеру для регулирования pH, и pH доводили до pH 7. Выполняли инокуляцию биореактора и периодической культуры из предварительной культуры с получением исходного значения OD600, равного 0,005. pH стабильно поддерживали путем добавления 4 М КОН или 25% фосфорной кислоты. Поддерживают давление растворенного кислорода (DO). Максимальное давление поддерживали при 600 мбар (60 кПа). Образование продукта индуцировали L-арабинозой (0,1%) и/или IPTG (1 мМ). Немедленно после индукции начинали подпитку путем добавления питательной среды, содержащей 2,5% арабинозы и IPTG. Через 24 ± 2 часа после индукции биореактор охлаждали до 25°C , подпитку прекращали и осуществляли сбор биомассы посредством фильтрации в тангенциальном потоке или центрифугирования.

Биомассу лизировали в 0,5% Triton X-100 посредством разрушения в течение 4 циклов гомогенизации под высоким давлением при 800 бар (80 МПа).

Биоконъюгаты очищали посредством колоночной хроматографии. Различные хроматографические методы были использованы для получения биоконъюгатов, в основном ИМАС (аффинная хроматография на иммобилизованных ионах металла), анионообменная хроматография на основе Q-смолы (АЕС) и эксклюзионная хроматография (SEC). Описание таких методов см., например, в Saraswat et al., 2013, Biomed. Res. Int. ID#312709 (p. 1-18) и WO 2009/104074.

Получение биоконъюгата для доклинических экспериментов

Из предварительной культуры определенное количество было перенесено в биореактор, содержащий обогащенную среду при $35 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Поддерживали pH и давление растворенного кислорода. Скорость перемешивания достигала 700 оборотов в минуту.

Когда плотность клеток достигала значения $\text{OD}_{600} = 40 \pm 5$, образование продукта индуцировали L-арабинозой (0,1%) и IPTG (1 мМ). Подпитку начинали через 24 ± 2 часа после индукции и биореактор охлаждали. Как только температура достигала 25°C , подпитку прекращали и собирали клетки.

Гомогенизация при высоком давлении

Биомассу, соответствующую 50 л при сборе, оттаивали в течение 1 суток при 2-8°C. Затем в контейнер добавляли 2,5 л буфера для лизиса и осветления. Добавляли Triton X-100 до конечной концентрации 0,5%, и полностью оттаявшие клетки разрушали посредством 4 циклов гомогенизации при высоком давлении при 800 бар (80 МПа). Клетки собирали и промывали с использованием стандартных методов.

Анализ моносахаридного состава:

Биоконъюгаты, содержащие приблизительно 8 мкг полисахарида, гидролизовали в течение шести часов в 104 мкл 3 М TFA при 99°C. TFA удаляли путем выпаривания и образцы промывали один раз 500 мкл 2-пропанола. Полученные моносахариды суспендировали в 100 мкл меченой смеси, содержащей 87,1 мг/мл 1-фенил-3-метил-5-пиразолона (PMP), 50% MeOH и 150 мМ NaOH. Мечение выполняли в течение 60 минут при 70°C. Образцы нейтрализовали добавлением 50 мкл 300 мМ HCl и 20 мкл 100 мМ Tris/HCl pH 7,0. PMP-меченные моносахариды очищали посредством экстракции, один раз 1 мл дибутилового эфира и три раза 1 мл CHCl₃.

PMP-derivatизированные моносахариды разделяли посредством RP-HPLC (Merck-Hitachi) на колонке C18 Inertsil ODS-3 (GL Sciences), оснащенной предварительной колонкой. Применяли двухступенчатый градиент от 100% буфера А (13% ацетонитрил, 87% H₂O (0,045% KН₂РO₄, 0,05% триэтиламин, pH 7,0) до 50% буфера А/50% буфера В (21% ацетонитрила, 79% H₂O (0,045% KН₂РO₄, 0,05% триэтиламина, pH 7,0) в течение 4 минут до 100% буфера В в течение 47 минут при 35°C и скорости потока 1 мл/мин. Объем инъекции составлял 50 мкл и элюирование контролировали посредством онлайн УФ-определения при 250 нм. Отдельные пики идентифицировали путем наложения хроматограмм имеющихся в продаже стандартов моносахаридов D-глюкозы (Sigma-Aldrich #G7528), L-рамнозы (Sigma-Aldrich #R3875), N-ацетил-D-глюкозамина (Sigma-Aldrich #A8625) и N-ацетил-L-фукозамина (Omicron Biochemicals #FUC-006).

Пример 1: Эпидемиология

Для определения распределения серотипов *E. coli*, вызывающих инфекцию мочевыводящих путей (UTI), выполняли эпидемиологическое

исследование. Более 1800 изолятов *E. coli* из образцов мочи человека собирали от субъектов в Швейцарии и O-антигенные серотипы (OPS) из каждого образца анализировали с использованием классических методов агглютинации. См. Фиг. 4

Отдельные образцы человеческой мочи анализировали для опознания патогенов и определения картины их резистентности к антибиотикам. Изоляты *E. coli* получали из образцов после анализа. Изоляты *E. coli* идентифицировали посредством классических микробиологических стратегий исключения и включения, включающих рост на хrome (CPS3) и на агаре Мак-Конки. Изоляты *E. coli* кроме того анализировали с использованием анализа агглютинации для определения их O-антигенного серотипа. См. DebRoy et al. (2011) Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases 12, 169-185. Изоляты из тех же O-антигенных серогрупп дополнительно анализировали для определения химической структуры O-цепи каждого изолята. См. Таблицу 1A. Было определено, что некоторые выделенные штаммы *E. coli* являются резистентными к антибиотикам, включая идентификацию фторхинолон-резистентных штаммов и штаммов, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра действия (ESBL).

Таблица 1A: Распределение наиболее распространенных UTI–ассоциированных серотипов *E. coli* из коллекции 1841 образцов мочи, собранных в Швейцарии в 2012. Показано распределение серотипов образцов из релевантных субпопуляций из 671 субъекта и распределение из всех** образцов.

Наиболее распространенные серотипы <i>E. coli</i>, ассоциированные с UTI			
O-серотип	Внебольничная UTI в возрасте 18-70 лет (n=671)	O-серотип	Внебольничная и больничная UTI для всех возрастов** (n=1871)
6	10,75%	2	8,75%
2	9,55%	6	8,47%
25	6,87%	25	8,37%

1	5,52%	75	4,56%
4	5,37%	1	4,29%
75	4,78%	8	3,86%
8	3,43%	18	3,53%
18	3,28%	4	3,26%
15	3,28%	15	2,39%
73	2,24%	73	2,17%
16	2,24%	16	1,85%
7	1,94%	7	1,68%

Серотипы O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O25, O73 и O75 выделяли из субъектов, независимо от местоположения, времени выделения, симптомов и целевой группы, предполагая, что они являлись преобладающими серотипами уропатогенных *E. coli* (UPEC). Соответственно, определение наиболее распространенных O-антигенных серотипов указывает, что O-антиген-специфические вакцины могут быть ограничены подмножеством серотипов, а именно тех, которые в наибольшей степени ассоциированы с заболеванием, как определено в исследовании, описанном в данном примере.

Ретроспективный анализ UTI серотипов в 1323 изолятах за последние три десятилетия в США, полученных из центра регистрации *E. coli* (ECRC), обеспечивает возможность тщательного сравнения с литературой и с текущими данными из Швейцарии. Преобладание верхних 20 серотипов было обнаружено независимо от местоположения, времени выделения, симптомов или целевой группы и предлагает преобладающие серотипы, связанные с UPEC (см. Таблицу 1B).

Таблица 1B: Преобладание наиболее распространенных ассоциированных с UTI серотипов из выбранных литературных данных за 1987-2011 годы и из ретроспективно проанализированных данных для США за 2000-2011 (ECRC).

ОБОЗНАЧЕНИЕ	ОБЩАЯ УТИ	ЦИСТИТ	ПИЕЛОНЕФРИТ	США 2000-2010
	имеющиеся данные из 1860 изолятов	имеющиеся данные из 1089 изолятов	имеющиеся данные из 373 изолятов	315 (все образцы УТИ кроме фекальных, всех возрастов, Ж+М) Количество нетипируемых было недоступно
Серотип				
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	на	на	на	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%
другие и нетипируемые/не доступны	33,3%	39,2%	40,2%	
другие O-типы (NT не доступны)				21,0%

Изоляты из описанных серотипов рассчитывали как процент от общего количества изолятов (Andreu et al., 1997, *J Infect Dis* 176:464-469; Blanco et al., 1996, *Eur J Epidemiol* 12:191-198; Fathollahi et al., 2009, *Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases* 4:77-81; Johnson et al., 2005, *J Clin Microbiol* 43:6064-6072;

Molina-Lopez et al., 2011, *Journal of infection in developing countries* 5:840-849; Sandberg et al., 1988, *J Clin Microbiol* 26:1471-1476; K. L. 2007, *The Journal of infection* 55:8-18; Terai et al., 1997, *Int J Urol* 4:289-294.) В некоторых случаях конкретные данные не были доступны; поэтому значения в процентах могут только дать указание на общее распределение серотипов в разных изолятах UTI в описанных исследованиях и должны рассматриваться с осторожностью. Однако другие описанные идентифицированные, но менее распространенные серотипы (O15, O20, O21, O22, O77 и O82) также включены.

Из всей информации, полученной из эпидемиологического анализа, взятой вместе, 10 преобладающих серотипов могут охватывать примерно 60-80% инфекций *E. coli*, предполагая охват части нетипируемых штаммов. Кроме того, данные показывают неожиданное значение O25 серотипа в эпидемиологическом исследовании, проведенном в Швейцарии, по сравнению с литературными данными и последними данными из США. См. Таблицы 1А и В.

O-антигенные серотипы *E. coli* часто состоят из подтипов, которые являются неодинаковыми, но структурно и антигенно похожими. Чтобы идентифицировать неизвестные/незарегистрированные подтипы среди собранных клинических изолятов и идентифицировать наиболее распространенные подтипы O-антигена, химические структуры O-антигенов наиболее распространенных серотипов анализировали более подробно.

Пример 2: O25 *E. coli*

В последние годы наблюдается повышенное распространение O25-положительных штаммов (см. George and Manges (2010) *Epidemiol Infect* 138, 1679-1690), и об этом свидетельствуют исследование, описанное в Примере 1, где было обнаружено, что серотип O25 является одним из четырех главных серотипов *E. coli* с точки зрения распространенности.

O25A

Структура единицы повтора O-антигена *E. coli* серотипа O25 была опубликована ранее (см. Kenne et al., 1983, *Carbohydrate Research* 122, 249-256; и Fundin et al., 2003, *Magnetic Resonance in Chemistry* 41, 4) и представлена на Фиг. 2В. Кластер *rfb*, относящийся к O-антигену O25 штамма E47 *E. coli*, является общедоступным (GenBank GU014554) и представлен на Фиг. 2А.

E. coli E47a используется в качестве эталонного штамма для серотипирования O25. Кроме того, информация о последовательности кластера *rfb* доступна из последовательности генома штамма, вызывающего бессимптомную бактериурию, *E. coli* 83972. (см. Zdziarskiet al., 2010, PLoS Pathog 6, e1001078). Хотя фенотипическая экспрессия O25 не была подтверждена, последовательности кластера *rfb* *E. coli* E47a и 83972 являются на 99,49% идентичными, убедительно свидетельствуя о том, что они кодируют один и тот же O-антиген.

O-антиген штаммов 83972 и E47a *E. coli* обозначен в данном описании изобретения как "O25A," потому что, как описано ниже, новый O-антиген *E. coli*, обозначенный "O25B," был идентифицирован на основе анализа клинических изолятов, полученных в эпидемиологическом исследовании, описанном в Примере 1 выше.

Были предложены функциональные свойства прогнозируемых генных продуктов штаммов 83972 и E47a *E. coli*. См. Таблицу 2; GenBank GU014554; и Szijarto, et al. (2012) FEMS Microbiol Lett 332, 131-136.

Таблица 2. Прогнозирования гена O-антигена O25A из кластера *rfb*, как опубликовано в Wang, et al. (2010) J Clin Microbiol 48, 2066-2074; см. также GenBank GU014554.

Название гена	Предполагаемая функция	Наиболее значимая гомология /Белок[организм], учетный номер, макс. идентичность (BLAST)
<i>rmlB</i>	dTDP-Глюкозо-4,6-дегидратаза	dTDP-Глюкозо-4,6-дегидратаза (<i>E. coli</i> IAI39), YP_002406996.1, 98%
<i>rmlD</i>	dTDP-6-Дезокси-D-глюкоза 3,5-эпимераза	dTDP-6-Дезокси-L-маннозодегидрогеназа (<i>E. coli</i>), ACA24825.1, 97%
<i>rmlA</i>	Глюкозо-1-фосфат-тимидилитрансфераза	Глюкозо-1-фосфат-тимидилитрансфераза (<i>E. coli</i> IAI39), YP_002406998.1, 99%
<i>rmlC</i>	dTDP-4-дегидрорамноза-3,5-эпимераза	RmlC (<i>E. coli</i>), ACA24796.1, 70%
<i>Wzx</i>	O-антиген-флиппаза	транспортер O-антигена (<i>E. coli</i>), WP_000021239.1, 100%
<i>wekA</i>	Гликозилтрансфераза	dTDP-Rha:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP

Название гена	Предполагаемая функция	Наиболее значимая гомология /Белок[организм], учетный номер, макс. идентичность (BLAST)
		α -1,3- рамнозилтрансфераза (<i>E. coli</i>), WP_000639414.1, 99%
<i>wekB</i>	Гликозилтрансфераза	WcmS; UDP-Glc:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP β -1,6- гликозилтрансфераза (<i>E. coli</i> O158), ADN43874.1, 40%
<i>Wzy</i>	O-антиген-полимераза	Wzy (<i>E. coli</i>), ADR74237.1, 30%
<i>wekC</i>	Гликозилтрансфераза	WfbF; UDP-Glc:FucNAc-GlcNAc-UPP α -1,3-гликозилтрансфераза (<i>E. coli</i>), ABG81807.1, 46%
<i>fnlA</i>	UDP-N-ацетилглюкозамин-4,6-дегидратаза/5-эпимераза	UDP-N-ацетилглюкозамин-4,6-дегидратаза/5-эпимераза (<i>E. coli</i>), WP_001556096.1, 95%
<i>fnlB</i>	UDP-2-ацетамидо-2,6-дидезокси-бета-L-талоза-4-дегидрогеназа	FnlB (<i>E. coli</i>), AAY28261.1, 97%
<i>fnlC</i>	UDP-N-ацетилглюкозамин-2-эпимераза	UDP-N-ацетилглюкозамин-2-эпимераза (<i>E. coli</i>) WP_000734424.1, 98%
<i>wbuB</i>	Гликозилтрансфераза	UDP-L-FucNAc: GlcNAc-UPP α -1,3- N-Ацетилфукозаминилтрансфераза (<i>E. coli</i>) P12b, O26], YP_006169152.1, 73%
<i>wbuC</i>	Усеченная гликозилтрансфераза	WbuC (<i>E. coli</i>), AAV74548.1, 72%

Сравнения структуры и кластера генов предполагают, что все функции, необходимые для сборки OPS O25A, кодируются в кластере *rfb*, расположенным между *galE* и *gnd*. Функции различных ферментов генного кластера *rfb* (см. Фиг. 2A) являются следующими:

RmlBDAC кодирует ферменты, необходимые для биосинтеза dTDP-L-рамнозы, которая является субстратом для добавления ветви L-Rha к единице повтора OPS.

FnlABC кодирует ферменты, необходимые для биосинтеза UDP-L-FucNAc, который является субстратом-донором для добавления L-FucNAc к повтору O25 OPS.

WekABC и wbuBC представляют собой гликозилтрансферазы согласно анализу гомологии. Однако wbuC оказалась короткой и усеченной и, по-видимому, нефункциональной. Таким образом, скорее всего функциональный комментарий указывает на то, что имеются четыре гликозилтрансферазы, образующие четыре связи для сборки единицы повтора.

Wzx и Wzy необходимы для переноса BRU в периплазматическое пространство и их полимеризации на Und-PP.

Все функции, необходимые для синтеза опубликованной структуры единицы повтора O25A, кодируются кластерами *rfb* E47a и 83972 *E. coli*. Таким образом, был сделан вывод о том, что кластер *rfb* отвечает за кодирование O25A OPS.

O25B

В 2009 году клинические изоляты *E. coli* из испанского стационара были охарактеризованы для определения клональных групп. См. Blanco, et al. (2009) J Antimicrob Chemother 63, 1135-1141. Выполняли характеристику а) типа ESBL, б) O-серотипа, в) генов вирулентности, г) мультилокусное типирование последовательности (MLST), и д) типирование с помощью гель-электрофореза в пульсирующем поле (PFGE). Результаты показали, что примерно 20% всех изолятов можно отнести к тому же клону: Серотип и MLST O25:H4 ST131, ESBL тип CTX-M15, филогруппа B2, кодирующая специфический набор генов вирулентности. Анализ компонентов кластера *rfb* репрезентативных клинических изолятов показал неизвестную 3'-последовательность, при сравнении с последовательностью типированного штамма из штамма E47a, и также из клинических изолятов, идентифицированных посредством метода аллель-специфического ПЦР-типирования (См. Clermont et al., 2008, J Antimicrob Chemother. 61(5):1024-8.; Clermont et al., Diagn. Microbiol Infect Dis. 2007, 57(2):129-36.; и Li, et al., 2010, J Microbiol Methods 82, 71-77. В 2013 году Phan et al. опубликовали последовательность генома клона O25b:H4 ST131, подтверждая, что этот клон представляет собой производное K-12 в соответствии со структурой его кластера генов *wa*, как сообщалось ранее. См.

Phan et al., 2013, PLOS Genetics 9(10):1-18 (e1003834). Все вместе данные свидетельствуют, что появился новый O25-агглютинирующий клон *E. coli*, выделенный в больничных условиях и что этот клон имеет специфические ESBL, MLST и PFGE фенотипы и содержит измененный O-антигенный кластер генов.

ПЦР типирование

Для того, чтобы определить, присутствует ли серотип O25B среди выделенных штаммов *E. coli*, идентифицированных в эпидемиологическом исследовании, описанном в Примере 1, положительные в отношении O25-агглютинации штаммы анализировали посредством типизирующей ПЦР в отношении O25 и O25B. ПЦР выполняли с использованием колоний, собранных с чашек Петри в качестве источника матричной ДНК и разных олигонуклеотидных праймеров. Были использованы O25-специфические праймеры, основанные на амплификации *wzy* E47a O25 и описанные в Li, et al. (2010) J Microbiol Methods 82, 71-77. Также были использованы O25B-специфические праймеры, описанные в Blanco, et al. (2009) J Antimicrob Chemother 63, 1135-1141, которые специфичны к неопределенной 3'-части кластера *rfb* O25b (LNB220). Согласно Phan et al., 2013, эта O25B-специфическая олигонуклеотидная пара отжигается в 3'-части кластера *rfb* O25B.

Из 24 проанализированных клинических изолятов с положительным фенотипом O25-агглютинации, 20 были отнесены к серотипу O25B посредством ПЦР-типирования, в то время как остальные 4 были положительно идентифицированы, как принадлежащие к серотипу O25A, посредством ПЦР-типирования. Таким образом, неожиданно, штаммы серотипа O25B были определены, как встречающиеся среди анализируемых штаммов чаще, чем штаммы серотипа O25A.

Секвенирование кластера

Для генетического анализа секвенировали кластер *rfb* O25B ПЦР-положительного штамма, обозначенного как "црес138". Идентифицированные гены и их наиболее близкие релевантные белковые гомологи вместе с предлагаемой номенклатурой приведены в Таблице 3 ниже. Гены, специфичные для O25B и отсутствующие в O25A, обозначены звездочкой.

Таблица 3. Прогнозы в отношении генов O25B O-антигена из кластера *rfb*.

Название гена	Предполагаемая функция	Наиболее значимая гомология /Белок[организм], учетный номер, макс. идентичность (BLAST)
<i>rmlB</i>	dTDP-Глюкозо-4,6-дегидратаза	Продукт гена rffG [<i>E. coli</i> NA114], YP_006139244, 99%
<i>rmlD</i>	dTDP-6-Дезокси-D-глюкозо-3,5-эпимераза	dTDP-4-дегидрорамнозо-редуктаза [<i>E. coli</i> NA114], YP_006139243, 100%
<i>rmlA</i>	Глюкозо-1-фосфат-тимидилитрансфераза	продукт гена rffH2 [<i>E. coli</i> NA114], YP_006139242, 100%
<i>rmlC</i>	dTDP-4-дегидрорамнозо-3,5-эпимераза	dTDP-4-дегидрорамнозо-3,5-эпимераза [<i>E. coli</i> NA114], YP_006139241, 99%
<i>Wzx</i>	Wzx, O-антиген-флиппаза	Wzx [<i>E. coli</i> штамм E47a], ADI43260, 99%
<i>wekA</i>	Гликозилтрансфераза (GT)	dTDP-Rha:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP α -1,3-рамнозилтрансфераза [<i>E. coli</i> 83972], ZP_04004894, 93%
<i>wekB</i>	Гликозилтрансфераза (GT)	UDP-Glc:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP β -1,6-гликозилтрансфераза [<i>E. coli</i> 83972], YP_006106413, 93%
<i>Wzy</i>	O-антиген-полимераза	мембранный белок [<i>E. coli</i> 83972], YP_006106412, 94%
<i>wbbJ*</i>	O-ацетилтрансфераза	O-ацетилтрансфераза [<i>E. coli</i> 83972], YP_006106411, 95%
<i>wbbK*</i>	Гликозилтрансфераза (GT)	UDP-Glc:Rha-GlcNAc-UPP α -1,3-гликозилтрансфераза [<i>E. coli</i> K-12], AAB88407, 60%
<i>wbbL*</i>	Гликозилтрансфераза (GT)	белок липополисахаридного биосинтеза, C-ter фрагмент, усеченный белок [<i>E. coli</i> DH1], YP_006129367, 62%; dTDP-Rha:GlcNAc-UPP α -1,3-

		рамнозилтрансфераза
--	--	---------------------

Состав кластера *rfb* показывает четкие различия с составом кластера O25A. Гены в 5'-части кластера являются близкими гомологами друг друга (*rmlD* и *wzy*; E47a и 83972 *E. coli*). Это не является неожиданным для генов *rml*, которые являются гомологичными во многих штаммах *E. coli*, синтезирующих L-рамнозу. Гомология генных продуктов O25A и B достигается в гене *wecC* (O25A), до того как она снижается до уровня ниже 25% идентичности, что указывает на неродственность белковых последовательностей. См. Фиг. 3B. Кроме того, было установлено, что гены биосинтеза UDP-N-ацетилглюкозамина O25A отсутствуют в штамме црес138 (O25B), также как и две гликозилтрансферазы ниже *fliABC*. См. Фиг. 3B. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что штаммы O25B не способны синтезировать UDP-L-FucNAc, за исключением тех случаев когда гены биосинтеза L-FucNAc могут быть закодированы вне кластера *rfb*. Тем не менее, нет ни одного случая сообщения о наличии локуса *fliABC* вне кластера *rfb*, когда L-FucNAc присутствует в BRU O-антигена. Таким образом, маловероятно, что штамм 138 способен синтезировать опубликованную основную повторяющуюся единицу (BRU) O25A.

Гены, идентифицированные в кластере *rfb* O25B, которые отсутствуют в кластере *rfb* серотипа O25A, кодируют две гликозилтрансферазы и O-ацетилтрансферазу. Эти три гена имеют одинаковую организацию с генами *wbbJKL*, обнаруженными и охарактеризованными в штаммах K-12 *E. coli* с генотипом кластера *rfb* O16, и кодируемые белки имеют высокую гомологию. См. Фиг. 3B. В соответствии с генетическим сходством между O25B и O16 серотипами номенклатура генов *rfb* O16, *wbbJKL*, была применена к гомологичным генам, идентифицированным в кластере *rfb* O25B.

Структура O16 BRU известна и функции генов *wbbJKL* были определены. См. Steveneson et al., (1994) J Bacteriol. 176(13):4144-56. *WbbJKL* отвечают за ацетилирование L-рамнозы, перенос остатка D-Glc на L-Rha-D-Glc-UndPP и перенос L-Rha на D-GlcNAc-UPP, который образован с помощью *wecA* из кластера ECA. На основании гомологии с O16 *WbbJKL* и известных функций O16 *WbbJKL* был сделан вывод, что кластер *rfb* O25B синтезирует структуру,

содержащую частично O16- и частично O25A-элементы совместно. Предполагалось, что весьма вероятно WbbJKL_{O25B} синтезирует такую же структуру, что и WbbJKL_{O16}, то есть α -D-Glc-1,3- α -L-Rha(2Ac)-1,3- α -D-GlcNAc. Эта трисахаридная структура идентична неразветвленному "коровому" остову O25A с единственным исключением, что L-Rha(2Ac) заменяет L-FucNAc. Замена является, соответственно, консервативной, так как и D-FucNAc, и L-RhaOAc представляют собой моносахариды с 6-дезокси- и 2-ацетил-функцией. Единственным отличием является конформация, так как фукоза относится к галактозе, а рамноза к маннозе, что приводит к разной ориентации группы OH в положении 3 и метильной группы в положении 5. Связи между моносахаридами будут идентичными (все α -1,3), указывая на то, что эти структуры будут аналогичными по форме и химическим характеристикам. По аналогии, белки, кодируемые в восходящей части O25A и B кластеров *rfb* (*rmlDCAB* и *wekAB*) разветвляют BRU из O25A или B путем присоединения разветвленного D-Glc и L-Rha к любому "коровому" трисахариду-остову. Это означает, что они принимают любой остов (с L-FucNAc или L-Rha(2Ac)) в качестве субстрата.

Присутствие L-Rha в качестве второго моносахарида из восстанавливающего конца O25B BRU объясняет, почему биосинтез L-FucNAc может отсутствовать в O25B. UDP-L-FucNAc не требуется, так как он заменен генами биосинтеза dTDP-L-Rha, которые присутствуют на 5'-конце кластера (*rmlDBAC*).

Phan *et al.*, 2013 проделали подобный генетический анализ на клиническом изоляте O25B, но пришли к другому выводу. Они также секвенировали весь геном, чтобы найти кластер генов биосинтеза UDP-FucNAc; однако они утверждают, что механизм для UDP-L-FucNAc в штамме O25B:H4 ST131 EC958 отсутствует не только в кластере *rfb* O25B, но и во всем штамме. Однако Phan пришел к выводу, что UDP-L-FucNAc должен синтезироваться другим образом, при условии что O25B:H4 ST131 EC958 создает такую же структуру O-антигена, что и E47a, то есть O25A. Вместо этого в данном описании изобретения раскрыто, что наиболее вероятный сценарий заключается в том, что штаммы O25B не могут создавать L-FucNAc, но вместо этого заменяют второй остаток BRU остатком O-ацетилированной L-рамнозы и

гены, необходимые для этого изменения, кодируются исключительно в кластере *rfb*.

Кроме того, присутствие гомолога О-ацетилтрансферазы в кластере O25B позволяет предположить О-ацетилирование в O25B BRU, модификацию, отсутствующую в O25A. Соответственно, было установлено, что структуры антигена O25 из серотипов O25A и O25B должны быть разными.

Структурный анализ O25B

Для подтверждения гипотезы о другой структуре антигена O25, анализировали химический состав и организацию О-антигенов клинических изолятов O25, описанных в Примере 1. Для более подробной характеристики структур O25 OPS использовали несколько методов.

Прежде всего, структуру О-антигена анализировали посредством SDS PAGE. Липополисахарид (LPS) из клинических изолятов анализировали по разнице в электрофоретической подвижности, используя разные методы окрашивания после SDS PAGE. Для визуализации количеств LPS выполняли окрашивание серебром и проводили анти-O25 специфический Вестерн-блоттинг. См. Фиг. 5, где изображены результаты анализа 10 изолятов. Данные показывают, что аналогичные интенсивности сигналов получены при окрашивании серебром разных препаратов LPS. В отличие от этого, анализ со специфической антисывороткой показывает более сильные интенсивности сигналов в 3 из 10 образцов (изоляты *црес436*, *црес767*, *црес827*). Полагают, что разные интенсивности сигналов возникают из-за различий в структуре OPS.

Для подробного прояснения структуры O25B применяли разные аналитические методы. Клинический изолят *црес138* был положительным по O25B согласно анализу ПЦР и демонстрировал более слабое распознавание O25-агглютинирующей антисывороткой, чем штаммы O25A. См. Фиг. 5. Кроме того, штамм является ESBL, но чувствителен к FOS, IPM и TZP и устойчив к AM, CXM, NOR и CIP. Другой клинический изолят, штамм *црес436* был отрицательным по O25B согласно ПЦР, но положительным по общему O25 (O25A) согласно ПЦР. Также было обнаружено, что штамм *црес436* сильнее взаимодействует с O25-агглютинирующей антисывороткой, когда его LPS анализировали посредством Вестерн-блоттинга. См. Фиг. 5. LLO из обоих штаммов экстрагировали, метили с помощью 2AB и анализировали

посредством нормально-фазовой HPLC. См. Фиг. 6; LLO из црес138 и црес436, 9,079 и 9,081). Профили элюирования показали четкие различия между двумя экстрактами. MS/MS-анализ штамм-специфических пиков идентифицировал сигналы, совместимые с ожидаемыми структурами BRU.

Сигналы в штамме црес436 (9.081): Пик при времени элюирования 62' анализировали посредством MS и обнаружили, что он содержит в качестве главной массы молекулу с $m/z=1021$ Да, то есть молекулу, соответствующую ожидаемой массе полной O25A OPS BRU. При MS/MS получали картину фрагментации, совместимую с последовательностью моносахарида O25A (Фиг. 7A; MS/MS $m/z=1021$).

Сигналы в штамме црес138: Главную массу пика при времени элюирования 50' составляла молекула с m/z 1022 Да, то есть на один дальтон более чем полная единица повтора O25A. MS/MS анализ (Фиг. 7B; MS/MS O25B) показал характер фрагментации, почти идентичный единице повтора O25A, и отнес разницу 1 дальтон ко 2^{-ому} моносахариду от восстанавливающего конца (идентифицированному путем фрагментации иона Y с $m/z=551$ в MS/MS O25A, и $m/z=552$ в штамме црес138). Дополнительный пик, элюированный при 60', показал аналогичную фрагментацию, но с разницей 42 Да в массе материнского иона ($m/z=980$), который локализован в том же моносахариде ($m/z=510$), то есть втором от восстанавливающего конца. Интерпретация этих результатов приведена ниже.

Процедуры экстракции OPS, гидролиза и 2AB-мечения включают кислотную обработку для удаления Und-PP из OPS. Было показано, что в условиях обработки частично удаляется O-ацетилирование, но не N-ацетилирование. Таким образом, вполне вероятно, что пик при 60' представляет массу деацетилированного BRU, появляющегося при химическом гидролизе вещества в пике 50'. Взятые вместе, эти данные показывают, что в O25B имеется O-ацетилирование в том же моносахаридном положении, что и N-ацетилирование в L-FucNAc из O25A.

Для химического подтверждения того, что ацетилирование второго остатка от восстанавливающего конца является O-связанным, выполняли анализ деацетилирования. Собирали O25B-специфический пик из 2AB LLO HPLC со временем элюирования 50' из O25B ПЦР-положительного штамма и

обрабатывали щелочью, как описано в разделе “Методы”. Повторный анализ посредством HPLC приводил к пику со временем элюирования 60', как идентифицировано в пике O25B из Фиг. 6, содержащему основную массу с $m/z=979$, с MS/MS-картиной фрагментации ионов, сопоставимой с O25B BRU, потерявшей свою O-ацетильную группу. N-ацетильные группы являются стабильными при щелочном воздействии, как показано с помощью оставшейся N-ацетильной группы на восстанавливающем конце D-GlcNAc в той же молекуле.

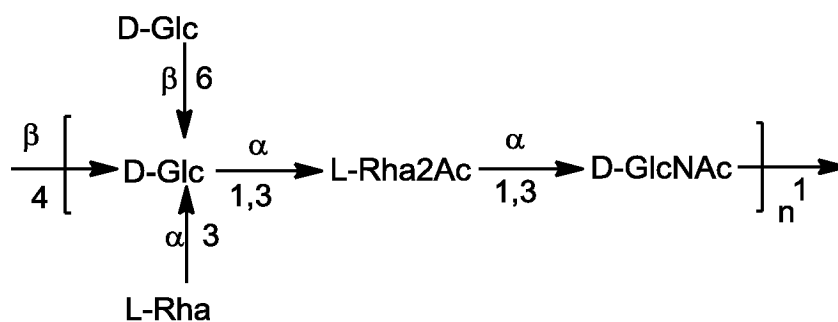
В заключение было установлено, что типичный O25B штамм ирес138 структурно и генетически родственен OPS O25A и O16 (Фиг. 3A и B) из *E. coli*. O25B отличается от O25A тем, что имеет структуру единицы повтора, содержащую O-ацетильную группу вместо N-ацетильной группы на втором моносахариде единицы повтора, который представляет собой остаток L-Rha, а не D-FucNAc. Эти изменения, скорее всего, вызваны заменой механизма биосинтеза UDP-FucNAc и трансферазы D-FucNAc участком ДНК, кодирующим две гликозилтрансферазы и O-ацетилтрансферазу. Эти гены относятся к кластеру генов O16 на основании гомологии и анализа функциональности. Конечные структуры отличаются, но похожи, что объясняет перекрестную реактивность, наблюдаемую с O25-агглютинирующей антисывороткой.

Как обсуждалось выше, был сделан вывод и предположение на основании анализа их кластеров *rfb*, что OPS O25A содержит L-FucNAc, в то время как эта структура отсутствует в O25B. Чтобы исследовать, отсутствует ли FucNAc в O25B, выполняли анализ моносахаридного состава EPA-биоконъюгатов, продуцируемых в штаммах O25A и O25B (Фиг. 9), используя метод PMP-мечения и метод анализа посредством HPLC, описанные выше. Для получения биоконъюгатов клинические изоляты *E. coli* с фенотипами O25A и O25B были приготовлены и модифицированы с целью оптимального продуцирования биоконъюгатов. Как часть этой модификации, гены *waal* из штаммов ирес_436 (O25A) и ирес_138 (O25B) были удалены, как описано ранее (см. Datsenko and Wanner, (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97, 6640-6645), исходя из информации, полученной методом определения типа кора (см. Amor, et al., (2000) Infect Immun 68, 1116-1124). Полученные штаммы трансформировали экспрессионными плазмидами для 4S-EPA (pGVXN659) и

олигосахарил-трансферазой, PglB (pGVXN939), для продуцирования O25A; и pGVXN114 и pGVXN539 (продуцирующих 2S-EPA) для получения O25B-биоконъюгата. O25B-биоконъюгаты получали в 2 л встряхиваемой колбе с последующей аффинной очисткой из периплазматических экстрактов посредством IMAC. O25A-конъюгаты получали посредством периодической ферментации с подпиткой и очищали посредством двухстадийного способа очистки, начиная с осветления цельноклеточного гомогената, полученного посредством гомогенизации под высоким давлением, как выше описано в разделе "Методы". Анализ моносахаридного состава выполняли, как описано выше.

Результаты подтверждают отсутствие сигнала FucNAc в происходящих от O25B биоконъюгатах, в то время как O25A-содержащие биоконъюгаты показывают пик при ожидаемом времени элюирования, как определено путем воздействия на смесь моносахаридов того же самого процесса обработки, что и в случае контроля. Таким образом было подтверждено, что предполагаемая структура O25B, как и ожидалось на основе анализа кластера *rfb*, представляет собой L-FucNAc-less.

Полную структуру единицы повтора (RU) O-антигенного полисахарида (O-PS) из O-антигена O25B *Escherichia coli* определяли с помощью ядерного магнитного резонанса биоконъюгата после частичного ферментативного расщепления группировки белок-носителя EPA. Анализ подтверждает, что O25B O-PS состоит из пентасахаридной RU. Сигналы ^1H и ^{13}C были установлены посредством методов корреляции 2D ЯМР, которые подтвердили, что структура O25B O-PS RU отличается от опубликованной структуры O25A O-PS RU (Kenne, L., et al. 1983. Carbohydr. Res. 122:249-256; Fundin, J., et al. 2003. Magn. Reson. Chem. 41:202-205) заменой остатка α -3-FucpNAc остатком α -3-Rhap, при этом более чем 90% этого остатка O-ацетилированы по положению C2. Полная O25B O-PS RU показана ниже (O25B¹):



Получение и характеристика биоконъюгата

Для дополнительного анализа полисахаридных антигенов O25A и O25B, получали больше вещества биоконъюгата. Для O25A очищенную партию O25A-EPA, полученную выше, использовали для экспериментов по дополнительным характеристикам. Для получения O25B-EPA конструировали штамм с геномно интегрированным кластером O25B: W3110 Δ waal Δ gtrABS Δ rfbO16::rfb(урес138), с плазмидами pGVXN1076 и pGVXN970. Этот штамм был сконструирован, начиная с W3110 посредством методов Datsenko и Wanner и способа гомологичной рекомбинации для сайт-направленной интеграции больших вставок в бактериальные хромосомы (см. международную заявку на патент PCT/EP2013/071328).

Полученные O25B-биоконъюгаты были охарактеризованы с использованием стандартных анализов выделения и характеристики. Биоконъюгаты очищали с использованием двух последовательных стадий анионообменной и гель-проникающей хроматографии, с получением 97,2 и 98,1% чистых O25A и O25B препаратов биоконъюгата, соответственно. Количественное определение посредством SDS PAGE использовали для анализа чистоты. См. Фиг. 10 (O25A) и Фиг. 11 (O25B). Отношение сахара к белку рассчитывали на основе количественного определения посредством антронового анализа (см. Laurentin and Edwards, (2003) Anal Biochem 315, 143-145) и BCA анализа концентрации белка, что приводило к 40,2 и 26,6% для биоконъюгатов O25A и O25B. Аналитическая гель-проникающая хроматография показала мономерное состояние частиц в соответствии с ожидаемым гидродинамическим радиусом EPA с присоединенными гликановыми цепями.

Применения

Для определения иммуногенного потенциала структуры O25B, выполняли несколько доклинических экспериментов с использованием биоконъюгатов O25B и O25A. Как показано на Фиг. 5, все клинические изоляты, идентифицированные, как O25-положительные в Примере 1 (то есть изоляты и O25A, и O25B), были положительными с O25A-антисывороткой, обычно используемой для выявления серотипов O25 (типизирующие сыворотки из O25A-штамма E47a) посредством Вестерн-блоттинга. Таким образом, анти-O25A антисыворотка, по-видимому, перекрестно реагирует с LPS из штаммов O25B. Для подробного анализа антительного ответа и перекрестной реактивности были получены биоконъюгаты O25. Мальтозосвязывающий белок (MBP) использовали в качестве белка-носителя, и этот белок-носитель был связан с O25A или O25B. В Таблице 4 показаны штаммы, использованные для получения белка. Использованные штаммы были идентифицированы посредством ПЦР в отношении их генотипа O25A или B. Экспрессию выполняли в среде TB и белковый продукт очищали из периплазматических экстрактов.

Таблица 4:

Биоконъюгат	Штамм	Плазмида pgIB	Плазмида- носитель	Процедура очистки
MBP-O25A	urec436 <i>ΔwaaL::kanR</i>	pGVXN939	pGVXN659	Q, A
MBP-O25B	urec350 <i>ΔwaaL::clmR</i>	pGVXN939	pGVXN659	Q, A, S

Q: очистка на Resource Q; A: амилозная смола; S: Гель-проникающая хроматография

Иммунизации с использованием полученных биоконъюгатов выполняли с использованием стандартных протоколов иммунизации кроликов (28-дневный ускоренный протокол Eurogentech). 50 мкг полисахарида, связанного с MBP, инъецировали в сутки 0, 7, 8 и 18 с патентованным иммуностимулирующим компонентом без адъюванта Фрейнда. Конечную, полученную на 28 сутки после первой иммунизации, антисыворотку из крови тестировали на ее

специфичность к LPS O25A или O25B. На Фиг. 22 показано сравнение реактивности антисыворотки к соответствующему LPS (O25A или O25B). LPS получали из црес436 и црес138 посредством переваривания протеиназой К цельноклеточных образцов в SDS-PAGE Lämmli буфере. Одинаковое количество LPS наносили на два геля SDS-PAGE, с последующим электропереносом на нитроцеллюлозные мембраны и определением с использованием O25A- и O25B-антисыворотки. Результаты показывают, что O25A-антисыворотка узнает LPS O25A лучше, чем LPS O25B, в то время как антисыворотка O25B узнает LPS O25B лучше, чем LPS O25A. Этот результат показывает, что аутологичный антиген делает лучший антиген. Таким образом, включение антигена O25B в вакцину обеспечивает лучшую защиту против преобладающих клинических штаммов O25B группы O25, чем антиген O25A.

Пример 3: *E. coli* O1

Список структурных баз данных разных структур субсеротипа *E. coli* O1. В частности, O1A, O1A1, O1B, O1C. O1A и O1A1 являются структурно идентичными и, как полагают, они связаны с заболеванием, хотя и не сообщалось, что O1B и C являются патогенными (см. Gupta, et al., (1992) J Bacteriol 174, 7963-7970) и представляют собой меньшинство среди изолятов O1. Структура O1A/O1A1, O1B и O1C показана на Фиг. 12B. Для анализа распределения субсеротипа O1 в эпидемиологическом исследовании UPEC из Примера 1 детально анализировали структуры O-антигенов из нескольких клинических изолятов из исследования. Во-первых, структуру LPS 12 штаммов, определенную, как положительная в отношении O1 посредством анализа агглютинации, анализировали посредством SDS PAGE. См. Фиг. 13: окрашивание серебром и вестерн-блоттинг O1.

Окрашивание серебром показало типичные LPS сигналы во всех линиях, содержащих экстракты из клинических изолятов O1. Сильное окрашивание электрофоретической подвижности примерно при 10-15 кДа соответствует ядру липида A, и лестницеобразные сигналы с более медленными подвижностями, представляют ядро липида A, модифицированное углеводными полимерами, состоящими из разного количества O-антигенных единиц повтора. При сравнении LPS из разных изолятов выявляются различия в распределении модальной длины, электрофоретической подвижности отдельных бэндов и

лестницеобразной картины. На основании этих наблюдений могут быть идентифицированы три группы: (1) большинство изолятов (црес002, црес010, црес032, црес140, црес108, црес143, црес276, црес399 и црес425) демонстрируют неразличимую электрофоретическую подвижность отдельных бэндов, отличающуюся только интенсивностью сигнала и средней длиной цепи (распределение модальной длины); (2) два изолята (црес119 и црес256), по-видимому, имеют немного более быструю подвижность каждого бэнда единицы повтора LPS, что предлагает другую структуру, например другую модификацию ядра липида А; и (3) сигналы, полученные из изолята црес1096, появляются в виде мазка, а не лестницы, указывая на другую структуру OPS. См. Фиг. 13А.

Анализ с помощью Вестерн-блоттинга и обнаружение с использованием анти-О1 антисыворотки показало, что все LPS, кроме црес1096, определяются при помощи специфических О1-антител, что указывает на перекрестно-реактивные молекулы LPS. Это означает, что 11 из изолятов представляют собой О1 и что црес1096, скорее всего, не является О1-изолятом (то есть он является ложным положительным в анализе агглютинации).

Для подробного анализа структурного сходства О1-антигенов, использовали 2АВ-мечение LLO и метод нормально-фазовой HPLC с высоким разрешением, как описано выше. На Фиг. 14А показано наложение хроматограмм, полученных для 5 из 11 клинических изолятов. Область идентификационных отпечатков OPS появилась при времени удерживания от 110 до 150 минут. Профили показывают, что во всех образцах сигналы возникают в то же время удерживания, что указывает на идентичные молекулярные структуры. Наблюдаемыми различиями были распределение интенсивности, то есть время элюирования среднего максимального сигнала, и интенсивности общего сигнала. Остальные 6 экстрактов приводят к пикам в то же время элюирования с различиями в интенсивности. Только образец црес1096 отличается по отношению к картине пиков, что подтверждает структурное отличие, отмеченное выше.

MS/MS-анализ содержания отдельного пика посредством анализа MALDI-TOF/TOF (время-пролётная ионизация лазерной десорбцией с использованием матрицы/времяпролётный) использовали для определения последовательности моносахаридов в образцах О1 (См. Фиг. 14В). MS-анализ

проводили из образцов, извлеченных не из клинических изолятов, а из штамма W3110 *ΔwaaL*, содержащего космиду с кластером *rfb* из *urc032*. Пики, элюированные в 50, 80, 96 и 108 минут времени элюирования, содержали основные массы $m/z=1021,4$, $1849,6$, $2693,9$, $3540,4$. Серии фрагментационных ионов, полученные после MS/MS, согласовывались с 1, 2, 3 и 4 единицами повтора HexNAc, тремя дезоксигексозами и разветвленным HexNAc. Эти данные могут быть объяснены только структурой субсеротипа O1A. Описанные серии пиков представляют собой O1 OPS, прикрепленные к UPP в клинических изолятах, и каждый последующий пик отличается от предыдущего одной единицей повтора.

Эти данные подтверждают утверждение из литературы, что предложенная структура O1 O-серотипа *E. coli* в клинических изолятах UTI из исследования, описанного в Примере 1, представляет собой подтип O1A.

Для получения биоконъюгата, несущего полисахарид O1A, штаммы W3110 *E. coli* конструировали для экспрессии OPS O1A. Полученными штаммами были W3110 $\Delta rfbO16::rfbO1 \Delta waaL$, содержащие кластер *rfb* положительного клинического изолята O1 (GU299791*, кластер в пределах *rmlB-wekO*). OPS O1A-экспрессирующие штаммы-хозяева конструировали при помощи гомологичной рекомбинации. Кластер *rfb* клинического изолята O1A амплифицировали с использованием ПЦР-олигонуклеотидов, которые отжигают с ДНК, фланкирующей кластер *rfb*. Амплифицированную ДНК затем использовали для замены эндогенного O-антигенного кластера хорошо охарактеризованного лабораторного штамма W3110 посредством гомологичной рекомбинации, описанной в международной заявке на патент PCT/EP2013/071328. Экспрессионные плазмиды для белков-носителей pGVXN659 и для PglB (pGVXN114, 939, 970, 971) были встроены посредством трансформации и экспрессии O1 была подтверждена (См. Фиг. 15 и Фиг. 16).

В независимом эксперименте клинический O1 изолят *urc032* конструировали для получения биоконъюгатов. При конструировании требовалось учитывать фенотип чувствительного к антибиотику клинического изолята. *Urc032 ΔwaaL* был сконструирован и трансформирован pGVXN939 и pGVXN579 для получения биоконъюгата с использованием MBP в качестве белка-носителя. Преимущество использования MBP и EPA в качестве белков-

носителей заключается в возможности индуцировать образование антисыворотки, где они оба приводят к антисывороткам, которые перекрестнореактивны к полисахаридному компоненту, но не к носителю. Такие антисыворотки являются полезными инструментами для оценки доклинических экспериментов, например в качестве покрывающих агентов для разработки полисахарид-специфических ELISA анализов.

Пример 4: *E. coli* O6

E. coli серотипа O6 представляет собой наиболее распространенный ExPEC, зарегистрированный на сегодняшний день (George, D. B., and Manges, A. R. (2010) *Epidemiol Infect* 138, 1679-1690). Не только исследование, описанное в Примере 1, но и данные, взятые из литературы, подтверждают, что серотип O6 является одним из четырех ведущих серотипов во многих проявлениях, вызванных ExPEC (См. Фиг. 4).

Две структуры OPS O6 были описаны в литературе (см. Jann et al., *Carbohydr. Res.* 263 (1994) 217-225, и Jansson et al., *Carbohydr. Res.* 131 (1984) 277-283). Структуры описанных O6-антигенов показаны на Фиг. 17B. Они идентичны за исключением разветвленного моносахарида каждого из них, который представляет собой либо Glc, либо GlcNAc. Однако в литературе не определена преобладающая O6-структура в клинических изолятах, вовлеченных в UTI.

Чтобы выбрать наиболее типичную структуру антигена O6 для вакцины, определяли структуры OPS O6-агглютинирующих положительных клинических изолятов *E. coli* из исследования Примера 1 с использованием того же подхода, как описано выше для серотипов O1. Окрашивание серебром и Вестерн-блоттинг с использованием анти-O6 антисыворотки идентифицировало один из 12 клинических изолятов, не взаимодействующих с анти-O6 сывороткой, хотя LPS был окрашен серебром во всех образцах (не показано), что указывает на ложный положительный результат агглютинации. Однако, вполне вероятно, что различия Glc или GlcNAc не будут обнаружены по сдвигу электрофоретической подвижности на гелях.

Для подробного анализа структуры использовали идентификационные отпечатки LLO. В качестве эталона для каждой из двух описанных структур, в анализ включали экстракты штаммов с описанными разветвленными Glc

(CCUG11309) и GlcNAc (CCUG11311). Сравнения двух кривых HPLC показывает серии пиков, которые элюируются в 70,8, 103,3 и 122,2' для полученных от CCUG11309 образцов и серии 68,8, 100,3 и 118,3 для образцов CCUG11311. См. Фиг. 18А. Пики анализировали с помощью MS в отношении основных масс, присутствующих в пиках, и с помощью MS/MS в отношении моносахаридной последовательности этих основных масс. Данные, подтвержденные для серии пиков, полученных от CCUG11311, $m/z=1094,4$, $2027,6$ и 2962 (MSO154), как и ожидалось, соответствуют GlcNAc-разветвленным полимерам с 1, 2 и 3 BRU. $m/z=1053,4$, $1945,7$ и $2836,9$ с разветвленным Glc были идентифицированы ранее в экстрактах из штамма W3110, экспрессирующего клонированный кластер *rfb* клинического изолята CFT 06, имеющего такие же значения времени элюирования пика 2AB-идентификационных отпечатков, что и CCUG11309 (MSO138). Когда хроматограммы, полученные из 12 клинических изолятов, сравнивали с эталонными штаммами, 11 сигналов содержали серии пиков, указывающие на OPS 06 с разветвленным остатком Glc. Пять из этих 11 хроматограмм показаны на Фиг. 18В. Один образец, не генерирующий сигналы при 06-специфических временах элюирования, не являлся 06, то есть он, наиболее вероятно являлся ложноположительным на основании теста агглютинации. Таким образом, OPS 06 с разветвлением Glc (Фиг. 17В, верхняя часть) имеет наиболее типичной структурой среди 06-серотипов, выделенных из эпидемиологии, описанной в Примере 1.

Для получения биоконъюгата, несущего полисахарид O6Glc, были сконструированы штаммы W3110 *E. coli* для экспрессии OPS 06 посредством замены кластера *rfb* W3110 кластером *rfb* из штамма CCUG11309. См. Таблицы 7 и 13. Полученные штаммы представляли собой W3110 $\Delta rfbO16::rfbCCUG11309 \Delta waaL$, содержащие кластер *rfb* 06-положительного штамма *E. coli* с описанным Glc-разветвлением в BRU (см. выше). Штамм-хозяин, экспрессирующий O6Glc OPS, был сконструирован посредством гомологичной рекомбинации. Кластер *rfb* амплифицировали, используя ПЦР-олигонуклеотиды, которые отжигаются с ДНК, фланкирующей кластер *rfb*. Амплифицированную ДНК затем использовали для замены эндогенного O-антигенного кластера хорошо охарактеризованного лабораторного штамма

W3110 посредством гомологичной рекомбинации, описанной в международной заявке на патент PCT/EP2013/071328. Экспрессионные плазмиды для белков-носителей и для PglB были введены посредством трансформации и экспрессию ожидаемого OPS на EPA подтверждали с помощью Вестерн-блоттинга.

Пример 5: *E. coli* O2

Структура единицы повтора O2-полисахарида была известна с 1987 (Jansson, et al., (1987) Carbohydrate research 161, 273-279). Это показано на Фиг. 19B. Две последовательности генных кластеров O-антигена O2 имеются в общедоступной базе данных (GenBank EU549863 и GU299792). Был сделан сравнительный анализ и предполагались гликозилтрансферазные активности (Таблица 5; Fratamico et al., 2010, Canadian journal of microbiology 56, 308-316; и Li, et al., (2010) J Microbiol Methods 82, 71-77).

Таблица 5. Прогнозы генов кластера O-антигена O2, исходя из кластера *rfb*, опубликованного Li, et al. и Fratamico, et al., как указано в скобках.

Название гена	Предполагаемая функция	Наиболее значимая гомология /Белок[организм], учетный номер, макс. идентичность (BLAST)
<i>rmlB</i>	dTDP-Глюкозо-4,6-дегидратаза	dTDP-Глюкозо-4,6-дегидратаза (<i>E. coli</i> IA139), YP_002406996.1, 98%
<i>rmlD</i>	dTDP-6-Дезокси-D-глюкоза 3,5-эпимераза	dTDP-6-Дезокси-L-маннозадегидрогеназа (<i>E. coli</i>), ACA24825.1, 97%
<i>rmlA</i>	Глюкозо-1-фосфат-тимидилитрансфераза	Глюкозо-1-фосфат-тимидилитрансфераза (<i>E. coli</i> IA139), YP_002406998.1, 99%
<i>fdtA</i>	NDP(нуклеозиддифосфат)-гексоза-изомераза	NDP-гексоза-изомераза (<i>Yersinia intermedia</i> ATCC 29909), ZP_04635116.1, 67%
<i>fdtC</i>	WxM-подобный белок	Гипотетический белок PROVRETT_01740 (<i>Providencia rettgeri</i> DSM 1131), ZP_03638653.1, 71%
<i>fdtB</i>	Аминотрансфераза	белок WblQ (<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> TTO1), NP_931971.1,

Название гена	Предполагаемая функция	Наиболее значимая гомология /Белок[организм], учетный номер, макс. идентичность (BLAST)
		65%
<i>Wzx</i>	О-антиген-флиппаза	белок биосинтеза полисахаридов (<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> PC1), YP_003016888.1, 50%
<i>wekP</i> (<i>wegQ</i>)	Гликозилтрансфераза (GT)	Гипотетический белок FIC_01940 (<i>Flavobacteriaceae bacterium</i> 3519–10), YP_003096444.1, 29%
<i>rmlC</i>	dTDP-4-дегидрорамнозо-3,5-эпимераза	RmlC (<i>E. coli</i>), ACA24796.1, 70%
<i>Wzy</i>	О-антиген-полимераза	Гипотетический белок Gura_3055 (<i>Geobacter uraniireducens</i> Rf4), YP_001231799.1, 26%
<i>wekQ</i> (<i>wegR</i>)	Гликозилтрансфераза	Гликозилтрансфераза, предполагаемая, gt2D (<i>Cellvibrio japonicus</i> Ueda107), ref YP_001983904.1, 31%
<i>wekR</i>	Гликозилтрансфераза	Гликозилтрансфераза, группа 1 (<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400), YP_751504.1, 57%
<i>wekS</i> (<i>wegW</i>)	Сульфатаза	Предполагаемый белок трансмембранной сульфатазы (<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a), YP_001970541.1, 39%

Сравнение гомологии структуры и генов указывает на то, что присутствуют все функции для биосинтеза полимера:

rmlBDAC кодирует ферменты, необходимые для биосинтеза dTDP-L-рамнозы, которая является субстратом для добавления L-Rha к остову с помощью гликозилтрансфераз *wekPOR*;

fdtABC обеспечивает dTDP-D-Fuc3NAc для разветвленных гликозилтрансфераз;

гомологи *wzy* и *wzx*, ответственные за перенос Und-PP-связанной единицы повтора из цитоплазмы в периплазму; и

wekPOR представляют собой прогнозируемые гликозилтрансферазы и, по-видимому, образуют гликозидные связи O2 BRU (три L-Rha и одну L-FucNAc).

Ген *wekS*, обнаруженный в опубликованных последовательностях кластера *rfb* O2, является прогнозируемой связанной с мембраной сульфатазой и, таким образом, скорее всего, не участвует в образовании BRU. Это означает, что – если принять за правило, что один фермент означает одну связь - тогда один фермент в группе *wekPOR* должен быть бифункциональным, чтобы обеспечить четырех гликозидные связи.

То, что правило - один фермент соответствует одной связи - не является абсолютным, было показано во многих примерах, где известно гликозилтрансфераз меньше чем связей, например в *Shigella flexneri* Y, *S. flexneri* 6, *C. jejuni* и *E. coli* O1A. В этих примерах мультифункциональные гликозилтрансферазы отвечают за образование более одной гликозидной связи, то есть они являются "би-" или "мульти-функциональные". Всегда это тот же самый моносахарид, который добавляют несколько раз. Повторные остатки рамнозы – как обнаружено в серотипе O2 – часто связаны с такими мультифункциональными ферментами.

Благодаря наличию усеченных элементов транспозона, фланкирующих последовательность *wekS*, было сделано предположение, что локус *wekS* был встроен в кластер *rfb* посредством рекомбинации ДНК (см. Fratamico et al., 2010, Canadian journal of microbiology 56, 308-316). Транспозон-опосредованная вставка локуса *wekS* предполагает, что биосинтез OPS O2 ранее действительно осуществлялся без присутствия *wekS* и, соответственно, *wekS* не требуется для синтеза полимера OPS O2. Для подтверждения этой гипотезы образование OPS O2 было воссоздано в рекомбинантной экспрессионной системе на "чистом" геномном фоне, содержащем кластер *rfb* O2, не имеющий гена *wekS*. Чтобы достичь этого, кластер O-антигена из штамма W3110 был заменен кластером *rfb* из O2-положительного штамма ирес116, не имеющего

ДНК *wekS*. Хромосомная замена была сделана посредством гомологичной рекомбинации, как описано в международной заявке на патент PCT/EP2013/071328. Полученный штамм представлял собой W3110 Δ *waaL* Δ *rfbW3110::rfbO2* Δ *wekS*. OPS получали и анализировали с помощью 2AB-мечения и нормально-фазовой HPLC и определения флуоресценции, как это делали для OPS O1A и O6 (см. выше), и анализировали с помощью нормально-фазовой HPLC (Фиг. 21) и сравнивали с сигналами от штамма дикого типа CCUG25. Анализ приводил к серии перекрывающихся пиков от 40 до 140 минут времени элюирования.

MS-анализ серии пиков, зависимой от кластера *rfb O2*, показал основные массы с такими же различиями между последовательными пиками (то есть единичную RU O2).

MS-анализ молекул, собранных в соответствующих пиках, выполняли, чтобы проанализировать структуру OPS. Пики, полученные при 43,5, 73,1, 81,4 и 90' из штамма дикого типа CCUG25, собирали и анализировали посредством MS и MS/MS. Были найдены массы и серии ионов Y-фрагмента, сопоставимые с ожидаемыми 1, 2 и 3 единицами повтора молекул OPS O2, ($m/z=989,4$ (Фиг. 23), 1817,8, 2646,1, все Na^+ -аддукты).

Для подтверждения OPS O2 из клинических изолятов, в 12 клонках анализировали их структуру OPS, как описано выше для серотипа O1. Во-первых, получали LPS для анализа посредством окрашивания серебром и Вестерн-блоттинга. Результаты изображены на Фиг. 20. Все образцы показывали лестницеобразный характер полос с двумя явными разными средними длинами лестниц. Анти-O2 антисыворотка идентифицировала все LPS образцы, указывая на то, что агглютинация правильно идентифицирует все изоляты, как серотипы O2.

Для получения биоконъюгата, несущего полисахарид O2, использовали W3110 Δ *waaL* Δ *rfbW3110::rfbO2* Δ *wekS*. Экспрессионные плазмиды для белков-носителей и для PglB вставляли посредством трансформации и экспрессию ожидаемого OPS на EPA подтверждали с помощью Вестерн-блоттинга. См. Таблицы 7 и 13 и выше.

Пример 6: Иммунологический анализ разных O-антигенов

Для оценки иммунологического потенциала биоконъюгатов, содержащих выбранные антигенные полисахариды, выполняли доклиническое исследование. Биоконъюгаты O1A-EPA, O2-EPA, O6Glc-EPA и O25B-EPA были получены, очищены и охарактеризованы, как описано выше и в разделе методов.

Таблица 6. Обзор доклинических исследований на крысах, включая число вакцинных групп, размеры групп, используемые вакцины и качественный показатель вакцинного препарата.

Группа	Способ инъекции	Число животных	Воздействие [0,2 мкг PS]	Чистота %	Отношение S/P %	Продуцирующий штамм/ (Штамм/плазмида/ Плазмида)
1	в/м	8	O1-EPA ^{tetra-pool} [0,2 мкг PS]	97	22	upec032 $\Delta waaL::kanR$ / pGVXN939/ pGVXN659
4	в/м	8	O2-EPA ^{tetra-pool} [0,2 мкг PS]	90	34	W3110 $\Delta rfb::rfb(upec116)(\Delta wekS)$ $\Delta waaL::clmR$ /pGVXN939/ pGVXN659
7	в/м	8	O6-EPA ^{tetra-pool} [0,2 мкг PS]	84	38	W3110 $\Delta wzzE-wecG \Delta waaL \Delta wbbIJK$ $\Delta gtrS \Delta wzxO16$ / pGVXN348/ pGVXN114/ pGVXN659
9	в/м	8	O25B-EPA ^{tetra-pool} [0,2 мкг PS]	85	21	upec163 $\Delta waaL$ pGVXN112 /pGVXN659
10	в/м	8	EPA ^{tetra}			W3110 $\Delta waaL$ /pGVXN659
11	в/м	8	TBS			
12	в/м	8	O1+O2 +O25B+O6-EPA ^{tetra} [0,2 мкг PS/каждый]	89*	29*	Смесь указанных выше партий

*рассчитанные значения

Очищенные биоконъюгаты использовали для иммунизации самок крыс Sprague Dawley в возрасте 9 недель. 100 мкл растворов такой же дозы вводили внутримышечно (в/м) на 1, 22 и 43 сутки крысам, у которых в заключение на 56 день отбирали кровь и которых умерщвляли.

Разные группы крыс получали разные вакцины: всегда в чистом виде, содержащую биоконъюгаты отдельно или в комбинации, как указано в Таблице 6. Планшеты ELISA, покрытые когнатными LPS, продуцируемыми положительным штаммом *waal*, использовали для измерения иммуногенности в форме титра ELISA сыворотки крыс во время терминального отбора крови на 56 сутки после первой инъекции (Фиг. 25-28). В целом, статистически значимая иммуногенность наблюдалась во всех вакцинированных группах, при измерении по сравнению с контролями (негликозилированный ЕРА или TBS буфер). Таким образом, биоконъюгаты, выбранные и полученные, представляют собой полезные соединения-кандидаты для вакцин.

Для всех протестированных конъюгатов О-антиген-ЕРА статистически значимую иммуногенность наблюдали для всех вакцинированных групп, при измерении по сравнению с контролями (негликозилированный ЕРА или TBS буфер). Таким образом, биоконъюгаты, выбранные и полученные, представляют собой полезные соединения-кандидаты для индукции О-антиген-специфических антител.

Пример 7: Физико-химическая характеристика биоконъюгатов

Четыре биоконъюгата, описанные в примерах выше (О-антиген O25B, O1A, O2 и O6, соответственно конъюгированных с ЕРА в качестве белка-носителя) были приготовлены в виде моновалентных партий (активные фармацевтические ингредиенты, API) или объединены в одном препарате в виде поливалентной вакцины против ЕхРЕС. Были получены различные группы: доклинические группы, группы для изучения токсичности и клинические группы. В Таблице 7 указаны штаммы-хозяева, используемые для получения конъюгатов.

Таблица 7: Штаммы-хозяева для получения партий для доклинических, токсикологических исследований и клинических партий

Продукт	Штамм	EPA-экспрессионная плаزمида	PgIB-экспрессионная плазмида
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

Таким образом, четыре моновалентные пре-GMP партии и негликозилированный EPA эталон анализировали посредством гель-фильтрационной хроматографии с многоугловым рассеянием лазерного света (SEC-MALS), для того чтобы количественно оценить степень моно- и дигликозилирования отдельных биоконъюгатов и для определения молекулярной массы (MM) белка-носителя и O-PS, присоединенного к нему. Образцы разделяли на колонке TSKgel-G3000 SWxl в фосфатном буфере (pH 7,0; 50 mM NaCl, 150 mM фосфата натрия) и контролировали с помощью УФ (214 и 280 нм), показателя преломления (RI) и многоугольного рассеяния лазерного света (MALS).

Для негликозилированного белка-носителя EPA была определена MM, равная 63-67 кДа (теоретическая MM составляет 70,5 кДа, на основании аминокислотной последовательности). В биоконъюгатах обнаруживали только EPA при 280 нм, позволяя выделять его MM из общей MM, измеренной с помощью RI и MALS: в биоконъюгатах измеренная MM группировки EPA составляла 65-71 кДа.

Анализ стандартов продукта пре-GMP API показан в Таблице 8, он указывает на присутствие моно- и дигликозилированных конъюгатов с MM в диапазоне 75-79 кДа и 87-91 кДа соответственно. Части O-PS имели MM 16-24 кДа для дигликозилированных разновидностей и 8-14 кДа для моногликозилированных разновидностей соответственно. Учитывая MM RU

каждого серотипа, было определено среднее число 10-16 RU на полисахаридную цепь, что хорошо согласуется с данными гидразинолиза и MS.

Таблица 8: SEC-MALS анализ моновалентных стандартов продукта пре-GMP API

Моновалентная партия	Пик 1			Пик 2		
		Общая ММ	ММ О-PS		Общая ММ	ММ О-PS
EPA-O1A	15%	87 кДа	16 кДа	83%	75 кДа	8 кДа
EPA-O2	29%	88 кДа	19 кДа	70%	76 кДа	10 кДа
EPA-O6	47%	88 кДа	21 кДа	50%	78 кДа	12 кДа
EPA-O25B	56%	91 кДа	24 кДа	42%	79 кДа	14 кДа

Пик 1: дигликозилированная форма.

Пик 2: моногликозилированная форма.

Анализ методом кругового дихроизма (CD) партии биоконъюгата O25B, приготовленной в Трис-солевом буфере (TBS), показал, что композиции при pH от 6,8 до 7,4 имеют спектр, аналогичный спектру негликозилированного белка-носителя EPA, со смесью альфа-спиральных и бета-складчатых структур, как ожидалось на основе опубликованной кристаллической структуры EPA. Таким образом, на основе этих CD-анализов можно предположить, что гликозилирование цепями O25B O-PS не влияет на вторичную структуру белка-носителя EPA.

Анализ посредством дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) композиции партии биоконъюгата O25B в TBS при pH от 6,8 до 7,4 и в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) при pH от 7,1 до 7,8, показал кривые плавления, сравнимые с кривыми негликозилированного EPA, с температурой плавления приблизительно 52°C. Этот результат показал, что биофизическая характеристика белка-носителя EPA не меняется при модификации цепями O25B O-PS.

Пример 8: Стабильность моновалентных нерасфасованных партий и тетравалентных вакцинных препаратов

Перед крупномасштабным изготовлением состоятельность процесса изготовления оценивали в малом масштабе. Партии для оценки состоятельности оценивали в широкоохватных исследованиях стабильности, которые включали условия ускоренного старения и стрессовые условия хранения для определения путей ухудшения характеристик. Стабильность четырех моновалентных вакцинных компонентов (API) тестировали в течение периода 3 месяца.

Анализ данных по стабильности доклинических API показал стабильность в течение по меньшей мере 3 месяцев при хранении при $-75 \pm 15^\circ\text{C}$ (нормальные условия хранения). Никаких статистически значимых тенденций не наблюдалось при предполагаемых условиях хранения при статистическом линейном регрессионном анализе. Также при ускоренных ($+5 \pm 3^\circ\text{C}$) и стрессовых условиях хранения ($+25 \pm 5^\circ\text{C}$) продукт был стабильным в течение по меньшей мере 3 месяцев, о чем свидетельствует низкая изменчивость показателей стабильности. Данные для O1A доклинических API показаны в Таблице 9. Три других серотипа (O2, O6, O25B) продемонстрировали аналогичные данные по стабильности.

Таблица 9: Данные по стабильности партии O1A доклинического API

	S/P t0	S/P 3 мес	Чистота t0	Чистота 3 мес
$-75 \pm 15^\circ\text{C}$	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: отношение сахара к белку, определенное с помощью антронового и ВСА анализов соответственно.

Чистота: как определено посредством обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC).

Стабильность тетравалентной вакцинной композиции (биоконъюгаты O25B, O1A, O2 и O6) определяли в течение 3-х месячного периода. Исследования включали условия ускоренного старения и условия стрессового хранения для определения путей ухудшения характеристик. Полученные данные считаются релевантными для первоначального обоснования срока

хранения GMP IMP (исследовательский лекарственный продукт, тетравалентная вакцинная композиция ExPEC).

Анализ данных по стабильности доклинической партии тетравалентной вакцины ExPEC указывает на стабильность в течение по меньшей мере 3 месяцев при хранении при $+5 \pm 3^\circ\text{C}$ (нормальные условия хранения), как показано в Таблице 10. Никаких статистически значимых тенденций не было обнаружено при предполагаемых условиях хранения посредством статистического линейного регрессионного анализа. Также при ускоренных условиях хранения ($+25 \pm 5^\circ\text{C}$) продукт был стабильным, о чем свидетельствует низкая вариабельность показателей стабильности.

Таблица 10: Данные по стабильности партии доклинической тетравалентной вакцины

	MM t0	MM 3 мес.	Чистота t0	Чистота 3 мес.
$5 \pm 3^\circ\text{C}$	302 & 192	294 & 188 кДа	98,3%	98,7%
$25 \pm 5^\circ\text{C}$	кДа	297 & 191 кДа		98,2%

MM (распределение молекулярного размера): два основных пика продукта (то есть моно- и ди-гликозилированные разновидности), как определено посредством эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC).

Чистота: как определено посредством обращено-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC).

Все вместе эти исследования показывают, что API и тетравалентная вакцинная композиция ExPEC были стабильны в течение по меньшей мере трех месяцев и, таким образом, являются подходящими вакцинными композициями в отношении стабильности.

Пример 9: Исследование токсичности тетравалентного вакцинного препарата

Оценивали токсичность и местную переносимость тетравалентного вакцинного препарата (биоконъюгаты O25B, O1A, O2 и O6) после двух внутримышечных введений (для воздействия была выбрана четырехглавая мышца бедра) крыс Sprague Dawley в 1 и 14 сутки. Обратимость, сохранение или отсроченное возникновение каких-либо изменений оценивали после восстановительного 14-суточного периода на 28 сутки. Вскрытие животных в основных группах (10 самцов и 10 самок и для вакцинированной, и для контрольной группы) производили на 17 сутки и в группах восстановления (5 самцов и 5 самок и для вакцинированной, и для контрольной группы) на 28 сутки (после 14-суточного периода восстановления). Это не было связано с какими-либо эффектами, рассматриваемыми как неблагоприятные, которые могли бы быть приписаны лечению. Вводимую дозу, то есть полную человеческую дозу, равную 4 мкг на O-антиген (16 мкг общего O-антигена для тетравалентной вакцины), вводимую на 1 и 14 сутки, рассматривали как уровень, не вызывающую обнаруживаемого неблагоприятного эффекта (NOAEL) для тетравалентной вакцины ExPEC в условиях этого исследования. Кроме того, иммуногенность тетравалентной вакцины ExPEC была подтверждена и для суток 17 и для суток 28, после оценки образцов сыворотки. Высокие титры анти-O1A, анти-O2, анти-O6 и анти-O25B IgG-антител были индуцированы в вакцинированной группе по сравнению контролями, которые получали только буфер, используемый для приготовления препарата (25 мМ Tris, 130 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, pH 7,4).

Эти данные подтверждают, что тетравалентная вакцина ExPEC обладает соответствующим профилем токсичности для введения в качестве вакцины и индуцирует антитела по меньшей мере ко всем четырем серотипам O-антигенов *E. coli*, присутствующих в вакцине (то есть O25B, O1A, O2 и O6).

Пример 10: Эпидемиология O-серотипов, связанных с бактериемией

Для определения распределения O-серотипов среди внекишечной *E. coli*, вызывающей бактериемию у пожилых людей, было проведено эпидемиологическое исследование на панели изолятов крови *E. coli*, собранных

у пациентов старше 60 лет. В общей сложности 860 изолятов крови за период 2011-2013 гг собрали у субъектов в США, Великобритании, Германии, Испании и Нидерландах и проанализировали посредством классической O-агглютинации. Как показано в Таблице 11, распределение O-серотипов изолятов с бактериемией напоминает распределение O-серотипов, обнаруженное у пациентов, страдающих от инфекции мочевыводящих путей (UTI, см. Таблица 1A). Серотип O25 был наиболее распространен в исследованной группе с бактериемией; субтипирование пятидесяти семи изолятов посредством ПЦР показало, что пятьдесят шесть (98%) серотипов O25 представляли собой O25B. В обеих целевых группах (UTI и бактериемия), серотипы O1, O2, O6 и O25 были идентифицированы, как четыре наиболее распространенных серотипа. В целом, эти данные подтверждают, что распределение серотипов среди изолятов, как с инфекцией мочевых путей, так и с бактериемией очень похоже и не зависит от географического расположения, времени выделения и показания.

Таблица 11: Распределение наиболее распространенных ассоциированных с бактериемией O-серотипов *E. coli* из коллекции 860 изолятов крови, собранных в США и Европейском союзе за период 2011-2013 гг. Указано относительное распределение O-серотипов в образцах.

O-серотип	Бактериемия в возрасте ≥ 60 лет США/ЕС 2011-2013 гг (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

Пример 11: Индукция функциональных антительных ответов

Функциональность антител, индуцированных после вакцинации моновалентной и тетравалентной вакцинными композициями, описанными выше, исследовали с помощью опсонофагоцитирующего киллинг-анализа (ОПК) *in vitro*. Этот тип анализа был принят в качестве коррелята защиты для конъюгатной вакцины против *Streptococcus pneumoniae* (Prevenar®). ОПК-анализ определяет способность сыворотки содействовать опсонофагоцизу и гибели разных серотипов *E. coli*. В 96-луночных планшетах, в каждой лунке, инкубировали определенные разведения образца сыворотки с бактериями одной из четырех вакцино-специфических серотипов *E. coli*, определенным количеством клеток HL60 и комплементом крольчонка. После инкубации часть смеси наносили на триптиказо-соевый агар (TSA) и подсчитывали число бактериальных колоний. Способность антител связываться с бактериальными клетками и активировать отложение комплемента и опосредовать захват и уничтожение бактерий клетками HL60 выражали в виде опсонического титра. Опсонический титр или индекс опсонизации (OI) соответствует разведению сыворотки, уничтожающему 50% бактериальных клеток. Предложены опсонические индексы для до- и послеиммунной сыворотки. Значимым считается более чем 4-кратное увеличение OI между показателями для до- и послеиммунной сывороткой. Были установлены анализы ОПК для трех серотипов O2, O6Glc и O25B.

Функциональность антительных ответов, индуцированных моновалентными вакцинами

Для оценки функциональной активности индуцированных вакциной антительных ответов на биоконъюгаты O25B, O1A, O2 и O6Glc, сыворотку вакцинированных крыс анализировали, используя анализы опсонофагоцитирующего киллинга (ОПК), в которых определяют *in vitro* комплемент- и антитело-зависимый фагоцитоз и уничтожение бактерий, например *E. coli*. *E. coli* предварительно опсонизировали разведениями сыворотки вакцинированных крыс, инкубированной с комплементом и фагоцитами (дифференцированные клетки HL60), и определяли колониеобразующие единицы (КОЕ). Далее рассчитывали максимальный % гибели и индексы опсонизации (OI: разведение сыворотки, вызывающее гибель

50% *E. coli*). *E. coli*, выбранные для ОРК-тестирования представляли собой ОС 24453 (серотип O2), ОС 24781 (серотип O6G1c) и ОС 24176 (серотип O25B). Как показано на Фиг. 29, наблюдался надежный функциональный иммунный ответ на O2-EPA (Фиг. 29А), O6G1c-EPA (Фиг. 29В) и O25B-EPA (Фиг. 29С).

Полученные данные показывают, что компоненты вакцины, описанные в данном документе, индуцируют антительные ответы против серотипов *E. coli*, O-антигены которых включены в вакцину и, что такие антительные ответы участвуют в гибели *E. coli* этих серотипов.

Функциональность антительных ответов, индуцированных тетравалентной вакциной

В Таблице 12 показаны общие титры OI для O-антигенов O2, O6G1c и O25B из животных, иммунизированных тетравалентной вакциной либо 0,4, либо 4 мкг на O-антиген. Титры определяли в двух независимых экспериментах. Доза 0,4 мкг индуцировала значительные OI у всех животных в отношении серотипов O2 и O6G1c. В отношении O25B 3/8 животных показали значительное увеличение OI после иммунизации дозой 0,4 мкг. По сравнению с дозой 0,4 мкг, доза 4 мкг индуцировала меньшее увеличение OI в отношении O2 у всех животных. 3/8 животных продемонстрировали увеличения OI, когда сыворотку из группы дозы 4 мкг тестировали на O25B *E. coli*. Эти данные подтверждают, что тетравалентная вакцина способна вызвать O-антиген-специфические опсонические антитела против O2, O6G1c и O25B.

Эти данные показывают, что компоненты вакцины, описанные в данном документе, индуцируют антительный ответ против серотипов *E. coli*, O-антигены которых включены в вакцину и, что такие антительные ответы участвуют в гибели *E. coli* этих серотипов.

Таблица 12: OI против O2, O6 и O25. OI отдельных сывороток до вакцинации и после 3 вакцинаций из двух независимых экспериментов показаны для всех животных.

Индексы опсонизации (OI) тетравалентной ЕРА крысиной сывороткой												
Животное №	<u>O2 E. coli</u>				<u>O6 E. coli</u>				<u>O25 E. coli</u>			
	Доза 0,4 мкг		Доза 4 мкг		Доза 0,4 мкг		Доза 4 мкг		Доза 0,4 мкг		Доза 4 мкг	
	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: пре-вак	6	7	5	0	17	6	6	16	2'404	2'082	0	0
пост-вак	>16384	1'476	293	32	202	226	2'045	2'821	1'847	1'578	9	0
2: пре-вак	21	11	11	20	11	90	0	0	0	0	0	0
пост-вак	11'148	>16384	150	120	436	475	10'262	11'460	0	0	4	0
3: пре-вак	6	6	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0
пост-вак	11'073	>16384	46	19	98	37	7'959	8'597	6	0	355	197
4: пре-вак	5	5	5	6	23	17	0	0	0	0	0	0
пост-вак	>16384	63	57	45	108	116	2'189	4'488	0	0	70	26
5: пре-вак	7	0	0	4	30	8	8	7	0	0	0	0
пост-вак	10'413	7'050	105	108	>16,384	12'672	3'107	7'564	0	0	105	69
6: пре-вак	8	0	8	7	299	164	5	0	269	154	0	0
пост-вак	89	34	24	17	1'725	1'475	540	896	0	0	0	0
7: пре-вак	9	9	6	6	18	21	22	5	0	0	0	0
пост-вак	>16384	>16384	109	92	1'249	1'863	160	143	1'130	630	9	8
8: пре-вак	4	6	6	5	26	22	0	0	0	0	0	0
пост-вак	5'058	4'201	39	25	6'590	3'826	288	656	3'336	1'986	0	0
пре-вак Av	8	5	5	6	53	42	5	3	334	280	0	0
пост-вак	10'867	7'747	103	57	3'349	2'586	3'319	4'578	790	524	69	37

Рассчитаны максимальный % гибели и индексы опсонизации (OI: разведение сыворотки, вызывающее гибель 50% *E. coli*). *E. coli*, выбранные для ОРК-анализа, представляли собой ОС 24453 (серотип O2), ОС 24781 (серотип O6Glc) и ОС 24176 (серотип O25B). Наблюдался сильный функциональный иммунный ответ на O2-EPA, O6Glc-EPA и O25B-EPA.

Пример 12: Оценка вакцины-кандидата против уропатогенных *Escherichia coli* у женщин с историей болезни рецидивирующей инфекцией мочевыводящих путей (RUTI)

Биоконъюгатная вакцина *E. coli* используется на I фазе клинического исследования. Вакцина содержит четыре биоконъюгата в солевом буферном растворе. Четыре биоконъюгата представляют собой: (1) O1A *E. coli*, конъюгированный с белком-носителем EPA, (2) O2 *E. coli*, конъюгированный с белком-носителем EPA, (3) O6Glc *E. coli*, конъюгированный с белком-носителем EPA, и (4) O25B *E. coli*, конъюгированный с белком-носителем EPA.

Исследуемая группа включает 194 здоровых женщин в возрасте более и равном 18-70 лет с историей болезни рецидивирующей инфекцией

мочевыводящих путей (RUTI), которая определена как более или ровно 3 независимых эпизода за предыдущие 12 месяцев или более или ровно 2 эпизода за последние 6 месяцев. По меньшей мере один из эпизодов инфекции мочевыводящих путей (UTI) был вызван *E. coli* (в качестве единственного патогена или части полимикробной инфекции) и эта причина была подтверждена культивированием и задокументирована. Для исследования UTI определяют по наличию по меньшей мере одного определенного симптома UTI (дизурия, неотложный позыв к мочеиспусканию, частота мочеиспускания, боль в боку, болезненность мочевого пузыря, надлобковая боль, лихорадка, тошнота, рвота) наряду с количеством бактерий (КОЕ) составляющим более или ровно 10^3 КОЕ/мл уропатогена в средней порции мочи.

Исследование включает две группы: (1) вакцина-кандидат и (2) плацебо. Исследование представляет собой последовательное, рандомизированное, простое слепое, плацебо-контролируемое многоцентровое исследование здоровых женщин с историей RUTI.

Предполагаемый период включения в исследование составляет 4 месяца с последующим наблюдением врача продолжительностью девять месяцев для каждого субъекта.

Цель исследования состоит в оценке безопасности, иммуногенности и эффективности биоконъюгатной вакцины *E. coli*.

Дизайн исследования

За субъектами наблюдали в течение 9 месяцев после инъекции и только за субъектами с инъекциями наблюдали в течение всего периода исследования. Субъекты участвовали в общей сложности в 5 запланированных визитах: скрининговом (первый визит), в сутки 1 (второй визит), в сутки 7, сутки 30 и сутки 270. Субъекты получали 4 телефонных звонка в качестве последующего наблюдения на 2 сутки, 90 сутки, 150 сутки и на 210 сутки.

Любые незапланированные визиты из-за возникновения UTI включали в себя стандартную медицинскую помощь с унифицированными вариантами лечения. Анализы мочи и крови (если это возможно) собирали для диагностики и серотипирования. Спонтанно сообщаемые побочные явления (AE) и тяжелые побочные явления (SAE) регистрировали в течение исследования, тогда как

запрашиваемые нежелательные АЕ регистрировали в течение 7 суток после инъекции.

В каждый визит субъекту давали новый дневник пациента и обсуждали предыдущий.

Дозирование и введение

Во время первого визита подходящих субъектов, которые дали информированное согласие, подвергали скринингу и подтверждали их соответствие критериям включения/исключения. Отбирали кровь и собирали мочу.

Во время 2 визита (1 сутки) каждый субъект получал одну внутримышечную инъекцию 0,5 мл раствора (вакцина-кандидат или плацебо) в дельтовидную мышцу. Уменьшенная доза вакцины-кандидата содержит 1 мкг каждого полисахарида (всего 4 мкг полисахарида). Целевая доза вакцины-кандидата содержит 4 мкг каждого полисахарида (всего 16 мкг полисахарида).

Цели

Основная цель заключается в оценке возникновения, интенсивности, взаимосвязи и длительности запрашиваемых и спонтанно сообщаемых нежелательных явлений (АЕ), а также серьезных побочных явлений (SAE) после инъекции вакцины-кандидата по сравнению с группой плацебо на протяжении всего периода исследования.

Вторичные цели заключаются (1) в сравнении изменения гематологических и биохимических конечных точек безопасности перед инъекцией (в начале скрининга и на 1 сутки) и после инъекции (на 7 и 30 сутки) вакцины-кандидата по сравнению с группой плацебо; (2) в оценке иммунного ответа вакцины-кандидата между исходным уровнем (1 сутки) и после инъекции (30 сутки и 270 сутки); (3) в сравнении количества случаев симптоматической инфекции мочевыводящих путей (UTI), вызванных вакцинными-серотипами *E. coli*, в двух группах, инъецированных вакциной-кандидатом или плацебо во время всего периода исследования, как наиболее релевантной конечной точки эффективности; (4) в оценке степени появления специфической *E. coli* UTI вакцинного серотипа в группе обработки вакциной по сравнению с группой плацебо в течение всего исследования; и (5) в оценке интенсивности и

продолжительности клинических симптомов UTI *E. coli* серотипов, специфических для вакцины, в группе обработки вакциной по сравнению с группой плацебо во время всего исследования.

Целями исследования являлись (1) сравнение интенсивности возникновения UTI, вызванных любым *E. coli* серотипом, в группе обработки вакциной по сравнению с группой плацебо во время всего исследования; и (2) сравнение интенсивности возникновения UTI, вызванных любым патогенном в группе обработки вакциной по сравнению с группой плацебо во время всего исследования.

Критерии включения

Критериями включения в исследование являются следующие: (1) женщины с историей рецидивирующей UTI, которая определяется как более или ровно 3 независимых эпизодов UTI в предыдущие 12 месяцев или более или ровно 2 эпизода UTI за последние 6 месяцев; по меньшей мере один UTI в течение последних 5 лет был вызван *E. coli* (в качестве единственного патогена или части мультимикробной инфекции) и был подтвержден в культуре и задокументирован; (2) Возраст ≥ 18 и ≤ 70 лет; (3) здоровые субъекты без продолжающегося или подозреваемой симптоматической UTI момент скринингового визита и в сутки инъекции (визит 2); (4) общее хорошее состояния здоровья, без клинически значимой истории болезни, результаты физического осмотра или клинико-лабораторные нарушения по клинической оценке исследователя; и (5) готовность участвовать в исследовании после того, как все аспекты протокола были объяснены и полностью поняты и получена письменная форма информированного согласия.

Критерии исключения

Критериями исключения из исследования являются следующие: (1) история более чем 10 рецидивирующих случаев UTI в год до скринингового визита; (2) применение любого кратковременного мочевого катетера в пределах 7 суток до скрининга; (3) применение любого постоянного катетера в пределах 30 суток перед скринингом; (4) история любых заболеваний/нарушений мочевыводящих путей, вызывающих диагностические

трудности; (5) симптом нарушения иммунной функции; (6) значимые заболевания и/или недостаточность сердечно-сосудистой системы, печени и почек; (7) неконтролируемый сахарный диабет; (8) значительные отклонения в результатах скрининга в отношении гематологии, биохимического анализа сыворотки и анализа мочи; (9) положительный тест на ВИЧ-инфекцию и/или симптом гепатита В или гепатита С; (10) BMI (индекс массы тела) более 34; (11) предшествующая иммуностимулирующая терапии для профилактики UTI (такая как Urovaxom®, Strovac® или Urovac®) в течение последних 3 месяцев или планируемое применение в течение периода исследования; (12) текущее применение любого лекарственного средства, известного как влияющего на иммунную функцию (например кортикостероиды $\geq 0,5$ мг/кг масса тела/сутки); (13) применение UTI-ассоциированного вагинального эстрогенового лечения, вновь начавшегося менее чем за 6 месяцев до инъекции и продолжающегося во время исследования или планируемого начала в течение активного периода исследования; (14) применение любой антибиотической терапии в пределах 1 недели до инъекции; (15) планируемое применение посткоитальных антибиотиков для профилактики UTI в течение периода исследования; (16) любая вакцинация, планируемая в пределах 30 суток до и 30 суток после инъекции; (17) участие в других клинических исследованиях в течение 60 суток до включения в исследование и на протяжении всего исследования; (18) предшествующая обработка иммуноглобулинами или продуктами крови в течение 3 месяцев до инъекции; (19) известная гиперчувствительность к любому компоненту вакцины; (20) наличие определенного медицинского или психиатрического состояния, которое, по мнению исследователя, исключает участие в исследовании; (21) острое заболевание во время инъекции; (22) женщины детородного возраста, которые либо имеют положительный тест на беременность или отказываются от использования эффективной контрацепции; (23) кормящие женщины в любое время исследования; (24) субъекты с плановым хирургическим вмешательством во время исследования; и (25) любой другой значимый вывод, который, по мнению исследователя, увеличит риск возникновения неблагоприятного исхода при участии в исследовании.

Статистические методы и анализ

Описательные статистические данные (n , среднее, стандартное отклонение, медиана и диапазоны для непрерывных переменных, частоты и проценты для категориальных переменных) предоставляются по группе лечению и/или визиту, как применимо. Все данные приведены по субъекту, группе лечения и, где применимо, визиту. Все субъекты из группы В, получающие плацебо, объединяют с образованием группы лечения плацебо.

Пример 13: Результаты фазы I клинического исследования

В этом примере представлены некоторые результаты промежуточного анализа фазы I клинического исследования, описанного в Примере 12.

12.1: Безопасность

Возникновение побочных явлений и тяжелых побочных явлений было сопоставимо в группе плацебо и вакцинированной группе. Было зарегистрировано десять тяжелых побочных явлений и ни одно не было связано с исследуемым лекарственным средством.

12.2: Иммуногенность

Для оценки иммуногенности компонентов вакцины, получали сыворотку от женщин, участвующих в клиническом исследовании, и анализировали ее посредством ELISA для количественного определения IgG против четырех разных О-антигенов, включенных в тетравалентную вакцину (*E. coli* O1, *E. coli* O2, *E. coli* O6 и *E. coli* O25B).

Сыворотку от вакцинированных женщин инкубировали в планшетах, покрытых O1A, O2, O6Glc и O25B-LPS, а также ЕРА. Затем планшеты инкубировали со вторичными антителами, мечеными HRP (пероксидаза хрена) (против человеческого IgG). Связанные антитела обнаруживали с помощью ТМВ-субстрата и измеряли оптическую плотность. Значения EC50 вычисляли посредством аппроксимации к 4-параметрической логистической модели.

Как показано на Фиг. 30, повышенный иммунный ответ к O1A-EPA, O2-EPA, O6Glc-EPA и O25B-EPA наблюдался у большинства вакцинированных женщин.

Эти данные демонстрируют иммуногенность каждого компонента тетравалентной вакцины.

12.3: Функциональный антительный ответ

Анализы ОРК, в которых измеряют *in vitro* комплемент- и антитело-зависимый фагоцитоз и гибель бактерий *E. coli*, использовали для оценки функционального антительного ответа у женщин, участвующих в клиническом исследовании.

У участников исследования собирали сыворотку. *E. coli* предварительно опсонизировали разведениями сыворотки от вакцинированных женщин, инкубированной с комплементом и фагоцитами (дифференцированные клетки HL60) и определяли оставшиеся колониобразующие единицы (КОЕ). Затем рассчитывали максимальный процент гибели и индексы опсонизации (OI: разведение сыворотки, вызывающее гибель 50% *E. coli*). *E. coli*, выбранные для ОРК-тестирования, представляли собой ОС 24452 (серотип O1A), ОС 24453 (серотип O2), ОС 24454 (серотип O6Glc) и ОС 24176 (серотип O25B).

Как показано на Фиг. 31, наблюдался устойчивый функциональный иммунный ответ на O1A-EPA (Фиг. 31A), O2-EPA (Фиг. 31B), O6Glc-EPA (Фиг. 31C) и O25B-EPA (Фиг. 31D).

Эти данные показывают, что каждый компонент тетравалентной вакцины индуцирует серотип-специфический антительный ответ и, что такие антительные ответы являются функциональными в гибели *E. coli* этих серотипов. Таким образом, вакцинные композиции, описанные в данном документе, являются функциональными у людей.

12.4: Иммунизация тетравалентным O-антигенным конъюгатом, содержащим O25B-EPA, вызывает образование O25A/O25B-перекрестных IgG-антител у людей

Для определения уровня перекрестной реактивности индуцированных вакциной сывороточных IgG-антител к двум известным подсеротипам *E. coli* O25, O25A и O25B, серийные разведения сыворотки, полученной от вакцинированных субъектов, инкубировали с очищенными LPS O25A, LPS O25B или интактными бактериальными клетками и тестировали с помощью ELISA.

Как показано на Фиг. 32, при анализе реакционной способности в отношении LPS O25A (черные полосы) и LPS O25B (серые полосы) через

тридцать суток после вакцинации наблюдались аналогичные значения EC_{50} . В целом эти данные свидетельствуют о том, что биоконъюгат O25B работает хорошо и в отношении O25B, и в отношении O25A, но в большинстве случаев/протестированных субъектов O25B работает немного лучше с точки зрения антительного ответа на O25B по сравнению с O25A. Этот результат свидетельствует о том, что при возникновении какой-то естественной изменчивости тетравалентная вакцина индуцирует антитела, которые узнают LPS и O25A, и O25B. Чтобы проверить, распространяется ли это на целые бактериальные клетки и многочисленные штаммы O25A/O25B, проверяли реакционную способность к набору клинических изолятов O25A или O25B, полученных из крови или мочи. В этом случае штамм серотипа O75, не представленного в тетравалентной вакцине, использовали в качестве отрицательного контроля (пунктирная серая линия на Фиг. 33). Как показано на Фиг. 33, индуцированные вакциной сывороточные IgG-антитела продемонстрировали сильный ответ на каждый из отдельных штаммов O25. Несмотря на очевидные изменения между штаммами, наблюдалась реактивность в отношении штаммов O25A (черные линии) и O25B (серые линии). Эти данные демонстрируют, что компонент O25B тетравалентной вакцины вызывает образование антител, которые узнают очищенные LPS и O25A и O25B, а также штаммы O25A и O25B *E. coli*.

В таблицах 13 и 14 ниже представлены подробности для некоторых штаммов и плазмид, соответственно, используемых в вышеуказанных примерах.

Таблица 13: Штаммы

Наименование	Генотип	Описание
урес032	wt	клинический изолят O1A из GVXN эпидемиологического исследования
урес436	wt	клинический изолят O25A из GVXN эпидемиологического исследования
урес138	wt	клинический изолят O25B из GVXN эпидемиологического исследования

Наименование	Генотип	Описание
црес116	wt	клинический изолят O2 из GVXN эпидемиологического исследования
црес163	wt	клинический изолят O25B из GVXN эпидемиологического исследования
црес177	wt	клинический изолят O25B из GVXN эпидемиологического исследования
W3110	F-, λ ⁻ , <i>IN(rrnD- rrnE)1, rph-1</i>	Лабораторный штамм K-12, используемый для синтеза продуцирующего штамма, CGSC#: 4474
CCUG25	wt	Изолят O2, полученный из коллекции культур, Университет Гетеборга (CCUG), Швеция (см. Jansson, et al., (1987) Carbohydrate research 161, 273-27)
CCUG11309	wt	Изолят O6 из CCUG, OPS с разветвлением Glc (см. Jann, et al., (1994) Carbohydrate research 263, 217-225)
CCUG11311	wt	Изолят O6 из CCUG, OPS с разветвлением GlcNAc (см. Jann, et al., (1994) Carbohydrate research 263, 217-225)

Таблица 14: Плазмиды

Наименование	Описание	Примечания
pGVXN150	экспрессионная плаزمида на основе pBR322 для генетически детоксифицированного EPA-his6, кодирующая 2 сайта гликозилирования	См. Ihssen, et al., (2010) Microbial cell factories 9, 61
pGVXN659	экспрессионная плазмида на основе pBR322 для генетически детоксифицированного EPA,	pGVXN150 была модифицирована так, чтобы кодировать

Наименование	Описание	Примечания
	кодирующая 4 сайта гликозилирования	дополнительные N- и C-концевые сайты гликозилирования
pGVXN1076	pGVXN659 <i>ΔampR::kanR</i>	
pGVXN579	вектор на основе pMAL-p2X для экспрессии МВР с С-концевым гибким линкером, за которым следуют последовательности трех сайтов гликозилирования и тус эпитоп	Позволяет быструю очистку биоконъюгатов без метки his
pGVXN114	экспрессионная плазмида на основе pEXT21 для PglB с НА-меткой	См. Ihssen, et al., (2010) Microbial cell factories 9, 61
pGVXN939	экспрессионная плазмида на основе pEXT21 для PglB с НА-меткой, кодон-оптимизированная	
pGVXN970	экспрессионная плазмида на основе pEXT21 для PglB без метки, кодон-оптимизированная	
pGVXN539	экспрессионная плазмида на основе pACT3 для генетически детоксифицированной, кодон-оптимизированной, меченной гистидином ЕРА, кодирующая 2 сайта гликозилирования, как pGVXN150	Замена устойчивости к хлорамфениколу устойчивостью к канамицину из pGVXN161 (олиго: #1399/#1400)
pGVXN161	pKD4	См. Datsenko and Wanner, (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97, 6640-6645

Наименование	Описание	Примечания
pGVXN112	экспрессионная плазмида на основе pACT3 для PglB с HA-меткой	

Таблица 15: Последовательности

Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO.
<i>rmlB</i> (уpec138)	GTGAAGATACTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTG GTTCTGCTGTTGTTTCGTCACATAATAATAATACGCAA GATAGTGTTGTTAATGTCGATAAATTAACATACGCCG GAAACCTGGAATCACTTGCAGATGTTTCTGATTCTGA ACGCTATTTCTTTGAACATGCGGATATTTGTGATGCA GCTGCAATGGCACGGATTTTTGCTCAGCATCAGCCG GATGCAGTGATGCACCTGGCAGCTGAAAGCCATGTT GACCGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAA CCAATATTGTGGGTACTTATGTCCTTTTAGAAGCGGC TCGGAATTATTGGTCTGGTCTGGATGATGAAAAGAAA AAAACTTCCGTTTTTCATCATATTTCTACTGATGAGGT GTATGGTGACTTACCCCATCCGGATGAAGTAAATAGC AATGAAACGTTGCCGCTATTTACGGAAACGACAGCAT ACGCGCCAAGTAGTCCATATTTCTGCTTCTAAAGCTTCC AGCGATCATTTGGTTCGCGCATGGAAACGTACTIONTATG GTTTACCGACCATTGTGACTAATTGCTCGAACAACAT GGTCCTTATCATTTCCCGGAAAAGCTTATTCCACTGG TTATTCTTAATTCCTGGAAGGTAAGGCATTACCTATT TATGGCAAAGGAGATCAGATCCGCGACTGGTTGTAT GTAGAGGATCATGCTCGAGCGTTATATACCGTCGTA ACCGAAGGTAAAGCGGGCGAACTTATAACATTGGT GGACACAACGAAAAGAAAAACATCGACGTAGTGTT ACTATTTGTGATTTGTTGGATGAGATAGTCCCGAAAG AGAAATCTTACCGCGAGCAAATTACTIONTATGTTACCGA TCGTCCGGGACACGATCGCCGTTATGCGATTGATGCT GAGAAGATTGGTCGCGAATTGGGATGGAAACCACAG GAAACGTTTGAGAGTGGGATTCGTAACCGGTGGA ATGGTACCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAATG TGAAAAGTGGTGCCATCAATCGTGGATTGAACAG AACTATGAGGGCCGCCAGTAA	1
<i>rmlD</i> (уpec138)	ATGAATATCCTCCTTTTTGGCAAAACAGGGCAGGTA GGTTGGGAACTACAGCGTGCTCTGGCACCTCTGGGT AATTTGATTGCTCTTGATGTTCACTCCACTGATTACTG TGGTGATTTTAGTAATCCTGAAGGTGTAGCTGAAACC GTAAGAAGCATTCGGCCTGATATTATTGTCAACGCA	2

Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO.
	<p>GCCGCTCACACCGCAGTAGACAAAGCAGAATCAGA ACCGAAGTTTGCACAATTA CTGAACGCGACGAGTGT CGAAGCGATCGCGAAAGCAGCCAATGAAGTCGGCG CCTGGGTATTCACTACTCTACTGACTACGTATTTCC GGGGACCGGTGAAATACCATGGCAGGAGGAGGATG CAACCGCACCGCTAAATGTTTACGGTGAAACCAAGT TAGCGGGAGAAAAAGCATTACAAGAGCATTGTGCG AAGCACCTTATTTCCGGACCAGCTGGGTCTATGCA GGTAAAGGAAATAACTTCGCCAAAACAATGTTGCG TCTGGCAAAGAGCGTGAAGAATTAGCCGTTATTA TGATCAGTTTGGTGCGCCAACTGGCGCAGAGTACT GGCTGATTGTACGGCACATGCTATTCGTGTGGCACT GAATAAACCGGAAGTCGCAGGCTTGTACCATCTGGT AGCTAGTGGTACCACAACGTGGCACGATTATGCTG CGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGCATT CCCCTTGCACTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAAC AACAGCCTATCCTACACCAGCTCGTCGTCCACATA ACTCTCGCCTTAATACAGAAAAATTTAGCAGAA CTTTGCGCTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTTGGCG TGAAACGAATGCTTAACGAATTATTTACGACTACA GCAATTTAA</p>	
<p><i>rmIA</i> (upec138)</p>	<p>ATGAAAACGCGTAAAGGTATTATTTTGGCGGGTGG TTCTGGTACTCGTCTTTATCCTGTGACGATGGCCGTC AGTAAACAGCTGTTACCGATTTATGATAAACCGAT GATCTATTACCCGCTCTCTACACTGATGTTAGCGGG TATTCGCGATATTCTGATTATCAGTACACCACAGGA TACTCCTCGTTTTCAACA ACTGCTGGGTGACGGGAG CCAGTGGGGCCTGAATCTTCAGTACAAAGTGCAAC CGAGTCCGGATGGTCTTGCGCAGGC GTTTATTATCG GTGAAGAGTTTATTGGTGGTGATGATTGTGCTTTGG TACTTGGTGATAATATCTTCTACGGCCACGACCTGC CGAAGTTAATGGACGTAGCTGTTAACAAAGAAAGT GGTGCAACGGTATTTGCCTATCACGTTAATGATCCT GAACGTTATGGTGTCTGTTGGAGTTTGATAATAACGG TACTGCAATTAGCCTGGAAGAAAAACCGCTGGAAC CAAAAAGTAACTATGCGGTACTGGGCTTTATTTCTA TGACAATGACGTTGTGGAAATGGCGAAAAACCTTA AGCCTTCTGCCCAGGTTGAACTGGAAATTACCGATA TTAACCGTATTTATATGGAACAAGGACGTTTGTCTG TCGCTATGATGGGGCGTGGCTATGCATGGCTGGATA CAGGGACGCATCAAAGTCTTATTGAAGCAAGCAAC TTCATTGCCACCATTGAAGAGCGCCAGGGACTAAAG GTTTCCTGTCCGGAAGAAATTGCTTATCGTAAAGGG TTTATTGATGCTGAGCAGGTTAAAAGTATTAGCCGAA</p>	3

Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO.
	CCGTTGAAGAAAAATGCTTATGGTCAGTATCTGCTC AAAATGATTAAAGGTTATTA	
<i>rmlC</i> (upec138)	ATGAACGTAATTA AAAACTGAAATTCCTGATGTGCTG ATTTTTGAACCAAAAGTTTTTGGGGATGAACGTGGCT TCTTTTTGAGAGTTTTAATCAGAGGATTTTTGAAGA AGCAGTAGGTCGTAAGGTTGAGTTTGTTCAGGATAA CCATTCTAAGTCCAGTAAAGGTGTTTTACGTGGTCTT CATTATCAGTTAGAACCTTATGCTCAAGGAAAACCTGG TGCGCTGTGTGTTGGCGAGGTTTTTGATGTTGCGGT GATATTCGTA AATCGTCACCTACATTTGGGAAATGG GTTGGGGTGAATTTGTCTGCTGAGAATAAGCGTCAG TTGTGGATTCTGAGGGATTTGCACATGGTTTTTTGG TGCTGAGTGATTTAGCAGAAGTTTTATATAAAAACGA ATCAATATTATGCTCCATCACATGAAAAAATATTAT ATGGAATGACCTCTTGCTTAATATTAATGGCCGAGC ACAGCACTGATCACTCTGTCTGATAAGGATGCAAA TGGGGAAAGATTTGAACTAAGTGAGTTTTGA	4
<i>wzx</i> (upec138)	ATGTCTCTCTTAAAACATAGTATATGGAATGTTGCGG GCTACTTTATACCAACATTAATTGCAATCCCGCCTTT GGATTAATTGCGAGGAAAATTGGTGTAGAACTATTTG GTTTGTATACGTTAGCAATGATTTTTATAGGGTATGCA AGTATATTTGATGCTGGGTTACAAGAGCTGTTGTGCG TGAAATAGCATTACTAAAAAACAGAGTGGACGATTGT AATACGATAATAGTAACTTCTATTATCGCTGTGATATT TTTAGGGTTTATCGGAGGCGGGGAGTGTTTCTGCTTA AAGGCGATATTATTGAACTGTTAAATATCTCACCAATA TATTACGCCGATTCGATAAAGTCTCTAGTATTATTATCA TCTCTGATACCTGTATTCTTAGTCACGCAAATACTATTA GCAGAGCTTGAGGGTCGGGAATATTTGGGATTCTAAA TATACAAAAAAGTGTAGGGAATTCTTAATTGCAGGGT TACCTGCATTATTTGTTTTAATTAATCAAACGCTTTTTTC TGCAATTATTGGTGTAGCGATTGCAAGAGTTATATGCTT GTGGTTAAGCTACATTATGAGCAGGGAAAGAATAACTA TCGATATCTCATTTTTTTCAATAACTGTTTTAAAGCGGTT ATTTAGATATGGCGGGTGGGTA ACTATAAGTAACATAA TATCTCCTATATTAGCGAGTATGGATAGATTTATTCTATC CCATATCCAGGGAGCATCAAAAATATCATTCTATACAGT CCCTAATGAGCTGGTAACTAGGCTTGGAAATAGTTCAGG CTCTCTTGGGAAAGCTGTTTTTCCAAAATTAAGT CATGCAAGGAATTTACAGCGTCATATGCAGAGCAAAA AAAAGCTTATATATTAATGACTGTCATTGTAATGCCTTT GGTTTTATTTGTATATTATTACGCAAAGTTTATTTAACA TTGTGGATGGGGGCTGAGTATGCAGGGATTTCCGGTCGA AATATTACGGATTATGCTTATAGGGTATATTTTTAACTGT	5

Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO.
	TATTCACAAATCTCTTTTGCCAACATACAGGCCTTTGGA AAAGCAAAATACACTGCATACATCCATATGATGGAATT TATTCCTTATTTGATAATGTTATATATAATTTCAAAGGAA TATGGGGTTATTGGTGTTCGCTGGTTATGGACAATTCGA GTAATAATTGATTTTTTATGCTTTTATATATGAGTTATC GTTGTAATAATCTTATGAAAAAAGGGTAG	
<i>wekA</i> (upec138)	ATGATATATATTGTGGTATTAATTGGAATGGGGCTA TAGATACCATTAATTGTGTTAAAAGTTTAATGGATTT AAATGTTAGCGATTATAAAATTATCATTGTTGATAAC TGTTCTATGGATAACTCATATGATACTATAAAAGAAA ATCTTAATTCATTATATATTGCTGATAAAAGTATCATT GAGGTGAAGTATGAGGATAGAAATAAATATAAAACC TTAGAAAACGATAAAATCATATTAATACAATCTCCGC AAAATAATGGGTACGCAAGTGGTAATAATATTGGCAT AGAGTTCGCTCTTAATCAGGAGAATATGAAATACGTC TGGGTTCTGAATAATGATACTGAAGTGGATAAAGAGG CTTAACTCATTAAATTAGTAAATGTGATTCAGATAAA AGTATAGGGATTTGCGGTTCTCGTTTAGTCTATTTTGC GACAGAGAGATGCAGCAAGGACTAGGTGGGGTGCATA ACAAATGGTTATGCACTACAAAAAATTATGAAATGGG AAGATTAGTTTCCAAAAAATATGATGATGAAGTCATTA GTAATGATATAGATTATATAATTGGCGCATCGATGTTTT TCTCTAGAGAATGTTTGGAAACAGTTGGATTGATGAAT GAAGAATATTTTTTATACTATGAAGAGTTAGATATTTGC CTCAGAGCAAAGCAAAGAACTTTAAATTAGGTATTTG CTCAGAAAGTTTGGTTTATCATAAAATAGGTGCAAGTA CTGATGGGGGAAAGAGCATGATGGCTGATCTTTGCTCA ATAAAAAATAGGCTGGTCATTACAGAAAGGTTTTATCC CCAATATTATTGGACGGTATGGTTGTCACTTTTTGTGTA GCATTTAACCGTGCTAGAAGAGGTGAGTTTAATAAGAT GAAAAGATGTTTGAATGTTATGTTTAACTTCAAACGAAA CAAAGGTAGCAAATGCCATTAG	6
<i>wekB</i> (upec138)	ATGAAAGTGGCTTTTTTATCTGCTTATGATCCACTATCTA CATCCAGTTGGTCTGGCACACCTTATTATATGCTAAAGG CATTATCGAAGAGAAATATTTCCATTGAAATATTAGGAC CGGTAAATAGCTATATGATATACATGTTAAAAGTATATA AATTAATATTAAGGTGTTTCCGAAAAGAATATGATTATA GTCATTTCGAAGTTGCTTTCCAGGTATTACGGTAGAATATT CGGTAGGAAATTAAAAAAATTGATGGTTTGGATTTTATT ATCGCACCTGCAGGTTCCTCACAAATTGCTTTTTTAAAAA CAACCATACCAATAATATATCTATCGGATACAACATATGA TCAATTA AAAAGCTATTATCCGAATTTAAATAAAAAAAC AATTATAAATGATGAGGATGCAAGTTTAATCGAACGCAA GGCTATTGAAAAGCAACAGTAGTATCTTTCCCATCTAAA	7

Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO.
	<p>TGGGCAATGGATTTTTGCAGGAATTATTACAGATTAGATT TTGATAAATTAGTTGAAATACCATGGGGGGCTAATTT ATTTGATGATATTCACTTTGCTAATAAAAAATATAATTC AAAAGAATAGTTATACTTGTCTTTTCTTGGGAGTTGAT TGGGAAAGAAAAGGTGGGAAAACAGCCTTGAAAGCA ATTGAATATGTAAGGCAGTTATATGGGATCGATGTTAG ACTAAAATTTGTGGATGTACTCCGAATCAAAGATTT TACCTACTTGGGTGAATTAATTGATAAAGTAGATAAA AATAACGTTGACGAATATCAGAAATTCATCGATGTGTT ATCTAACGCTGATATACTTCTTTTACCAACCATTGCTGA ATGTTATGGAATGGTATTTTGTGAAGCTGCTGCTTTTGG ATTGCCTGTTGTCGCTACAGATACAGGTGGAGTCAGTT CTATAGTTATCAACGAAAGGACGGGGATATTAATTA GACCCGTTAGACTATAAGCACTTTGGAAATGCAATTCA TAAAATAATTAGTTCCGTAGAGACTTATCAAACTACTC CCAAAACGCAAGAATTAGATATAATAATATATTGCATTG GGACAATTGGGCTAAAAGATAATTGAGATTATGTATG AGCATAAGAATAGAAGAATCAAATAG</p>	
wzy (upec138)	<p>ATGAGCATAAGAATAGAAGAATCAAATAGCACAAAAAG AATTATATGTTTATTTATACTTTTTCTTGTTTTCCCTGATTT TTTGTTTTATACATTAGGGGTTGATAATTTTAGCATTTC CGATAATCTCAATTACATTGCTTTTTGTTTTTTAAGAGCT AAAAATATTTGCAAAGATAATTTTCTAATAATAGTAGCG TTATTCATATTGTTGTGTTTAACTGTTTGTTAAGTATGCTA TTAATATTGAACAGGCTTTAACATTTAAAGTTGTACTTTC AATATATAGCATCTTAATAATGGCATAACGTCTCCTCTTGTT ATGCACAGACGTTGTGGTTATGTTCTGAAGAAATACTTAA GAGATCCGTCTTTATTTGTTTCGCATTTCTTTCCTTATTGG CATTATAAGTATTCTTTTACAGAAGACTGAGATTATACATG ATAAAAGTATGATTCTTTTTCTGAACCATCAGCATTGCA TTGGTTTTTATACCTATCTTTTCATTTTGTTTATACTATACAA GAGGGGGGGGGCTACTATTGCTCTATATATTATCTTTGGGT ATTGCGTTAGGTATCCAGAATTTAACAATGTTGGTAGGCAT TGTGATTAGTGTTTTTGTGATGAAAAAATAACTATAAGGC AACTATTGTTATACTTTTGGGGGCATGGATTTTTTCCATGA TATTAAGTGATTTAGACATTTCTTACTATACATCGCGGCTTG ATTTAAAAATACTACGAACSTATCAGTGCTTGTATATCTTT CAGGAATTGAAAGAGCTTTCTTGAATTTTATTACAAGTTATG GTCTTGGTATTGGTTTTCAACAAATGGGAGTGAATGGGGAG ATAGGAATATATCAACAAATTTTAGCTGAACTTGATGCCCC TATGTTAAATATATACGATGGCTCATTTATTTCTTCTAAGTTAA TATCTGAGTTTGGGGTTATTGGTGCATTAATGTGTATT TTCTATTTTTTTTATTTTTCCCGATTTTATCTGCGTTTCAA AAAAGTAAGAGATATTCACCGCAGTATATTTTAGCAT</p>	8

Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO.
	ATAGCTTCTACATGTGTTTCTTCATCCCTCTTTTATACG TGGTGCTGGTTATATAAACCCCTATGTGTTTATGTTATTT TCATCAATATTTTTGTGCAAATATCACGCTAAAAATATCT TGATGAAATCTAATGTCCAGATAGCTATATAA	
<i>wbbJ</i> (upec138)	ATGTGCATTAAAAAAAAAACTTAAGTTAATTAACGATA TGGCCTTTATGGTGGTCTTAGGCTTCTTAAAGATATATTC TTAACAAAATTTTTATTTTGTTCAAATGTTAGGATTATTA GATTTCCATGTTATATTAGAAAAGATGGAAGTGTTAGTTT TGGAAAAGGTTTTACATCAGGTGTAGGATTACGAGTTGA TGCATTTATGGATGCCGTAGTTTCCATTGGAGAAAATGTT CAAATTAATGACTATGTTACATCGCGGCTATTAATAATG TCATTATTGGTAGAGATACATTAATAGCAAGTAAAGTATT TATTAGTGATCATAATCATGGTATTTTTTCTAAATCCGATA TCCATAGTTCACCAACTATTATTCCTTCGTCTAGGCCCTT GAATCTGCACCTGTGTATATTGGAGAGCGTGTGTGGATTG GCGAAAATGTGACAATATTACCAGGTGCGTGTATAGGTAA TGGTGTAGTTATTGGCGCAAACAGTGTTGTTTCGTGGTGAG ATTCCTAATAATGTGATCATTGCTGGTGTTCAGCTAAAA TTGTTAAAAAATATAACTATGAGCGTATGCAATGGGAAA GAATATAG	9
<i>wbbK</i> (upec138)	ATGGGAAAGAATATAGTTGTAATATCGGCTGTTAATTTT ACAACCGGAGGCCCTTTACCGTACTAAAAAATGTGCT TACAGCAACTAAAGATAGAGCCGAATGTAAATTTATTG CACTGGTTCATAGCTCTGCTGAACTAATGGAATTATTTT CGTGGGTTGAATTTATAGAGTATCCAGAAGTCAAGTCTT CGTGGGTTAAAAGATTATTTTCGAATATATAACTTGCAA TAGATTATCTAAGGTGATTAAGGCAACTCATTGGGTATG CTTACATGATATTACAGCAAATGTTAGTGTACCCTATAG ATTTGTTTATTGCCACAATCCTGCACCGTTCTATAAATAT TTAAGCTATCGAGATATTATAGGAGAACCTAAATTTTAT CTTTTTATCTTTTTTATGGGCTTTTATACAATATCAATAT AAAAAAGAACACAGCAGTTTTTTGTTTCAGCAGCAGTGGCT AAAAAAGAATTCGAAAAAAAAAATAAAGTTAAAGAATG TTGTTGTTAGTCGCCCTGAAGATATTTGCCCTTTTGAAG TGATGGTTTGGTAAGAAATAATAAAAAAGGATGTGAG GATATTTTACCCAGCAGTGCCCCGTATTTAAAAACTTT GAAGTTATCATACGTGCTGCACAAATATTACAAGATAAA AATATTCATTTTTATCTTACTTTTGATGGTACTGAAAA TAAGTATGCAAAAAGAATATATAAATTAGCTTCCGA ACTGAAAAATGTACATTTCTCGGTTACCTTAATGCA ACCGAGATGGTAACTTTTATCAAGATTCAGATATTA TTTGTTTCCCATCGAACTAGAAACGTGGGGATTACC ATTATCAGAAGCTAAAACATACAAAAAATGGATATTT GCGGCAGACTTACCTTATGCTCATGAAGTTTATATAA	10

Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO.
	СТАТТCAAAAАCTAGATATTTTCCATTTGACGATGAG AAAATACTTGTTTCGCTACATATTAGAGTACACAAGTA AAAATATGCATGAAGATATAAAAAAATAGTAGGGTGA ATTTAATAATGATGCATTGACTGGTTTTGAACAGTTTA TTGAATATATCCTCAAGGGGAАCTGA	
<i>wbbL</i> (урес138)	ATGATTATGAATAATGATTATTTTCTCTTTCTTAACCCC GATGTATTCATAACCAGTGAAAGTTTGATTAATTATGT TGATTATATAATTAGTAATGATTATAAGTTTAGCACAT TATGCTTTTATCGAGATTTTACTAAAAGCAAACATGAT TATTCААTACGGAGTTTCCAACTTTATATGATTTTCTTT GTTCTTTTTTATTGGGGGTGAATAAAAAGTAAAATTAAG AAGGAAAATATACTTTCTGATACTGTAGTTGATTGGTG TGCTGGCTCATTATGCTTATTCATGCTTTAAGTTTCTTA AATGTGAATGGTTTTGATCAAAAATATTTTATGTATTGT GAAGATATTGACCTTTGTATGCGTTTAAAATTAAGTGG AGTAGATCTTACTATACTCCCCATTTTGATGCTATTCA TTATGCGCAGCATGAAAATAGAAGAATTTACTAAAG CATTTTCGATGGCATATAAGGAGTATTACGCGCTACATA TTACGGAAACCAATTCTTTCTTATAAAAАCTATAGAAA AATTACATCCGAACTGGTAAAGTGA	11
кластер генов <i>rfb</i> <i>E. coli</i> (урес138)	GTGAAGATACTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTGGTTCT GCTGTTGTTTCGTCACATAATAAATAATACGCAAGATAGTGTT GTTAATGTCGATAAATTAACATACGCCGGAAACCTGGAATC ACTTGCAGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATTTCTTTGAACAT GCGGATATTTGTGATGCAGCTGCAATGGCACGGATTTTGTCT CAGCATCAGCCGGATGCAGTGATGCACCTGGCAGCTGAAAG CCATGTTGACCGTTCААTТACAGGCCCTGCGGCATTTATTGA AACCAATATTGTGGGTACTTATGTCCTTTTAGAAGCGGCTCG GAATTATTGGTCTGGTCTGGATGATGAAAAGAAAAAAAAACT TCCGTTTTCATCATATTTCTACTGATGAGGTGTATGGTGACTT ACCCATCCGGATGAAGTAAATAGCAATGAAACGTTGCCGC TATTTACGGAAACGACAGCATAACGCGCCAAGTAGTCCATAT TCTGCTTCTAAAGCTTCCAGCGATCATTGGTTCGCGCATGG AAACGTACTTATGGTTTACCGACCATTGTGACTAATTGCTCG AACAАCTATGGTCCTTATCATTCCCGGAAAAGCTTATTCCA CTGGTTATTCTTAATTCACTGGAAGGTAAGGCATTACCTATT TATGGCAAAGGAGATCAGATCCGCGACTGGTTGTATGTAGA GGATCATGCTCGAGCGTTATATACCGTCGTAACCGAAGGTA AAGCGGGCGAAACTTATAACATTGGTGGACACAACGAAAAG AAAAACATCGACGTAGTGTTCACTATTTGTGATTTGTTGGAT GAGATAGTCCCGAAAGAGAAATCTTACCGCGAGCAAATTAC TTATGTTACCGATCGTCCGGGACACGATCGCCGTTATGCGAT TGATGCTGAGAAGATTGGTTCGCGAATTGGGATGGAAACCAC AGGAAACGTTTGAGAGTGGGATTCGТAAACGGTGGAATGG	12

Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO.
	<p>TACCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAATGTGAAAAGTGG TGCCTATCAATCGTGGATTGAACAGAACTATGAGGGCCGCC AGTAATGAATATCCTCCTTTTTGGCAAAACAGGGCAGGTAG GTTGGGAACACTACAGCGTGTCTGGCACCTCTGGGTAATTTGA TTGCTCTTGATGTTCACTCCACTGATTACTGTGGTGATTTTAG TAATCCTGAAGGTGTAGCTGAAACCGTAAGAAGCATTTCGGC CTGATATTATTGTCAACGCAGCCGCTCACACCCGAGTAGACA AAGCAGAATCAGAACCGAAGTTTGCACAATTACTGAACGCG ACGAGTGTGGAAGCGATCGCGAAAGCAGCCAATGAAGTCGG CGCTGGGTTATTCACTACTCTACTGACTACGTATTTCCGGG GACCGGTGAAATACCATGGCAGGAGGAGGATGCAACCGCAC CGCTAAATGTTTACGGTGAACCAAGTTAGCGGGAGAAAAA GCATTACAAGAGCATTGTGCGAAGCACCTTATTTTCCGGACC AGCTGGGTCTATGCAGGTAAGGAAATAACTTCGCCAAAAC AATGTTGCGTCTGGCAAAAGAGCGTGAAGAATTAGCCGTTA TTAATGATCAGTTTGGTGCGCCAACTGGCGCAGAGTTACTGG CTGATTGTACGGCACATGCTATTCGTGTGGCACTGAATAAAC CGGAAGTCGCAGGCTTGTACCATCTGGTAGCTAGTGGTACC ACAACGTGGCACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGC GCGCAAAGCAGGCATTCCCCTTGCACTCAACAAGCTCAACG CAGTACCAACAACAGCCTATCCTACACCAGCTCGTCGTCCAC ATAACTCTCGCCTTAATACAGAAAAATTCAGCAGAACTTTG CGTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTTGGCGTGAAACGAATGC TTAACGAATTATTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGC ATCTTGTTCGTAATGGTGGAGCAAGATGTATTAAGGAAT GATGAAATGAAAACGCGTAAAGGTATTATTTTGGCGGGTGG TTCTGGTACTCGTCTTTATCCTGTGACGATGGCCGTCAGTAA ACAGCTGTTACCGATTTATGATAAACCGATGATCTATTACC GCTCTCTACACTGATGTTAGCGGGTATTCGCGATATTCTGAT TATCAGTACACCACAGGATACTCCTCGTTTTCAACAACCTGCT GGGTGACGGGAGCCAGTGGGGCCTGAATCTTCAGTACAAAG TGCAACCGAGTCCGGATGGTCTTGCAGGCGTTTATTATCG GTGAAGAGTTTATTGGTGGTGTGATTGTGCTTTGGTACTTG GTGATAATATCTTCTACGGCCACGACCTGCCGAAGTTAATGG ACGTAGCTGTTAACAAGAAAGTGGTGCAACGGTATTTGCC TATCACGTTAATGATCCTGAACGTTATGGTGTCTGGAGTTT GATAATAACGGTACTGCAATTAGCCTGGAAGAAAAACCGCT GGAACCAAAAAGTAACTATGCGGTTACTGGGCTTTATTTCTA TGACAATGACGTTGTGGAATGGCGAAAAACCTTAAGCCTT CTGCCCGAGGTGAACTGGAATTACCGATATTAACCGTATTT ATATGGAACAAGGACGTTTGTCTGTCGCTATGATGGGGCGT GGCTATGCATGGCTGGATACAGGGACGCATCAAAGTCTTAT TGAAGCAAGCAACTTCATTGCCACCATTGAAGAGCGCCAGG GACTAAAGGTTTCTGTCCGGAAGAAATTGCTTATCGTAAAG</p>	

Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO.
	GGTTTATTGATGCTGAGCAGGTA AAAAGTATTAGCCGAACCG TTGAAGAAAAATGCTTATGGTCAGTATCTGCTCAAAATGATT AAAGGTTATTAATAAGATGAACGTAATTA AAAACTGAAATTC CTGATGTGCTGATTTTTGAACCAAAAAGTTTTTGGGGATGAAC GTGGCTTCTTTTTTGGAGAGTTTTAATCAGAGGATTTTTGAAG AAGCAGTAGGTCGTAAGGTTGAGTTTGTT CAGGATAACCATT CTAAGTCCAGTAAAGGTGTTTTACGTGGTCTTCATTATCAGT TAGAACCTTATGCTCAAGGAAA ACTGGTGCGCTGTGTTGTTG GCCGAGGTTTTTGATGTTGCGGTTGATATTCGTA AATCGTCAC CTACATTTGGGAAATGGGTTGGGGTGAATTTGTCTGCTGAGA ATAAGCGTCAGTTGTGGATTCCTGAGGGATTTGCACATGGTT TTTTGGTGCTGAGTGATTTAGCAGAAGTTTTATATAAAACGA ATCAATATTATGCTCCATCACATGAAAAA AATATTATATGGA ATGACCTCTTGCTTAATATTA AATGGCCGAGCACAGCACTGA TCACTCTGTCTGATAAGGATGCAAATGGGGAAAGATTTGAA CTAAGTGAGTTTTGAAATGTCTCTCTTAAAACATAGTATATG GAATGTTGCGGGCTACTTTATACCAACATTAATTGCAATTC CGCCTTTGGATTAATTGCGAGGAAAATTGGTGTAGAACTATT TGGTTTGTATACGTTAGCAATGATTTTTATAGGGTATGCAAG TATATTTGATGCTGGGTTAACAAGAGCTGTTGTGCGTGAAAT AGCATTACTAAAAACAGAGTGGACGATTGTAATACGATAA TAGTAACCTTCTATTATCGCTGTGATATTTTTAGGGTTTATCGG AGGCGGGGGAGTGTTTCTGCTTAAAGGCGATATTATTGAACT GTTAAATATCTCACCAATATATTACGCCGATTCGATAAAGTC TCTAGTATTATTATCATCTCTGATACCTGTATTCTTAGTCACG CAAATACTATTAGCAGAGCTTGAGGGTCGGGAATATTTTTGG GATTCTAAATATACAAAAAAGTGTAGGGAATTCTTTAATTGC AGGGTTACCTGCATTATTTGTTTTAATTAATCAAACGCTTTTT TCTGCAATTATTGGTGTAGCGATTGCAAGAGTTATATGCTTG TGGTTAAGCTACATTATGAGCAGGGAAAGAATAACTATCGA TATCTCATTTTTTTCAATAACTGTTTTAAAGCGGTTATTTAGA TATGGCGGGTGGGTA ACTATAAGTAACATAATATCTCCTATA TTAGCGAGTATGGATAGATTTATTCTATCCCATATCCAGGGA GCATCAAAAATATCATTCTATACAGTCCCTAATGAGCTGGTA ACTAGGCTTGGAATAGTTCAGGCTCTCTTGGGAAAGCTGTT TTTCCAAAATTAAGTCATGCAAGGAATTTTACAGCGTCATAT GCAGAGCAAAAAAAGCTTATATATTAATGACTGTCATTGT AATGCCTTTGGTTTTATTTGTATATTATTACGCAAAGTTTATT TTAACATTGTGGATGGGGCTGAGTATGCAGGGATTTCCGGTC GAAATATTACGGATTATGCTTATAGGGTATATTTTTAACTGT TATTCACAAATCTCTTTTGCCAACATACAGGCCTTTGGAAA GCAAAATACACTGCATACATCCATATGATGGAATTTATTCCT TATTTGATAATGTTATATATAATTTCAAAGGAATATGGGGTT ATTGGTGTTGCGTGGTTATGGACAATTCGAGTAATAATTGAT	

Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO.
	<p>TTTTTGATGCTTTTATATATGAGTTATCGTTGTAATAATCTTA TGAAAAAAGGGTAGCCTGATGATATATATTGTGGTATTTAAA TTGGAATGGGGCTATAGATACCATTAATTGTGTTAAAAGTTT AATGGATTTAAATGTTAGCGATTATAAAATTATCATTGTTGA TAACTGTTCTATGGATAACTCATATGATACTATAAAAGAAAA TCTTAATTCATTATATATTGCTGATAAAAGTATCATTGAGGT GAAGTATGAGGATAGAAATAAATATAAAACCTTAGAAAACG ATAAAATCATATTAATACAATCTCCGCAAATAATGGGTAC GCAAGTGGTAATAATATTGGCATAGAGTTCGCTCTTAATCAG GAGAATATGAAATACGTCTGGGTTCTGAATAATGATACTGA AGTGGATAAAGAGGCTTTAACTCATTTAATTAGTAAATGTGA TTCAGATAAAAGTATAGGGATTTGCGGTTCTCGTTTAGTCTA TTTTGCCGACAGAGAGATGCAGCAAGGACTAGGTGGGGTGC ATAACAAATGGTTATGCACTACAAAAAATTATGAAATGGGA AGATTAGTTTCCAAAAAATATGATGATGAAGTCATTAGTAAT GATATAGATTATATAATTGGCGCATCGATGTTTTTCTCTAGA GAATGTTTGGAAACAGTTGGATTGATGAATGAAGAATATTTT TTATACTATGAAGAGTTAGATATTTGCCTCAGAGCAAAAGC AAAGAACTTTAAATTAGGTATTTGCTCAGAAAGTTTGGTTTA TCATAAAATAGGTGCAAGTACTGATGGGGGAAAGAGCATGA TGGCTGATCTTTGCTCAATAAAAAAATAGGCTGGTCATTACAG AAAGGTTTTATCCCAATATTATTGGACGGTATGGTTGTCAC TTTTTGTTGTAGCATTAAACCGTGCTAGAAGAGGTGAGTTTA ATAAGATGAAAAGATGTTTGAATGTTATGTTTAACTTCAAAC GAAACAAAGGTAGCAAATGCCATTAGAATATGCACTTAATC ATGGTGTTAATAAATCTATAGTTTGATATGTTATTAAGGGT ATTTAATGAAAGTGGCTTTTTTATCTGCTTATGATCCACTATC TACATCCAGTTGGTCTGGCACACCTTATTATATGCTAAAGGC ATTATCGAAGAGAAATATTTCCATTGAAATATTAGGACCGGT AAATAGCTATATGATATACATGTTAAAAGTATATAAATTAAT ATTAAGGTGTTTCGGAAAAGAATATGATTATAGTCATTTCGAA GTTGCTTTCCAGGTATTACGGTAGAATATTCGGTAGGAAATT AAAAAAAATTGATGGTTTGGATTTTATTATCGCACCTGCAGG TTCTCACAAATTGCTTTTTTAAAAACAACCATAACCAATAAT ATATCTATCGGATACAACATATGATCAATTA AAAAGCTATTA TCCGAATTTAATAAAAAACAATTATAAATGATGAGGATG CAAGTTTAATCGAACGCAAGGCTATTGAAAAGCAACAGTA GTATCTTTCCCATCTAAATGGGCAATGGATTTTTGCAGGAAT TATTACAGATTAGATTTTGATAAATTAGTTGAAATACCATGG GGGGCTAATTTATTTGATGATATTCATTTGCTAATAAAAAAT ATAATTCAAAAGAATAGTTATACTTGTCTTTTCTTGGGAGTT GATTGGGAAAGAAAAGGTGGGAAAACAGCCTTGAAAGCAA TTGAATATGTAAGGCAGTTATATGGGATCGATGTTAGACTAA AAATTTGTGGATGTACTCCGAATCAAAGATTTTACCTACTT</p>	

Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO.
	GGGTTGAATTAATTGATAAAGTAGATAAAAATAACGTTGAC GAATATCAGAAATTCATCGATGTGTTATCTAACGCTGATATA CTTCTTTTACCAACCATTGCTGAATGTTATGGAATGGTATTTT GTGAAGCTGCTGCTTTTGGATTGCCTGTTGTTCGCTACAGATA CAGGTGGAGTCAGTTCATAGTTATCAACGAAAGGACGGGG ATATTAATTAAGACCCGTTAGACTATAAGCACTTTGGAAAT GCAATTCATAAAATAATTAGTTCCTAGAGACTTATCAAAC TACTCCCAAACGCAAGAATTAGATATAATAATATATTGCAT TGGGACAATTGGGCTAAAAAGATAATTGAGATTATGTATGA GCATAAGAATAGAAGAATCAAATAGCACAAAAAGAATTATA TGTTTATTTATACTTTTTCTTGTTTTCCCTGATTTTTTGTTTTA TACATTAGGGGTTGATAATTTTAGCATTTCACGATAATCTC AATTACATTGCTTTTTGTTTTTTTAAGAGCTAAAAATATTTGC AAAGATAATTTTCTAATAATAGTAGCGTTATTCATATTGTTG TGTTTTAACTGTTTGTTAAGTATGCTATTTAATATTGAACAG GCTTTAACATTTAAAGTTGTACTTTCAATATATAGCATCTTA ATAATGGCATAACGCTCCTCTTGTTATGCACAGACGTTGTGG TTATGTTCTGAAGAAATACTTAAGAGATCCGCTTTTTATTTG TTCGCATTTCTTTGCCTTATTGGCATTATAAGTATTCTTTTAC AGAAGACTGAGATTATACATGATAAAAGTATGATTCTTTTTC CTGAACCATCAGCATTTCATTGGTTTTTATACCTATCTTTTC ATTTTGTTTATACTATACAAGAGGGGGGGGCTACTATTGCT CTATATATTATCTTTGGGTATTGCGTTAGGTATCCAGAATTT AACAAATGTTGGTAGGCATTGTGATTAGTGTTTTTGTGATGAA AAAAATAACTATAAGGCAAACCTATTGTTATACTTTTGGGGGC ATGGATTTTTTCCATGATATTAAGTGATTTAGACATTTCTTAC TATACATCGCGGCTTGATTTTAAAAATACTACGAACCTATCA GTGCTTGTATATCTTTCAGGAATTGAAAGAGCTTTCTTGAAT TTTATTACAAGTTATGGTCTTGGTATTGGTTTTCAACAAATG GGAGTGAATGGGGAGATAGGAATATATCAACAAATTTTAGC TGAAC TTGATGCCCTATGTTAAATATATACGATGGCTCATT TATTTCTTCTAAGTTAATATCTGAGTTTGGGGTTATTGGTGCA TTAATGTGATTTTCTATTTTTTTTTATTTTTCCCGATTTTATCT GCGTTTCAAAAAAAGTAAGAGATATTCACCGCAGTATATTTT AGCATATAGCTTCTACATGTGTTTCTTCATCCCTCTTTTTATA CGTGGTGCTGGTTATATAAACCCCTATGTGTTTATGTTATTTT CATCAATATTTTTGTGCAAATATCACGCTAAAAATATCTTGA TGAAATCTAATGTCCAGATAGCTATATAATAGTAGATTATAT TATCATTATCACGTAAATTACATATTAATAGCATATATGATA ACTAGGACATAAATAATGTGCATTAAAAAAAAACCTAAGTT AATTAACGATATGGCCTTTATGGTGGTCTTAGGCTTCTTAA AGATATATTCTTAACAAAATTTTTATTTTGTTCAAATGTTAG GATTATTAGATTTCCATGTTATATTAGAAAAGATGGAAGTGT TAGTTTTGGAAAAGGTTTTACATCAGGTGTAGGATTACGAGT	

Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO.
	TGATGCATTTATGGATGCCGTAAGTTTCCATTGGAGAAAATGT TCAAATTAATGACTATGTTACATCGCGGCTATTAATAATGT CATTATTGGTAGAGATACATTAATAGCAAGTAAAGTATTTAT TAGTGATCATAATCATGGTATTTTTTCTAAATCCGATATCCA TAGTTCACCAACTATTATTCCTTCGTCTAGGCCCTTGAATCT GCACCTGTGTATATTGGAGAGCGTGTGTGGATTGGCGAAAA TGTGACAATATTACCAGGTGCGTGTATAGGTAATGGTGTAGT TATTGGCGCAAACAGTGTTGTTTCGTGGTGAGATTCCTAATAA TGTGATCATTGCTGGTGTTCAGCTAAAATTGTTAAAAAATA TAACTATGAGCGTATGCAATGGGAAAGAATATAGTTGTAAT ATCGGCTGTTAATTTTACAACCGGAGGCCCTTTACCGTACT AAAAAATGTGCTTACAGCAACTAAAGATAGAGCCGAATGTA AATTTATTGCACTGGTTCATAGCTCTGCTGAACTAATGGAAT TATTTCCGTGGGTTGAATTTATAGAGTATCCAGAAGTCAAGT CTTCGTGGGTAAAAGATTATTTTCGAATATATAACTTGCA ATAGATTATCTAAGGTGATTAAGGCAACTCATTGGGTATGCT TACATGATATTACAGCAAATGTTAGTGTACCCTATAGATTTG TTTATTGCCACAATCCTGCACCGTTCTATAAATATTTAAGCT ATCGAGATATTATAGGAGAACCTAAATTTTATCTTTTTTATC TTTTTTATGGGCTTTTATAACAATATCAATATAAAAAAGAACA CAGCAGTTTTTGTTCAGCAGCAGTGGCTAAAAAAGAATTC GAAAAAAAATATAAGTTAAAGAATGTTGTTGTTAGTCGCCC TGAAGATATTTGCCCTTTTGAAAGTGATGGTTTGGTAAGAAA TAATAATAAAAAGGATGTGAGGATATTTTACCAGCAGTGC CCCGTATATTTAAAACTTTGAAGTTATCATACGTGCTGCAC AAATATTACAAGATAAAAATATTCATTTTTATCTTACTTTTG ATGGTACTGAAAATAAGTATGCAAAAAGAATATATAAATTA GCTTCCGAAGTAAAAATGTACATTTCTCGGTTACCTTAAT GCAACCGAGATGGTTAACTTTTATCAAGATTCAGATATTATT TGTTTCCATCGAAACTAGAAACGTGGGGATTACCATTATCA GAAGCTAAAACATACAAAAAATGGATATTTGCGGCAGACTT ACCTTATGCTCATGAAGTTTTATATAACTATTCAAAAACTAG ATATTTTCCATTTGACGATGAGAAAATACTTGTTTCGCTACAT ATTAGAGTACACAAGTAAAAATATGCATGAAGATATAAAAA ATAGTAGGGTGAATTTTAATAATGATGCATTGACTGGTTTTG AACAGTTTATTGAATATATCCTCAAGGGGAACTGACGTGGTT TATATTATAATCGTTTCACATGGCCATGATGACTATATAGAA AATCTTTTATTAATTTAAAGTTGCCCTCTGGAAGATTTAAA ATAATAGTTCGTGATAACAAAAGTTCAATGGTTTTAAAAAA AACATGCGAAAAAAATTGCGTAACTTATTTGCATGGAGGGC AATATGGATTTGGACATAATAAACATAGCAGTGTGCATAT ATAATTAATAACTTCATGATTATGAATAATGATTATTTTCTCT TTCTTAACCCCGATGTATTCATAACCAGTGAAAGTTTGATTA ATTATGTTGATTATATAATTAGTAATGATTATAAGTTTAGCA	

Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO.
	CATTATGTCTTTATCGAGATTTTACTAAAAGCAAACATGATT ATCAATACGGAGTTTTCCAACCTTTATATGATTTTCTTTGTTT TTTTTATTGGGGGTGAATAAAAGTAAAATTAAGAAGGAAA ATATACTTTCTGATACTGTAGTTGATTGGTGTGCTGGCTCATT TATGCTTATTCATGCTTTAAGTTTCTTAAATGTGAATGGTTTT GATCAAAAATATTTTATGTATTGTGAAGATATTGACCTTTGT ATGCGTTTAAAATTAAGTGGAGTAGATCTTTACTATACTCCC CATTTTGATGCTATTCATTATGCGCAGCATGAAAATAGAAGA ATATTTACTAAAGCATTTTCGATGGCATATAAGGAGTATTACG CGCTACATATTACGGAAACCAATTCTTTCTTATAAAAACAT AGAAAATTACATCCGAACTGGTAAAGTGA	
Детокси- фициро- ванный ЕРА- белок, содержа- щий 4 оптимизи- рованные последо- вательно- сти N- гликози- лирова- ния	GSGGGDQNATGSGGGKLAEEAFDLWNECAKACVLDLKDGV SSRMSVDP AIADTNGQGV LHYSMVLEGGNDALKLAIDNALSIT SDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSTRQARGSWSLNWLVP IGHEKP SNIKVFHELNAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFV R AHESNEMQPTLAISHAGVSVMQAQPRREKRWSEWASGKVL CLLDPLDGVYNYLAQQRCLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDL D IKDNNNSTPTVISHRLHFPEGGSLAALTAHQACHLPLEAFTR HR QPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALAS PGSGGDLGEAIREQPEQARLALTLAAESERFVRQGTGNDEAG AASADVSLTCPVAKDQNRKGEAGPADSGDALLERNYPTG AEFLGDGGDVSFSTRGTQNWTVRLLQHRQLEERGYVFGY HGTFLEAAQSIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYA QDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRWSLPGFYRTGLTLA APEAAG EVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRVTILGWPLAERTV VIPS AIP TDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDL KLGS GGGDQNAT	13
Консенсу- сная последо- ватель- ность N- гликози- лирова- ния	Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой, за исключением Pro	14
Консенсу- сная последо- ватель- ность N- гликози- лирова- ния	Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты, за исключением Pro	15

Воплощения, описанные в данном документе, являются лишь иллюстративными и специалистам в данной области понятны или они могут установить, используя не более чем обычные эксперименты, многочисленные эквиваленты конкретных операций, описанных в данном документе. Все такие эквиваленты считаются входящими в объем настоящего изобретения и охвачены следующей формулой изобретения.

Все ссылки (включая патентные заявки, патенты и публикации), указанные в данном описании изобретения, включены в данное описание посредством ссылки во всей своей полноте и для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, или патент, или патентная заявка патент была конкретно и независимо указана как включенная посредством ссылки во всей своей полноте и для всех целей.

7. ВОПЛОЩЕНИЯ

Воплощения 1:

1. Прокариотическая клетка-хозяин, содержащая:
 - а. кластер генов *rfb* (урес138) (SEQ ID NO: 12), кластер генов *rfb* (урес163) или кластер генов *rfb* (урес177);
 - б. нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу; и
 - в. нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14).
2. Прокариотическая клетка-хозяин, содержащая:
 - а. *rmlB*, *rmlD*, *rmlA*, *rmlC*, *wzx*, *wekA*, *wekB*, *wzy*, *wbbJ*, *wbbK* и *wbbL*;
 - б. нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу;
 - в. нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14).
3. Прокариотическая клетка-хозяин, содержащая:
 - а. нуклеотидную последовательность, кодирующую:
 1. dTDP-Глюкозо-4,6-дегидратазу;

2. dTDP-6-Дезокси-D-глюкозо-3,5-эпимеразу;
 3. Глюкозо-1-фосфат-тимидилитрансферазу;
 4. dTDP-4-дегидрорамнозо-3,5-эпимеразу;
 5. O-антиген-флиппазу;
 6. dTDP-Rha:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP α -1,3-рамнозилтрансферазу;
 7. UDP-Glc:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP β -1,6-гликозилтрансферазу;
 8. O-антиген-полимеразу;
 9. O-ацетилтрансферазу;
 10. UDP-Glc:Rha-GlcNAc-UPP α -1,3-гликозилтрансферазу и
 11. dTDP-Rha:GlcNAc-UPP α -1,3-рамнозилтрансферазу;
- б. нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу;
- в. нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14).
4. Клетка-хозяин по аспекту 0, где:
 - а. dTDP-Глюкозо-4,6-дегидратаза содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична dTDP-глюкозо-4,6-дегидратазе, кодируемой SEQ ID NO: 1;
 - б. dTDP-6-Дезокси-D-глюкозо-3,5-эпимераза содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична dTDP-6-дезокси-D-глюкозо-3,5-эпимеразе, кодируемой SEQ ID NO: 2;
 - в. Глюкозо-1-фосфат-тимидилитрансфераза содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична глюकोзо-1-фосфат-тимидилитрансферазе, кодируемой SEQ ID NO: 3;

г. dTDP-4-дегидрорамнозо-3,5-эпимераза содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична dTDP-4-дегидрорамнозо-3,5-эпимеразе, кодируемой SEQ ID NO: 4;

д. O-антиген-флиппаза содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична O-антиген-флиппазе, кодируемой SEQ ID NO: 5;

е. рамнозил-трансфераза (11) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична рамнозил-трансферазе, кодируемой SEQ ID NO: 6;

ж. гликозилтрансфераза (12) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична гликозилтрансферазе, кодируемой SEQ ID NO: 7;

з. O-антиген-полимераза содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична O-антиген-полимеразе, кодируемой SEQ ID NO: 8;

и. O-ацетилтрансфераза содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична O-ацетилтрансферазе, кодируемой SEQ ID NO: 9;

к. гликозилтрансфераза (10) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична гликозилтрансферазе, кодируемой SEQ ID NO: 10; и

л. рамнозилтрансфераза (11) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%,

85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична рамнозилтрансферазе, кодируемой SEQ ID NO: 11.

5. Клетка-хозяин по любому из аспектов 1-0, которая представляет собой *Escherichia coli*.

6. Клетка-хозяин по аспекту 0, где по меньшей мере один из: гена *waaL*, гена *gtrA*, гена *gtrB*, гена *gtrS* и кластер *rfb* удален или функционально инактивирован в геноме клетки-хозяина.

7. Клетка-хозяин по любому из аспектов 1-0, где белок-носитель выбран из группы, состоящей из детоксифицированного экзотоксина А из *P. aeruginosa* (EPA), CRM197, мальтозосвязывающего белка (MBP), дифтерийного анатоксина, столбнячного анатоксина, детоксифицированного гемолизина А из *S. aureus*, фактора агглютинации А, фактора агглютинации В, FimH *E. coli*, FimHC *E. coli*, термолабильного энтеротоксина *E. coli*, детоксифицированных вариантов термолабильного энтеротоксина *E. coli*, субъединицы В холерного токсина (СТВ), холерного токсина, детоксифицированных вариантов холерного токсина, белка Sat *E. coli*, домена-пассажира белка Sat *E. coli*, пневмолизина *Streptococcus pneumoniae* и его детоксифицированных вариантов, AcrA *C. jejuni* и природных гликопротеинов *C. jejuni*.

8. Клетка-хозяин по любому из аспектов 1-7, где белок-носитель содержит оптимизированную консенсусную последовательность N-гликозилирования, Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15).

9. Клетка-хозяин по любому из аспектов 1-8, где белок-носитель содержит одну или более рекомбинантно введенных консенсусных последовательностей.

10. Клетка-хозяин по любому из аспектов 1-9, где белок-носитель содержит сигнальную последовательность для нацеливания белка-носителя в периплазматическое пространство клетки-хозяина.

11. Клетка-хозяин по аспекту 0, где сигнальная последовательность выбрана из группы, состоящей из сигнальной последовательности из DsbA *E. coli*, порина А внешней мембраны (OmpA) *E. coli*, мальтозосвязывающего белка (MalE) *E. coli*, пектатлиазы (PelB) *Erwinia carotovora*, FlgI, NikA или

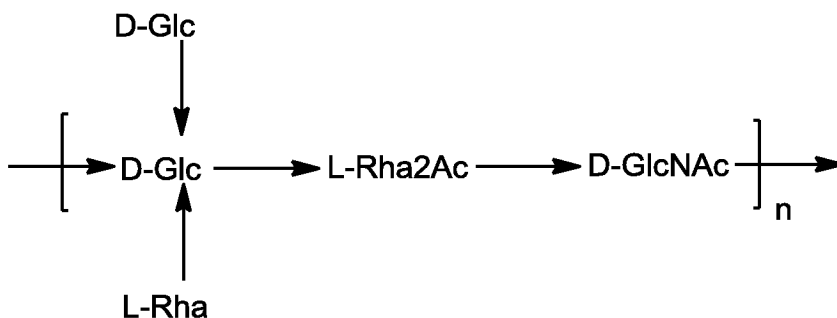
эндоксилазазы (ХунА) *Bacillus sp*, термолабильного энтеротоксина LTIIb *E. coli*, эндоксилазазы ХунА *Bacillus* или флагеллина (FlgI) *E. coli*.

12. Способ получения *N*-гликозилированного белка-носителя, включающий:

- а. культивирование клетки-хозяина по любому из аспектов 1-0; и
- б. очистку *N*-гликозилированного белка-носителя.

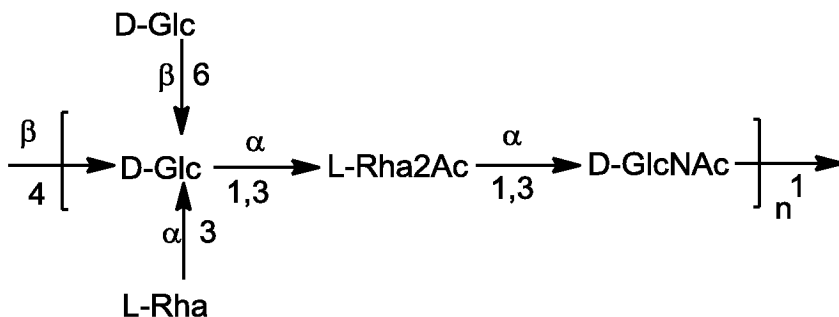
13. *N*-гликозилированный белок-носитель, полученный способом по аспекту 0.

14. *N*-гликозилированный белок-носитель по аспекту 0, содержащий соединение формулы O25B:



где n представляет собой целое число от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20.

15. *N*-гликозилированный белок-носитель по аспекту 0, содержащий соединение формулы O25B':

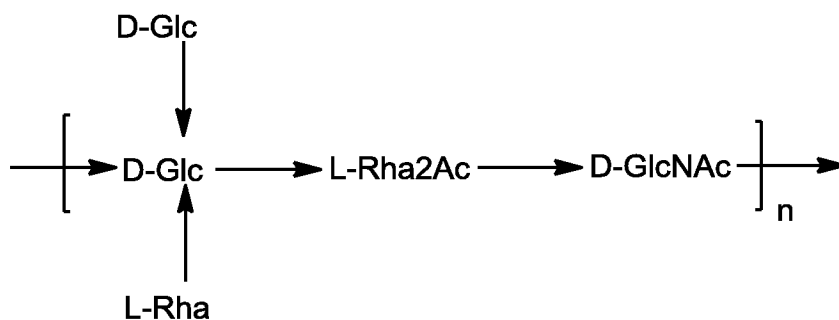


где n представляет собой целое число от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20.

16. Выделенный О-антиген из штамма O25В, такого как ирес138, ирес163 или ирес177.

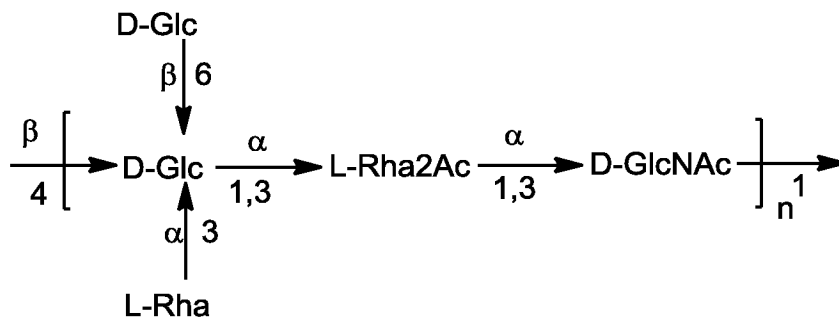
17. Белок-носитель, *N*-связанный с О-антигеном по аспекту 0.

18. Группа выделенных макромолекул, содержащая структуру формулы O25В:



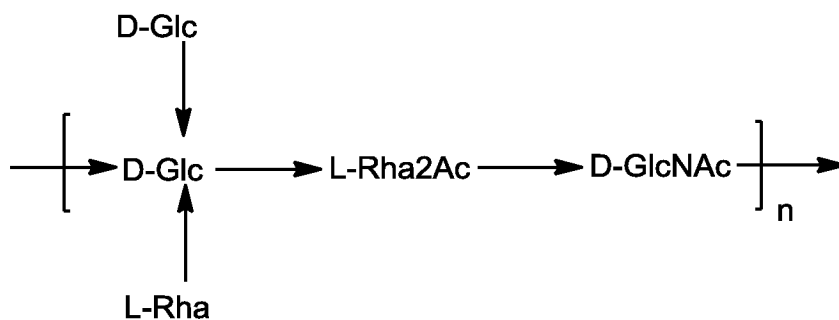
где *n* представляет собой целое число от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20.

19. Группа выделенных макромолекул, содержащих структуру формулы O25В':



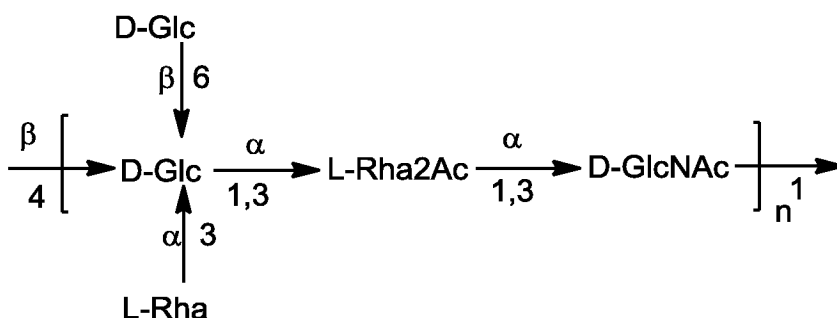
где *n* представляет собой целое число от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20.

20. Фармацевтическая композиция, содержащая макромолекулу, имеющую структуру формулы O25В:



где n представляет собой целое число от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20.

21. Фармацевтическая композиция, содержащая макромолекулу, имеющую структуру формулы O25B':



где n представляет собой целое число от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20.

22. Фармацевтическая композиция по аспекту 20, где структура формулы O25B ковалентно связана с остатком Asn в белке-носителе.

23. Фармацевтическая композиция по аспекту 21, где структура формулы O25B' ковалентно связана с остатком Asn в белке-носителе.

24. Фармацевтическая композиция по аспекту 0 или 21, где остаток Asn находится в консенсусной последовательности Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой за исключением Pro (SEQ ID NO: 14).

25. Прокариотическая клетка-хозяин по любому из аспектов 1-11, где указанная олигосахарил-трансфераза гетерологична клетке-хозяину.

26. Прокариотическая клетка-хозяин по любому из аспектов 1-11, где указанная олигосахарил-трансфераза представляет собой олигосахарил-трансферазу *pglB* из *C. jejuni*.

27. Прокариотическая клетка-хозяин по любому из аспектов 1-11, где указанный белок-носитель гетерологичен клетке-хозяину.

28. Прокариотическая клетка-хозяин по любому из аспектов 1-11, 25, 26 или 27, где указанный белок-носитель не является белок *E. coli*.

29. Способ получения олигосахарида, содержащего L-Rha(2Ac), включающий инкубирование сахара или олигосахарида с рамнозил-трансферазой, содержащей SEQ ID NO: 11, где сахарид или олигосахарид содержит концевой D-GlcNAc.

30. Способ по аспекту 29, где L-Rha(2Ac) и D-GlcNAc связаны с помощью альфа-1,3-связи.

31. Способ по аспекту 29, где указанная инкубация происходит *in vitro*.

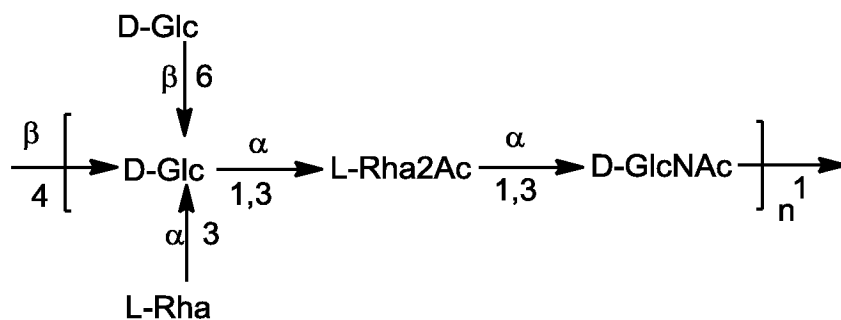
32. Способ по аспекту 29, где указанный олигосахарид получают в клетке-хозяина, которая рекомбинантно экспрессирует рамнозил-трансферазу, содержащую SEQ ID NO: 11.

Воплощения 2:

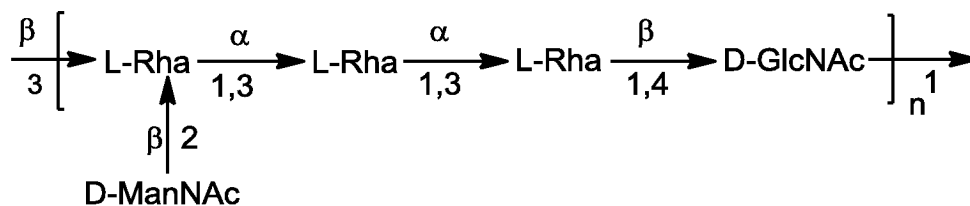
1. Композиция, содержащая (1) биоконъюгат O25B, содержащий антиген O25B *E. coli*, ковалентно связанный с остатком Asp белка-носителя, (2) биоконъюгат O1A, содержащий антиген O1A *E. coli*, ковалентно связанный с остатком Asp белка-носителя, (3) биоконъюгат O2, содержащий антиген O2 *E. coli*, ковалентно связанный с остатком Asp белка-носителя, и (4) биоконъюгат O6, содержащий антиген O6 *E. coli*, ковалентно связанный с остатком Asp белка-носителя.

2. Композиция по аспекту 1, где антиген O25B, антиген O1A, антиген O6 и антиген O2 содержат следующие формулы, соответственно:

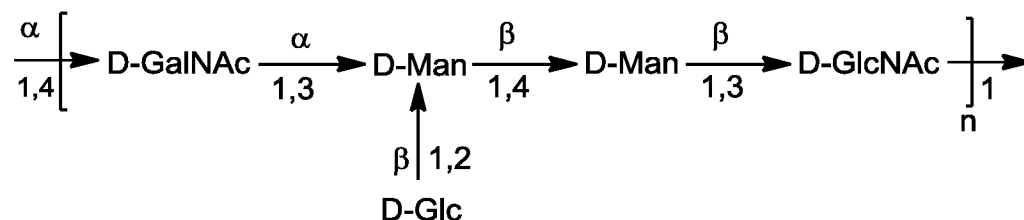
а Формула O25B'



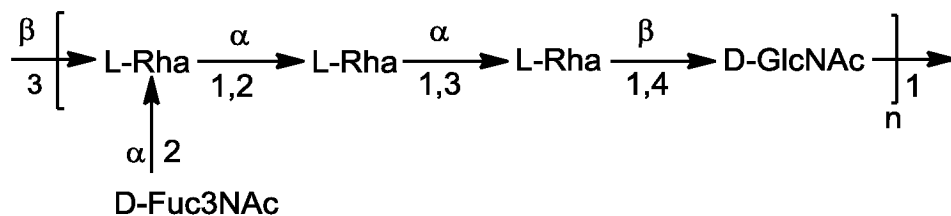
б. Формула O1A'



в. Формула O6Glc'



г. Формула O2'



3. Композиция по аспекту 1 или 2, где белок-носитель выбран из группы, состоящей из детоксифицированного экзотоксина A из *P. aeruginosa* (EPA), CRM197, мальтозосвязывающего белка (MBP), дифтерийного анатоксина, столбнячного анатоксина, детоксифицированного гемолизина A из *S. aureus*, фактора агглютинации A, фактора агглютинации B, FimH *E. coli*, FimHC *E. coli*, термолabileного энтеротоксина *E. coli*, детоксифицированных вариантов термолabileного энтеротоксина *E. coli*, субъединицы B холерного токсина (СТВ), холерного токсина, детоксифицированных вариантов холерного токсина, белка Sat *E. coli*, домена-пассажира белка Sat *E. coli*, пневмолизина

Streptococcus pneumoniae и его детоксифицированных вариантов, AcrA *C. jejuni* и природных гликопротеинов *C. jejuni*.

4. Композиция по аспекту 3, где белок-носитель представляет собой детоксифицированные EPA, CRM197 или MBP.

5. Композиция по любому из аспектов 1-4, где остаток Asn белка-носителя расположен в консенсусной последовательности Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO: 15).

6. Способ лечения у субъекта инфекции внекишечной патогенной *Escherichia coli*, включающий введение субъекту эффективного количества композиция по любому из аспектов 1-5.

7. Способ предупреждения у субъекта инфекции внекишечной патогенной *Escherichia coli*, включающий введение субъекту эффективного количества композиция по любому из аспектов 1-5.

8. Способ индукции у субъекта иммунного ответа против внекишечной патогенной *Escherichia coli*, включающий введение субъекту эффективного количества композиция по любому из аспектов 1-5.

9. Способ индукции у субъекта продуцирования опсонофагоцитирующих антител, специфичных к внекишечной патогенной *Escherichia coli*, включающий введение субъекту эффективного количества композиция по любому из аспектов 1-5.

10. Способ по аспекту 6, 8 или 9, где у субъекта диагностирована инфекция мочевых путей.

11. Способ по аспекту 7, 8 или 9, где субъект имеет риск развития инфекции мочевых путей.

12. Способ по аспекту 6, 8 или 9, где у субъекта диагностирована бактериемия.

13. Способ по аспекту 7, 8 или 9, где субъект имеет риск развития бактериемии.

14. Способ по аспекту 6, 8 или 9, где у субъекта диагностирован сепсис.

15. Способ по аспекту 7, 8 или 9, где субъект имеет риск развития сепсиса.

16. Способ по любому из аспектов 6-16, где субъект представляет собой человека.

Перечень последовательностей

<110> GlycoVaxyn AG

<120> НОВЫЙ ПОЛИСАХАРИД И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

<130> 13064-042

<140> ТВА

<141> та же дата подачи

<150> 61/943,710

<151> 2014-02-24

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1086

<212> ДНК

<213> E. Coli

<220>

<223> rmlB (upec138)

<400> 1

gtgaagatac ttgttactgg tggcgcagga tttattgggt ctgctggtgt tcgtcacata	60
ataaataata cgcaagatag tgttgттаат 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 gctcggaaatt attggtctgg tctggatgat	360
gaaaagaaaa aaaacttccg ttttcatcat atttctactg atgaggtgta tggtgactta	420
ccccatccgg atgaagtaaa tagcaatgaa acgttgccgc tatttacgga aacgacagca	480
tacgcgcaa gtagtcata ttctgcttct aaagcttcca gcgatcattt ggttcgcgca	540
tggaaacgta cttatggttt accgaccatt gtgactaatt gctcgaacaa ctatggctct	600
tatcatttcc cggaaaagct tattccactg gttattctta attcactgga aggtaaggca	660
ttacctattt atggcaaagg agatcagatc cgcgactggg tgtatgtaga ggatcatgct	720
cgagcgttat ataccgtcgt aaccgaagg aaagcggcg aacttataa cattggtgga	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 acctgtcaa taaaaatgg	1020
gttgataatg tgaaaagtgg tgcctatcaa tcgtggattg aacagaacta tgagggccgc	1080
cagtaa	1086

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

<220>
<223> rmlD (upec138)

<400> 2
atgaatatcc tccttttttg caaaacaggg caggtagggt gggaactaca gcgtgctctg 60
gcacctctgg gtaatttgat tgctcttgat gttcactcca ctgattactg tggtgatttt 120
agtaatcctg aagggtgtagc tgaaacgta agaagcattc ggctgatata 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 gcgtctggca aaagagcgtg aagaattagc cgttattaat 540
gatcagtttg gtgcgccaac tggcgcagag ttactggctg attgtacggc acatgctatt 600
cgtgtggcac tgaataaacc ggaagtcgca ggcttgtacc atctggtagc tagtgggtacc 660
acaacgtggc acgattatgc tgcgctgggt tttgaagagg cgcgcaaagc aggcattccc 720
cttgactca acaagctcaa cgcagtacca acaacagcct atcctacacc agctcgtcgt 780
ccacataact ctgccttaa tacagaaaaa tttcagcaga actttgcgct tgtcttgcct 840
gactggcagg ttggcgtgaa acgaatgctt aacgaattat ttacgactac agcaatttaa 900

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

<220>
<223> rmlA (upec138)

<400> 3
atgaaaacgc gtaaaggat tattttggcg ggtgggtctg gtactcgtct ttatcctgtg 60
acgatggccg tcagtaaaca gctgttaccg atttatgata aaccgatgat ctattaccgg 120
ctctctacac tgatgttagc gggatattcg gatattctga ttatcagtac accacaggat 180
actcctcgtt ttcaacaact gctgggtgac gggagccagt ggggcctgaa tcttcagtac 240
aaagtgcaac cgagtccgga tggctcttgc caggcgttta ttatcgggtg agagtttatt 300
ggtaggtgat attgtgcttt ggtacttggg gataatatct tctacggcca cgacctgocg 360
aagttaatgg acgtagctgt taacaaagaa agtgggtgcaa cggatatttgc ctatcacggt 420

aatgatcctg aacgttatgg tgtcgtggag tttgataata acggtactgc aattagcctg 480
gaagaaaaac cgctggaacc aaaaagtaac tatgcgggta ctgggcttta tttctatgac 540
aatgacgttg tggaaatggc gaaaaacctt aagccttctg cccgaggtga actggaaatt 600
accgatatta accgtattta tatggaacaa ggacgtttgt ctgtcgctat gatggggcgt 660
ggctatgcat ggctggatac agggacgcat caaagtctta ttgaagcaag caacttcatt 720
gccaccattg aagagcgcca gggactaaag gtttcctgtc cggaagaaat tgcttatcgt 780
aaagggttta ttgatgctga gcaggtaaaa gtattagccg aaccgttgaa gaaaaatgct 840
tatggtcagt atctgctcaa aatgattaa ggttattaa 879

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

<220>
<223> rmlC (upec138)

<400> 4
atgaacgtaa ttaaaactga aattcctgat gtgctgattt ttgaaccaa agtttttggg 60
gatgaacgtg gcttcttttt tgagagtttt aatcagagga tttttgaaga agcagtaggt 120
cgtaaggttg agtttgttca ggataacat tctaagtcca gtaaaggtgt tttacgtggt 180
cttcattatc agttagaacc ttatgctcaa ggaaaactgg tgcgctgtgt tgttggcgag 240
gtttttgatg ttgcggttga tattcgtaaa tcgtcaccta catttgggaa atggggtggg 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> ДНК
<213> E. Coli

<220>
<223> wzx (upec138)

<400> 5
atgtctctct taaaacatag tatatggaat gttgcgggct actttatacc aacattaatt 60
gcaattcccg cctttggatt aattgcgagg aaaattggtg tagaactatt tggtttgtat 120
acgttagcaa tgatttttat agggatgca agtatatttg atgctggggt aacaagagct 180
gttgtgcgtg aaatagcatt actaaaaaac agagtggacg attgtaatac gataatagta 240

acttctatta	tcgctgtgat	atTTTTtaggg	tttatcggag	gCGGGGGagt	gTTTTctgctt	300
aaaggcgata	ttattgaact	gttaaataatc	tcaccaatat	attacgcca	ttcgataaag	360
tctctagtat	tattatcatc	tctgatacct	gtattccttag	tcacgcaaat	actattagca	420
gagcttgagg	gtcgggaata	TTTTgggatt	ctaaatatac	aaaaaagtgt	agggaattct	480
ttaattgcag	ggttacctgc	attatTTTgtt	ttaattaatc	aaacgctTTT	ttctgcaatt	540
attggtgtag	cgattgcaag	agttatatgc	ttgtggTtaa	gctacattat	gagcagggaa	600
agaataacta	tcgatatctc	atTTTTTTca	ataactgttt	taaagcgggt	atTTtagatat	660
ggcgggtggg	taactataag	taacataata	tctcctatat	tagcgagtat	ggatagattt	720
attctatccc	atatccaggg	agcatcaaaa	atatcattct	atacagtccc	taatgagctg	780
gtaactaggc	ttggaatagt	tccaggctct	cttgggaaag	ctgTTTTtcc	aaaattaagt	840
catgcaagga	atTTTtacagc	gtcatatgca	gagcaaaaaa	aagcttatat	attaatgact	900
gtcattgtaa	tgctTTTggt	tttattTgta	tattattacg	caaagTTtat	tttaacattg	960
tgatggggg	ctgagtatgc	agggatttcg	gtcgaatat	tacggattat	gcttataggg	1020
tatTTTTta	actgTTattc	acaaatctct	tttgccaaca	tacaggcctt	tggaaaagca	1080
aaataactg	catacatcca	tatgatggaa	tttattcctt	atTTgataat	gTTtatatata	1140
atTTcaaagg	aatatggggg	tattggtggt	gcgtggTtat	ggacaattcg	agtaataatt	1200
gatTTTTtga	tgctTTTata	tatgagttat	cgTTgtaata	atcttatgaa	aaaagggtag	1260

<210> 6
 <211> 966
 <212> ДНК
 <213> E. Coli

<220>
 <223> wekA (upec138)

<400> 6						
atgatatata	ttgtggtatt	aaattggaat	ggggctatag	ataccattaa	ttgtgttaaa	60
agTTtaatgg	atTTaaatgt	tagcgattat	aaaattatca	ttgttgataa	ctgTTctatg	120
gataactcat	atgatactat	aaaagaaaat	cttaattcat	tatatattgc	tgataaaaagt	180
atcattgagg	tgaagtatga	ggatagaaat	aaatataaaa	ccttagaaaa	cgataaaaatc	240
atattaatac	aatctccgca	aaataatggg	tacgcaagtg	gtaataatat	tgccatagag	300
ttcgctctta	atcaggagaa	tatgaaatac	gtctgggttc	tgaataatga	tactgaagtg	360
gataaagagg	ctTTaactca	tttaattagt	aaatgtgatt	cagataaaaag	tatagggtatt	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 tttgcctcag agcaaaagca aagaacttta aattaggtat ttgctcagaa	720
agtttggttt atcataaaat aggtgcaagt actgatgggg gaaagagcat gatggctgat	780
ctttgctcaa taaaaaatag gctggtcatt acagaaaggt tttatcccca atattattgg	840
acggtatggg tgtcactttt tgttgtagca ttttaaccgtg ctagaagagg tgagtttaat	900
aagatgaaaa gatgtttgaa tgttatgttt aacttcaaac gaaacaaagg tagcaaatgc	960
cattag	966

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

<220>
 <223> wekB (upec138)

<400> 7	
atgaaagtg 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 aatattcggg	240
aggaaattaa aaaaaattga tggtttgat 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 agataaaaat	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> ДНК
<213> E. Coli

<220>
<223> wzy (upec138)

<400> 8
atgagcataa gaatagaaga atcaaatagc acaaaaagaa ttatatgttt atttataactt 60
tttcttgttt tccctgattt tttgttttat acattagggg ttgataattt tagcatttca 120
acgataatct caattacatt gctttttggt tttttaagag ctaaaaatat ttgcaaagat 180
aattttctaa taatagtagc gttattcata ttgttggtt ttaactgttt gttaagtatg 240
ctatttaata ttgaacaggc tttaacattt aaagttgtac tttcaatata tagcatctta 300
ataatggcat acgtctcctc ttgttatgca cagacgttgt ggttatgttc tgaagaaata 360
cttaagagat ccgtctttta tttgttcgca tttctttgcc ttattggcat tataagtatt 420
cttttacaga agactgagat tatacatgat aaaagtatga ttctttttcc tgaaccatca 480
gcatttgcat tggtttttat acctatcttt tcattttggt tatactatac aagagggggg 540
gggctactat tgctctatat attatctttg ggtattgcgt taggtatcca gaatttaaca 600
atgttggtag gcattgtgat tagtgttttt gtgatgaaaa aaataactat aaggcaaact 660
attggtatac ttttgggggc atggattttt tccatgatat taagtgattt agacatttct 720
tactatacat cgcggttga ttttaaaaat actacgaacc tatcagtgct tgtatatctt 780
tcaggaattg aaagagcttt cttgaatttt attacaagtt atggctttgg tattggtttt 840
caacaaatgg gagtgaatgg ggagatagga atatatcaac aaattttagc tgaacttgat 900
gccctatgt taaatatata cgatggctca tttatttctt ctaagttaat atctgagttt 960
ggggttattg gtgcattaat gtgtattttc tatttttttt atttttcccg attttatctg 1020
cgtttcaaaa aaagtaagag atattcaccg cagtatattt tagcatatag cttctacatg 1080
tgtttcttca tccctctttt tatacgtggg gctgggtata taaacccta tgtgtttatg 1140
ttattttcat caatattttt gtgcaaatat cacgctaaaa atatcttgat gaaatctaat 1200
gtccagatag ctatataa 1218

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

<220>
<223> wbbJ (upec138)

<400> 9
atgtgcatta aaaaaaact taagttaatt aaacgatatg gcctttatgg tggcttagg 60

cttcttaaag atatattcctt aacaaaattht ttatthttggtt caaatgttag gattattaga 120
 tttccatgtht atattagaaa agatggaagt gttagthtttg gaaaaggtht tacatcaggt 180
 gtaggattac gagttgatgc atthtatggat gccgtagtht ccattggaga aatgtthcaa 240
 attaatgact atgttcacat cgcggctatt aataatgtca ttattggtag agatacatta 300
 atagcaagta aagtatthtat tagtgatcat aatcatggta thttthtctaa atccgatatc 360
 catagthcac caactattat tccttcgtct aggcccttg aatctgcacc tgtgtatatt 420
 ggagagcgtg tgtggattgg cgaaaatgtg acaatattac caggtgcgtg tataggtaat 480
 ggtgtagthta ttggcgcaaa cagtgtthgtt cgtggtgaga thcctaataa tgtgatcatt 540
 gctggthttc cagctaaaat tgtthaaaaa tataactatg agcgtatgca atgggaaaga 600
 atatag 606

<210> 10
 <211> 1101
 <212> ДНК
 <213> E. Coli

<220>
 <223> wbbK (upec138)

<400> 10
 atgggaaaga atatagthgt aatatcggct gthtaatthta caaccggagg cccctthacc 60
 gtactaaaaa atgtgcttac agcaactaaa gatagagccg aatgthaaatt tattgcactg 120
 gthcatagct ctgctgaact aatggaatta thtccgtggg thgaatthtat agagthatoca 180
 gaagtcaagt cthcgtgggt taaaagatta ththtcgaat atataacttg caatagatta 240
 tctaaggthga thtaaggcaac tcattgggta tgcttacatg atattacagc aatgtthtagt 300
 gtaccctata gaththgtthta thgccacaat cctgcaccgt thcataaata ththaagctat 360
 cgagatatta taggagaacc thaaatthtat cthththtatc ththththtatgg gctththtatac 420
 aatatcaata thaaaaagaa cacagcagth thtgthtcagc agcagthggct aaaaaagaa 480
 thcgaaaaaa aatataagth aaagaatgth gthgthtagth gccctgaaga thththgcct 540
 thtgaaagth atggththgtt aagaataat aataaaaagg atgtgaggat atththacca 600
 gcagthcccc gtataththaa aactththgaa gthtatcatac gtgctgcaca aataththaca 660
 gataaaaaata thcathththta thctthctthth gatgthgthactg aaaaataagth thgcaaaaaga 720
 atatataaat tagctthccga actgaaaaat gtacaththcc thcggththacct thaatgcaacc 780
 gagatgththa actthththata agaththcagat atthththgtt thccatcgaa actagaaaacg 840
 thgggattac cattatcaga agctaaaaa thacaaaaaat ggatathththgc ggcagactth 900
 cthththgctc atgaagththth atataactat thcaaaaacta gatathththcc atththgacgat 960
 gagaaaatac thgtthcgcta cataththtagg thacacaagth aaaaatagca thgaagatata 1020

aaaaatagta ggggtgaattt taataatgat gcattgactg gttttgaaca gtttattgaa 1080
tatatcctca aggggaactg a 1101

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

<220>
<223> wbbL (upec138)

<400> 11
atgattatga ataatgatta ttttctcttt cttaaccccg atgtattcat aaccagtgaa 60
agtttgatta attatgttga ttatataatt agtaatgatt ataagtttag cacattatgt 120
ctttatcgag attttactaa aagcaaacat gattattcaa tacggagttt tccaacttta 180
tatgattttc tttgttcttt tttattgggg gtgaataaaa gtaaaattaa gaaggaaaat 240
atactttctg atactgtagt tgattgggtg gctggctcat ttatgcttat tcatgcttta 300
agtttcttaa atgtgaatgg ttttgatcaa aaatatttta tgtattgtga agatattgac 360
ctttgatgac gtttaaaatt aagtggagta gatctttact atactcccca ttttgatgct 420
attcattatg cgcagcatga aatagaaga atatttacta aagcatttcg atggcatata 480
aggagtatta cgcgctacat attacggaaa ccaattcttt cttataaaaa ctatagaaaa 540
attacatccg aactggtaaa gtga 564

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

<220>
<223> кластер генов rfb(upec138) E.coli

<400> 12
gtgaagatac ttgttactgg tggcgcagga tttattgggt ctgctggtgt 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 gctcgggaatt attggtctgg tctggatgat 360
gaaaagaaaa aaaacttccg ttttcatcat atttctactg atgaggtgta tggtgactta 420
cccatccgg atgaagtaaa tagcaatgaa acgttgccgc tatttacgga aacgacagca 480
tacgcgcaa gtagtcata ttctgcttct aaagcttcca gcgatcattt ggttcgogca 540
tggaaacgta cttatggttt accgaccatt gtgactaatt gctcgaacaa ctatggctct 600

tatcatttcc	cggaaaagct	tattccactg	gttattctta	attcactgga	aggtaaggca	660	
ttacctat	atggcaaagg	agatcagatc	cgcgactggt	tgtatgtaga	ggatcatgct	720	
cgagcgttat	ataccgtcgt	aaccgaaggt	aaagcgggcg	aaacttataa	cattggtgga	780	
cacaacgaaa	agaaaaacat	cgacgtagtg	ttcactat	gtgatttggt	ggatgagata	840	
gtcccgaaag	agaaatctta	ccgcgagcaa	attacttatg	ttaccgatcg	tccgggacac	900	
gatcgccg	atgcgattga	tgctgagaag	attggtcgcg	aattgggatg	gaaaccacag	960	
gaaacgtttg	agagtgggat	tcgtaaaacg	gtggaatggt	acctgtccaa	tacaaaatgg	1020	
gttgataatg	tgaaaagtgg	tgccatcaaa	tcgtggattg	aacagaacta	tgagggccgc	1080	
cagtaatgaa	tatcctcctt	tttggcaaaa	cagggcaggt	aggttgggaa	ctacagcgtg	1140	
ctctggcacc	tctgggtaat	ttgattgctc	ttgatgttca	ctccactgat	tactgtgggtg	1200	
at	tttagtaa	tcctgaaggt	gtagctgaaa	ccgtaagaag	cattcggcct	gatattattg	1260
tcaacgcagc	cgctcacacc	gcagtagaca	aagcagaatc	agaaccgaag	tttgcacaat	1320	
tactgaacgc	gacgagtgtc	gaagcgatcg	cgaaagcagc	caatgaagtc	ggcgcctggg	1380	
ttattcacta	ctctactgac	tacgtat	tcgggaccgg	tgaaatacca	tggcaggagg	1440	
aggatgcaac	cgccaccgcta	aatgtttacg	gtgaaaccaa	gttagcggga	gaaaaagcat	1500	
tacaagagca	ttgtgcgaag	caccttattt	tccggaccag	ctgggtctat	gcaggtaaag	1560	
gaaataactt	cgccaaaaca	atgttgctgc	tggcaaaaga	gcgtgaagaa	ttagccgtta	1620	
ttaatgatca	gtttggtgcg	ccaactggcg	cagagttact	ggctgattgt	acggcacatg	1680	
ctattcgtgt	ggcactgaat	aaaccggaag	tcgcaggcct	gtaccatctg	gtagctagtg	1740	
gtaccacaac	gtggcacgat	tatgctg	tcggttttga	agaggcgcgc	aaagcaggca	1800	
ttccccttgc	actcaacaag	ctcaacgcag	taccaacaac	agcctatcct	acaccagctc	1860	
gtcgtccaca	taactctcgc	cttaatacag	aaaaatttca	gcagaacttt	gcgcttgtct	1920	
tgctgactg	gcaggttggc	gtgaaacgaa	tgcttaacga	attat	tttacg	actacagcaa	1980
tttaatagtt	tttgcac	ctt	gttcgtaatg	gtggagcaag	atgtattaaa	aggaaatgatg	2040
aaatgaaaac	gcgtaaaggt	attat	tttgg	cggggtggttc	tggtactcgt	ctttatcctg	2100
tgacgatggc	cgtcagtaaa	cagctgttac	cgat	ttatga	taaaccgatg	atctattacc	2160
cgctctctac	actgatgtta	gcgggtattc	gcgatattct	gattatcagt	acaccacagg	2220	
atactcctcg	ttttcaacaa	ctgctgggtg	acgggagcca	gtggggcctg	aatcttcagt	2280	
acaaagtgca	accgagtccg	gatggtc	ttg	cgcaggcgtt	tattatcggt	gaagagttta	2340
ttggtggtga	tgattgtgct	ttggtacttg	gtgataatat	cttctacggc	cacgacctgc	2400	
cgaagttaat	ggacgtagct	gttaacaaaag	aaagtgg	gtgc	aacggtat	ttgcctatcacg	2460
ttaatgatcc	tgaacgttat	ggtgtcgtgg	agtttgataa	taacgg	tact	gcaattagcc	2520

tggaagaaaa	accgctggaa	ccaaaaagta	actatgcggt	tactgggctt	tatttctatg	2580
acaatgacgt	tgtggaaatg	gcgaaaaacc	ttaagccttc	tgcccgaggt	gaactggaaa	2640
ttaccgatat	taaccgtatt	tatatggaac	aaggacgttt	gtctgtcgct	atgatggggc	2700
gtggctatgc	atggctggat	acagggacgc	atcaaagtct	tattgaagca	agcaacttca	2760
ttgccacat	tgaagagcgc	cagggactaa	aggtttcctg	tccggaagaa	attgcttatac	2820
gtaaaggggt	tattgatgct	gagcaggtaa	aagtattagc	cgaaccgttg	aagaaaaatg	2880
cttatgggtca	gtatctgctc	aaaatgatta	aaggttatta	ataagatgaa	cgtaattaa	2940
actgaaattc	ctgatgtgct	gatttttgaa	ccaaaagttt	ttggggatga	acgtggcttc	3000
ttttttgaga	gttttaataca	gaggatTTTT	gaagaagcag	taggtcgtaa	ggttgagttt	3060
gttcaggata	accattctaa	gtccagtaaa	gggtgttttac	gtggcttca	ttatcagtta	3120
gaaccttatg	ctcaaggaaa	actggtgcbc	tgtgttggtg	gcgaggTTTT	tgatgttgcg	3180
gttgatattc	gtaaatcgtc	acctacattt	gggaaatggg	ttggggtgaa	tttgtctgct	3240
gagaataagc	gtcagttgtg	gattcctgag	ggatttgcac	atggTTTTTT	ggtgctgagt	3300
gatttagcag	aagTTTTata	taaaacgaat	caatattatg	ctccatcaca	tgaaaaaaaa	3360
attatatgga	atgacctctt	gcttaatat	aaatggccga	gcacagcaact	gatcaactctg	3420
tctgataagg	atgcaaatgg	ggaaagattt	gaactaagtg	agTTTTgaaa	tgtctctctt	3480
aaaacatagt	atatggaatg	ttgcgggcta	ctttatacca	acattaattg	caattcccgc	3540
ctttggatta	attgcgagga	aaattggtgt	agaactatTT	ggTTTTgtata	cgttagcaat	3600
gatttttata	gggtatgcaa	gtatatttga	tgctgggtta	acaagagctg	ttgtgcgtga	3660
aatagcatta	ctaaaaaaca	gagtggacga	ttgtaatacg	ataatagtaa	cttctattat	3720
cgctgtgata	tttttaggg	ttatcggagg	cgggggagtg	tttctgctta	aaggcgatat	3780
tattgaactg	ttaaatatct	caccaatata	ttacgccgat	tcgataaagt	ctctagtatt	3840
attatcatct	ctgatacctg	tattcttagt	cacgcaaata	ctattagcag	agcttgaggg	3900
tcgggaatat	tttgggattc	taaatataca	aaaaagtgta	gggaattctt	taattgcagg	3960
gttacctgca	ttatttgttt	taattaatca	aacgctTTTT	tctgcaatta	ttggtgtagc	4020
gattgcaaga	gttatatgct	tgtggttaag	ctacattatg	agcagggaaa	gaataactat	4080
cgatatctca	ttttttcaa	taactgtttt	aaagcggtta	tttagatatg	gcgggtgggt	4140
aactataagt	aacataatat	ctcctatatt	agcgagtatg	gatagattta	ttctatocca	4200
tatccaggga	gcatcaaaaa	tatcattcta	tacagtcctt	aatgagctgg	taactaggct	4260
tggaatagtt	ccaggctctc	ttgggaaagc	tgTTTTtcca	aaattaagtc	atgcaaggaa	4320
ttttacagcg	tcatatgcag	agcaaaaaaa	agcttatata	ttaatgactg	tcattgtaat	4380
gcctttgggt	ttatttgat	attattacgc	aaagtttatt	ttaacattgt	ggatgggggc	4440

tgagtatgca	gggatttcgg	tcgaaatatt	acggattatg	cttatagggg	atatttttaa	4500
ctgttattca	caaatctctt	ttgccaacat	acaggccttt	ggaaaagcaa	aatacactgc	4560
atacatccat	atgatggaat	ttattcctta	tttgataatg	ttatatataa	tttcaaagga	4620
atatgggggt	attgggtggt	cgtgggttat	gacaattcga	gtaataattg	atTTTTTgat	4680
gcttttatat	atgagttatc	gttgtaataa	tcttatgaaa	aaagggtagc	ctgatgatat	4740
atattgtggg	attaaattgg	aatggggcta	tagataccat	taattgtggt	aaaagtttaa	4800
tggattttaa	tgttagcgat	tataaaatta	tcattgttga	taactgttct	atggataact	4860
catatgatac	tataaaagaa	aatcttaatt	cattatatat	tgctgataaa	agtatcattg	4920
aggatgaagta	tgaggataga	aataaatata	aaaccttaga	aaacgataaa	atcatattaa	4980
tacaatctcc	gcaaaataat	gggtacgcaa	gtggtaataa	tattggcata	gagttcgctc	5040
ttaatcagga	gaatatgaaa	tacgtctggg	ttctgaataa	tgatactgaa	gtggataaag	5100
aggctttaac	tcatttaatt	agtaaattgt	attcagataa	aagtataggg	atTTTgcggt	5160
ctcgtttagt	ctatTTTg	gacagagaga	tgcagcaagg	actaggtggg	gtgcataaca	5220
aatggttatg	cactacaaaa	aattatgaaa	tgggaagatt	agTTTccaaa	aaatatgatg	5280
atgaagtcat	tagtaatgat	atagattata	taattggcgc	atcgatgttt	ttctctagag	5340
aatgtttgga	aacagttgga	ttgatgaatg	aagaatattt	tttatactat	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	aggtaggttt	aataagatga	5640
aaagatgttt	gaatgttatg	tttaacttca	aacgaaacaa	aggtagcaaa	tgccattaga	5700
atatgcactt	aatcatgggt	ttaataaatc	tatagtttga	tatgttatta	aagggatatt	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	atggtttTga	TTTTattatc	gcacctgcag	gttctcaca	6060
aattgctttt	ttaaaaacaa	ccataccaat	aatatatcta	tggatacaa	catatgatca	6120
attaaaaagc	tattatccga	atttaaataa	aaaaacaatt	ataaatgatg	aggatgcaag	6180
tttaatcgaa	cgcaaggcta	ttgaaaaagc	aacagtagta	tctttcccat	ctaaatgggc	6240
aatggatTTT	tgcaggaatt	attacagatt	agattTTTgat	aaattagttg	aaataccatg	6300
gggggcta	ttatTTTgat	atattcactt	tgctaataaa	aatataattc	aaaagaatag	6360

ttataacttgt	cttttcttgg	gagttgattg	ggaaagaaaa	ggtagggaaaa	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
tgttgctcgt	acagatacag	gtggagtcag	ttctatagtt	atcaacgaaa	ggacggggat	6720
attaattaa	gacccgttag	actataagca	ctttggaaat	gcaattcata	aaataattag	6780
ttccgtagag	acttatcaaa	actactcca	aaacgcaaga	attagatata	ataatatatt	6840
gcattgggac	aattgggcta	aaaagataat	tgagattatg	tatgagcata	agaatagaag	6900
aatcaaatag	cacaaaaaga	attatatggt	tatttatact	ttttcttggt	ttccctgatt	6960
ttttgtttta	tacattaggg	gttgataaatt	ttagcatttc	aacgataatc	tcaattacat	7020
tgctttttgt	ttttttaaga	gctaaaaata	tttgcaaaga	taattttcta	ataatagtag	7080
cgttattcat	attgttgtgt	tttaactggt	tgtaagtat	gctatttaat	attgaacagg	7140
ctttaacatt	taaagttgta	ctttcaatat	atagcatctt	aataatggca	tacgtctoct	7200
cttgttatgc	acagacgttg	tggttatggt	ctgaagaaat	acttaagaga	tccgtctttt	7260
atgtgttcgc	atctctttgc	cttattggca	ttataagtat	tcttttacag	aagactgaga	7320
ttatacatga	taaaagtatg	attctttttc	ctgaaccatc	agcatttgca	ttggttttta	7380
tacctatctt	ttcattttgt	ttatactata	caagaggggg	ggggctacta	ttgctctata	7440
tattatcttt	gggtattgcg	ttaggtatcc	agaatttaac	aatgttggta	ggcattgtga	7500
ttagtgtttt	tgtgatgaaa	aaaataacta	taaggcaaac	tattgttata	cttttggggg	7560
catggatfff	ttccatgata	ttaagtgatt	tagacatttc	ttactataca	tcgcggttg	7620
atfttaaaaa	tactacgaac	ctatcagtgc	ttgtatatct	ttcaggaatt	gaaagagctt	7680
tcttgaattt	tattacaagt	tatggtcttg	gtattggttt	tcaacaaatg	ggagtgaatg	7740
gggagatagg	aatatatcaa	caaatttttag	ctgaacttga	tgcccctatg	ttaaatatat	7800
acgatggctc	atftatftct	tctaagttaa	tatctgagtt	tggggttatt	ggtgcattaa	7860
tgtgtatfff	ctatftftft	tatftftccc	gattfttatct	gcgftftcaaa	aaaagtaaga	7920
gatattcacc	gcagtatatt	ttagcatata	gcttctacat	gtgtftcttc	atccctctft	7980
ttatacgtgg	tgctggttat	ataaacccct	atgtgtfttat	gttattfttca	tcaatattft	8040
tgtgcaaata	tcacgctaaa	aatatcttga	tgaaatctaa	tgtccagata	gctatataat	8100
agtagattat	attatcatta	tcacgtaaat	tacatattaa	tagcatatat	gataactagg	8160
acataaataa	tgtgcattaa	aaaaaaactt	aagttaatta	aacgatatgg	cctfttatgg	8220
ggtcttaggc	ttcttaaaga	tatattctta	acaaaatftt	tatftftgttc	aaatgttagg	8280

attattagat	ttccatgtta	tattagaaaa	gatggaagtg	ttagttttgg	aaaaggtttt	8340
acatcaggtg	taggattacg	agttgatgca	tttatggatg	ccgtagtttc	cattggagaa	8400
aatgttcaaa	ttaatgacta	tgttcacatc	gcggttatta	ataatgtcat	tattggtaga	8460
gatacattaa	tagcaagtaa	agtattttatt	agtgatcata	atcatggtat	tttttctaaa	8520
tccgatatcc	atagttcacc	aactattatt	ccttcgtcta	ggccccttga	atctgcacct	8580
gtgtatattg	gagagcgtgt	gtggattggc	gaaaatgtga	caatattacc	agggtcgtgt	8640
ataggtaatg	gtgtagttat	tggcgcaaac	agtgttgttc	gtggtgagat	tcctaataat	8700
gtgatcattg	ctgggtttcc	agctaaaatt	gttaaaaaat	ataactatga	gcgatgcaa	8760
tgggaaagaa	tatagttgta	ataticggctg	ttaattttac	aaccggaggc	ccctttaccg	8820
tactaaaaaa	tgtgcttaca	gcaactaaag	atagagccga	atgtaaattt	attgcactgg	8880
ttcatagctc	tgctgaacta	atggaattat	ttccgtgggt	tgaatttata	gagtatccag	8940
aagtcaagtc	ttcgtgggtt	aaaagattat	atctcgaata	tataacttgc	aatagattat	9000
ctaaggatg	taaggcaact	cattgggtat	gcttacatga	tattacagca	aatgtagtg	9060
taccctatag	atgtgtttat	tgccacaatc	ctgcaccggt	ctataaatat	ttaagctatc	9120
gagatattat	aggagaacct	aaattttatc	ttttttatct	tttttatggg	cttttataca	9180
atatcaatat	aaaaaagaac	acagcagttt	ttgttcagca	gcagtggtta	aaaaaagaat	9240
tcgaaaaaaaa	atataagtta	aagaatgttg	ttgttagtcg	ccctgaagat	atgtgcctt	9300
ttgaaagtga	tggtttggtta	agaaataata	ataaaaagga	tgtgaggata	ttttaccag	9360
cagtgcctcg	tatatttaaa	aactttgaag	ttatcatatc	tgctgcacaa	atattacaag	9420
ataaaaatat	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
atatictcaa	ggggaactga	cgtggtttat	attataatcg	tttcacatgg	ccatgatgac	9900
tatatagaaa	atctttttatt	aaatttaaag	ttgccctctg	gaagatttaa	aataatagtt	9960
cgtgataaca	aaagttcaat	ggttttaaaa	aaaacatgcg	aaaaaaattg	cgtaacctat	10020
ttgcatggag	ggcaatatgg	atgtggacat	aataataaca	tagcagtgtc	atatataatt	10080
aataacttca	tgattatgaa	taatgattat	tttctctttc	ttaaccccg	tgtattcata	10140
accagtgaaa	gtttgattaa	ttatggtgat	tatataatta	gtaatgatta	taagtttagc	10200

acattatgtc tttatcgaga ttttactaaa agcaaacatg attattcaat acggagtttt 10260
 ccaactttat atgattttct ttgttctttt ttattggggg tgaataaaaag taaaattaag 10320
 aaggaaaata tacttttctga tactgtagtt gattgggtgtg ctggctcatt tatgcttatt 10380
 catgctttaa gtttcttaaa tgtgaatggt tttgatcaaa aatattttat gtattgtgaa 10440
 gatattgacc tttgtatgcg tttaaaatta agtggagtag atctttacta tactccccat 10500
 tttgatgcta tcattatgc gcagcatgaa aatagaagaa tatttactaa agcatttoga 10560
 tggcatataa ggagtattac gcgctacata ttacggaaac caattctttc ttataaaaac 10620
 tatagaaaaa ttacatccga actggtaaag tga 10653

<210> 13
 <211> 652
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> детоксифицированный белок ЕРА, содержащий 4 оптимизированных последовательности N-гликозилирования

<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> Искусственная последовательность

<220>
<223> консенсусная последовательность N-гликозилирования

<220>
<221> вариант
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = любая аминокислота

<220>
<221> вариант
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = Ser или Thr

<400> 14

Asn Xaa Xaa
1

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> консенсусная последовательность N-гликозилирования

<220>
<221> вариант
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = Asp или Glu

<220>
<221> вариант
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = независимо выбрана из любой аминокислоты, за исключением Pro

<220>
<221> вариант
<222> (4)..(4)
<223> Xaa = независимо выбрана из любой аминокислоты, за исключением Pro

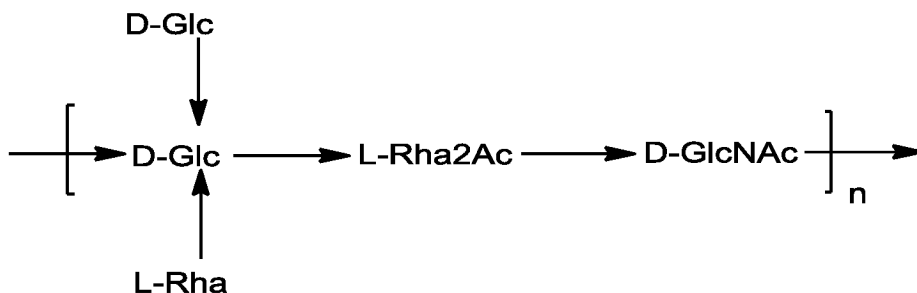
<220>
<221> вариант
<222> (5)..(5)
<223> Xaa = Ser или Thr

<400> 15

Xaa Xaa Asn Xaa Xaa
1 5

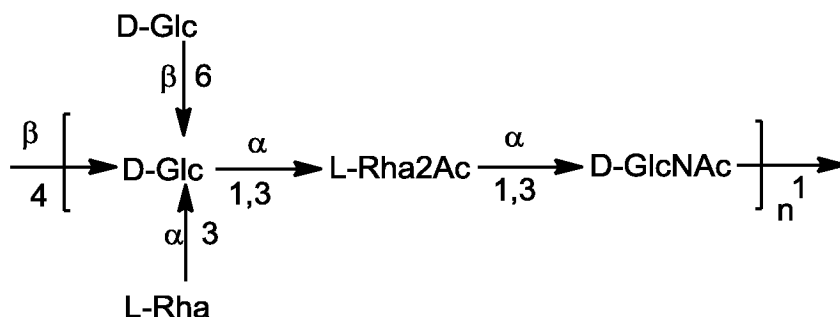
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая биоконъюгат антигена O25B *E. coli*, ковалентно связанный с белком-носителем, где антиген O25B *E. coli* содержит структуру формулы O25B:



где n представляет собой целое число от 1 до 30.

2. Композиция по п. 1, где антиген O25B *E. coli* содержит структуру формулы O25B':



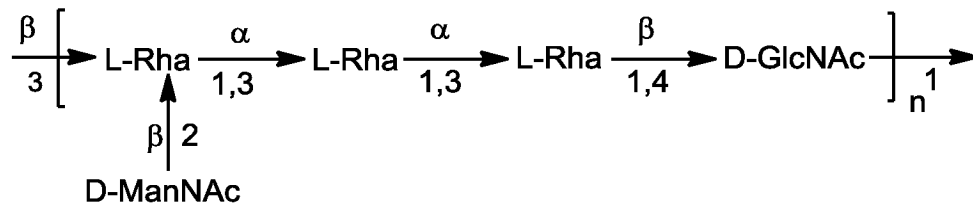
где n представляет собой целое число от 1 до 30.

3. Композиция по п. 1 или 2, где антиген O25B *E. coli* ковалентно связан с остатком Asn в белке-носителе.

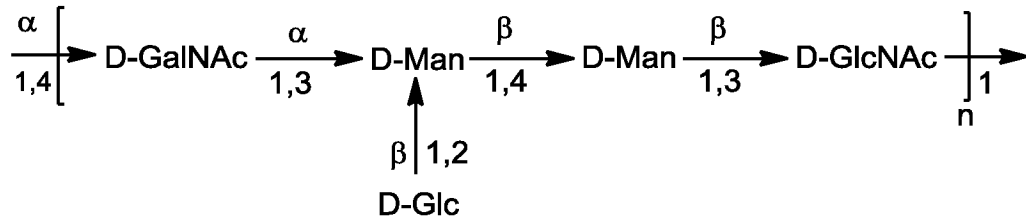
4. Композиция по любому из пп. 1-3, дополнительно содержащая (1) биоконъюгат O1A, содержащий антиген O1A *E. coli*, ковалентно связанный с остатком Asn белка-носителя, (2) биоконъюгат O2, содержащий антиген O2 *E. coli*, ковалентно связанный с остатком Asn белка-носителя, и (3) биоконъюгат O6, содержащий антиген O6 *E. coli*, ковалентно связанный с остатком Asn белка-носителя.

5. Композиция по п. 4, где антиген O1A, антиген O6 и антиген O2 содержат следующие формулы, соответственно:

а. Формула O1A'

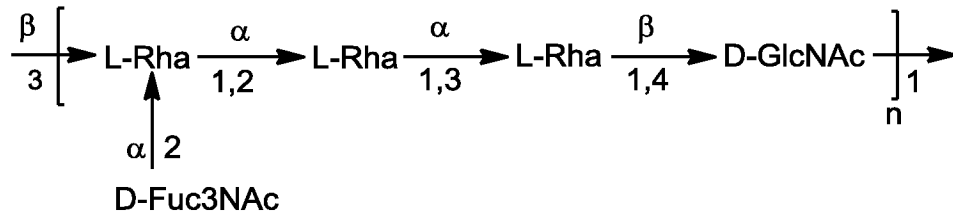


б. Формула O6Glc'



и

в. Формула O2'



6. Композиция по любому из пп. 1-5, где белок-носитель выбран из группы, состоящей из детоксифицированного экзотоксина А из *P. aeruginosa* (EPA), CRM197, мальтозосвязывающего белка (MBP), дифтерийного анатоксина, столбнячного анатоксина, детоксифицированного гемолизина А из *S. aureus*, фактора агглютинации А, фактора агглютинации В, FimH *E. coli*, FimHC *E. coli*, термолабильного энтеротоксина *E. coli*, детоксифицированных вариантов термолабильного энтеротоксина *E. coli*, субъединицы В холерного токсина (СТВ), холерного токсина, детоксифицированных вариантов холерного токсина, белка Sat *E. coli*, домена-пассажира белка Sat *E. coli*, пневмолизина *Streptococcus pneumoniae* и его детоксифицированных вариантов, AcrA *C. jejuni* и природных гликопротеинов *C. jejuni*.

7. Композиция по п. 6, где белок-носитель представляет собой детоксифицированный EPA.

8. Композиция по любому из пп. 3-7, где остаток Asn белка-носителя находится в консенсусной последовательности Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты за исключением Pro (SEQ ID NO:15).

9. Способ вакцинации субъекта против внекишечных патогенных *Escherichia coli*, включающий введение субъекту эффективного количества композиции по любому из пп. 1-8.

10. Способ индукции иммунного ответа у субъекта против внекишечных патогенных *Escherichia coli*, включающий введение субъекту эффективного количества композиции по любому из пп. 1-8.

11. Способ индукции образования опсонофагоцитирующих антител у субъекта, которые являются специфичными к внекишечным патогенным *Escherichia coli*, включающий введение субъекту эффективного количества композиции по любому из пп. 1-8.

12. Способ по любому из пп. 9-11, где субъект имеет риск развития инфекции мочевыводящих путей.

13. Способ по любому из пп. 9-11, где субъект имеет риск развития бактериемии.

14. Способ по любому из пп. 9-11, где субъект имеет риск развития сепсиса.

15. Способ по любому из пп. 9-14, где субъект представляет собой человека.

16. Прокариотическая клетка-хозяин, содержащая:

а. нуклеотидную последовательность, кодирующую:

1. dTDP-глюкозо-4,6-дегидратазу;
2. dTDP-6-дезоксид-глюкозо-3,5-эпимеразу;
3. глюкозо-1-фосфат-тимидилитрансферазу;
4. dTDP-4-дегидрорамнозо-3,5-эпимеразу;
5. O-антиген-флиппазу;
6. dTDP-Rha:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP α -1,3-рамнозилтрансферазу;
7. UDP-Glc:Glc-Rha(Ac)-GlcNAc-UPP β -1,6-гликозилтрансферазу;
8. O-антиген-полимеразу;
9. O-ацетилтрансферазу;
10. UDP-Glc:Rha-GlcNAc-UPP α -1,3-гликозилтрансферазу и
11. dTDP-Rha:GlcNAc-UPP α -1,3-рамнозилтрансферазу;

б. нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарил-трансферазу; и

в. нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий консенсусную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты, за исключением Pro (SEQ ID NO:15).

17. Клетка-хозяин по п. 16, где по меньшей мере один из гена *waalL*, гена *gtrA*, гена *gtrB*, гена *gtrS* или кластера *rfb* удален или функционально инактивирован в геноме клетки-хозяина.

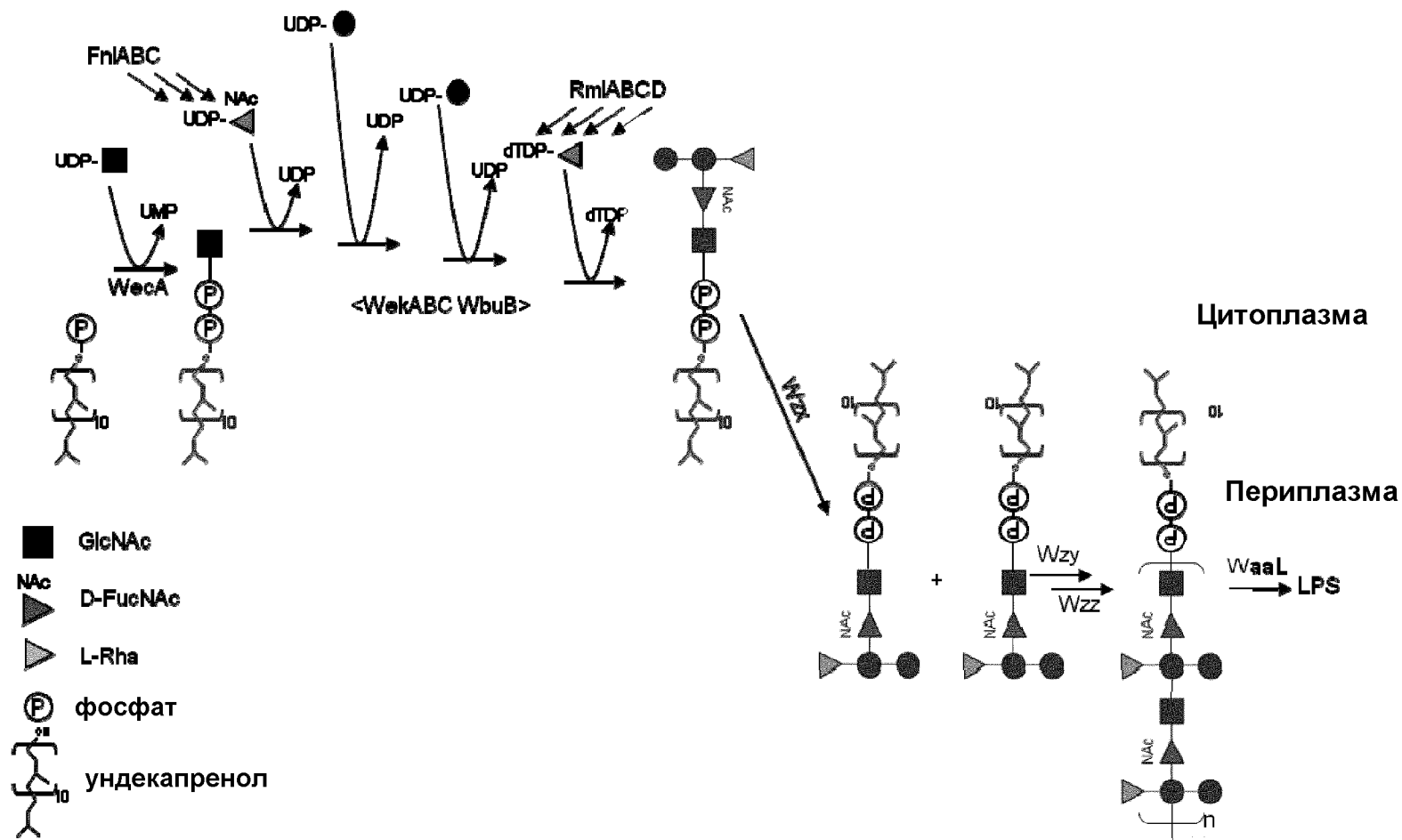
18. Клетка-хозяин по п. 16 или 17, где белок-носитель выбран из группы, состоящей из детоксифицированного экзотоксина А из *P. aeruginosa* (EPA), CRM197, мальтозосвязывающего белка (MBP), дифтерийного анатоксина, столбнячного анатоксина, детоксифицированного гемолизина А из *S. aureus*, фактора агглютинации А, фактора агглютинации В, FimH *E. coli*, FimHC *E. coli*, термолабильного энтеротоксина *E. coli*, детоксифицированных вариантов термолабильного энтеротоксина *E. coli*, субъединицы В холерного токсина (CTB), холерного токсина, детоксифицированных вариантов холерного токсина, белка Sat *E. coli*, домена-пассажира белка Sat *E. coli*, пневмолизина *Streptococcus pneumoniae* и его детоксифицированных вариантов, AcrA *C. jejuni* и природных гликопротеинов *C. jejuni*.

19. Клетка-хозяин по любому из пп. 16-18, представляющая собой клетку-хозяина *E. coli*.

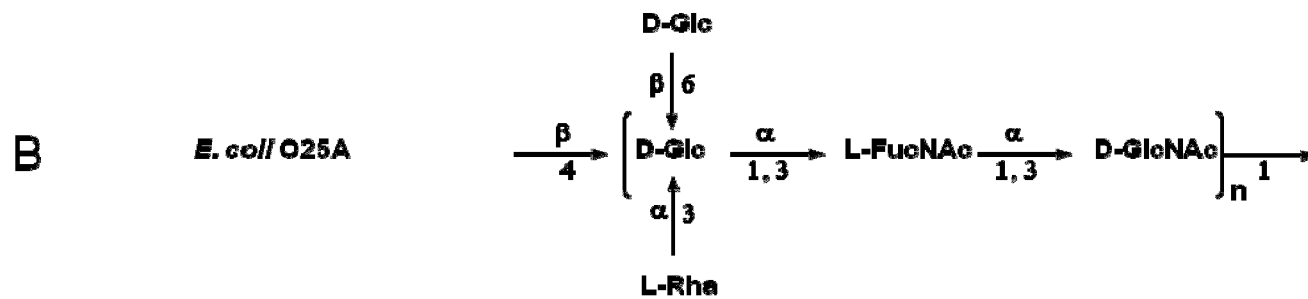
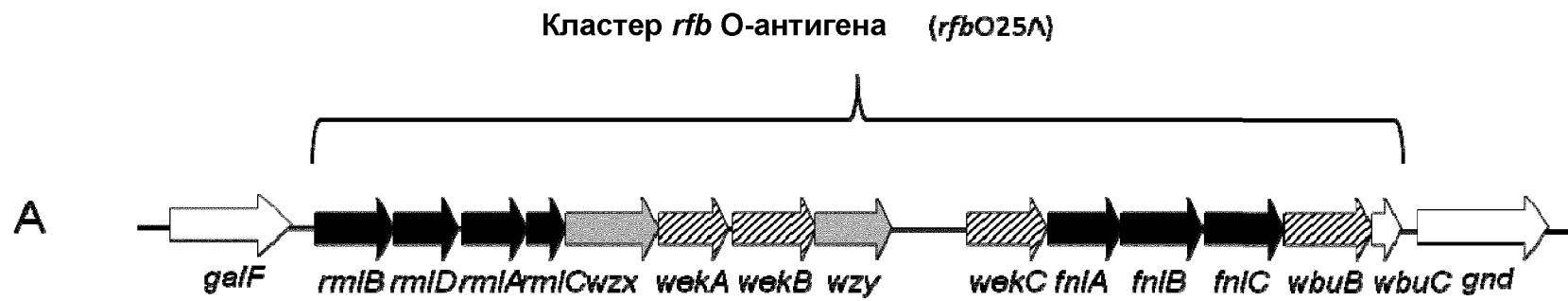
20. Способ получения N-гликозилированного белка-носителя, содержащего антиген O25B *E. coli*, включающий:

а. культивирование клетки-хозяина по любому из пп. 16-19; и

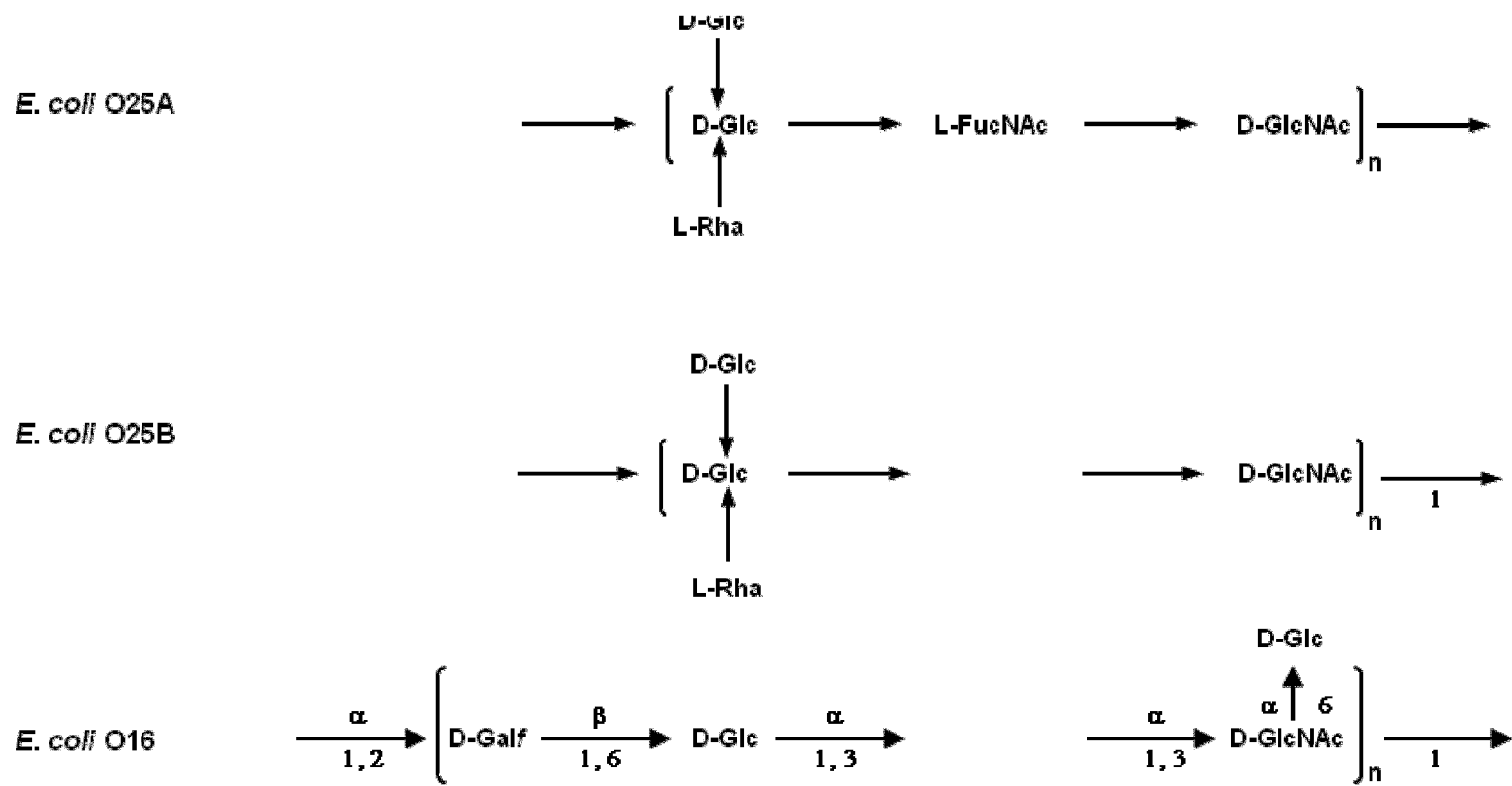
б. очистку N-гликозилированного белка-носителя, который содержит антиген O25B *E. coli*.



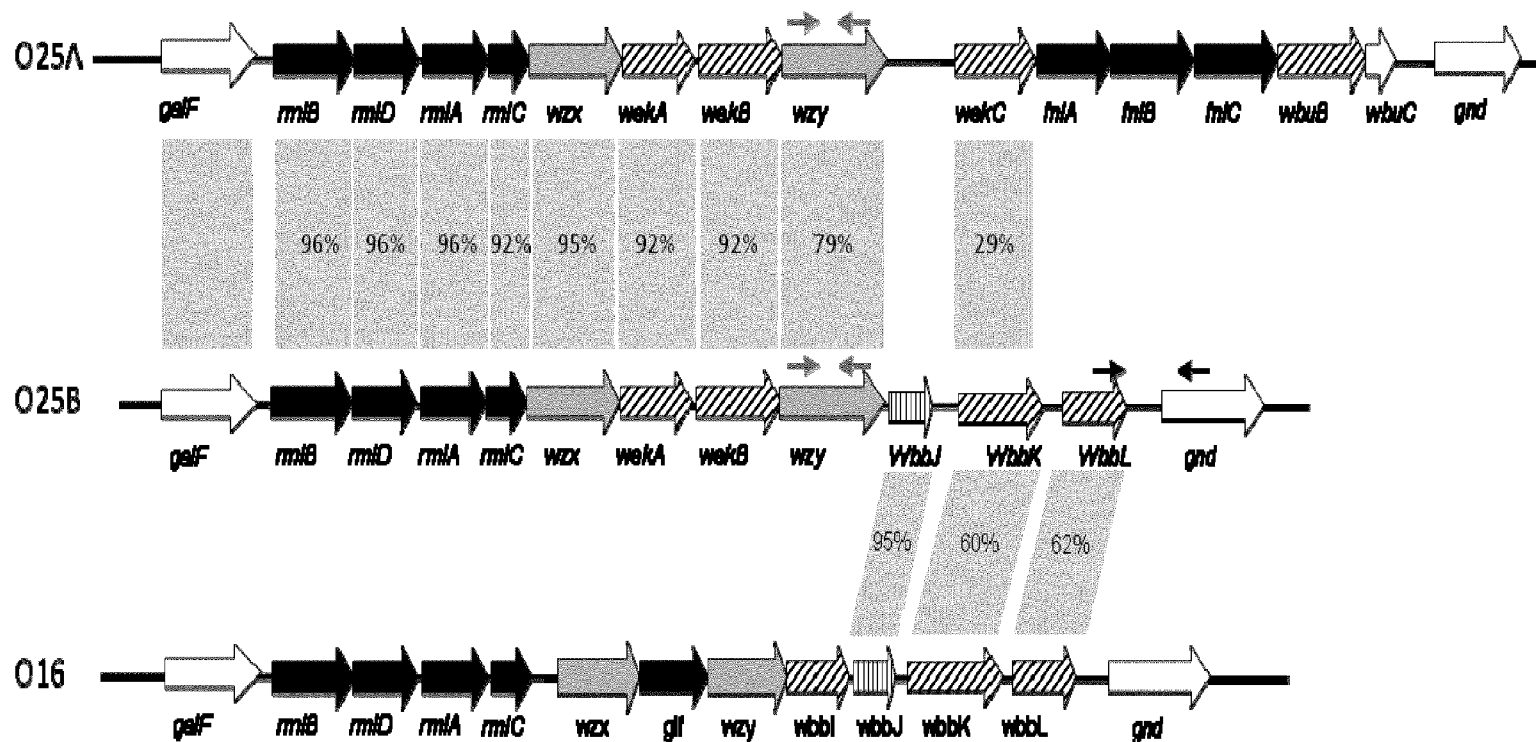
Фиг. 1



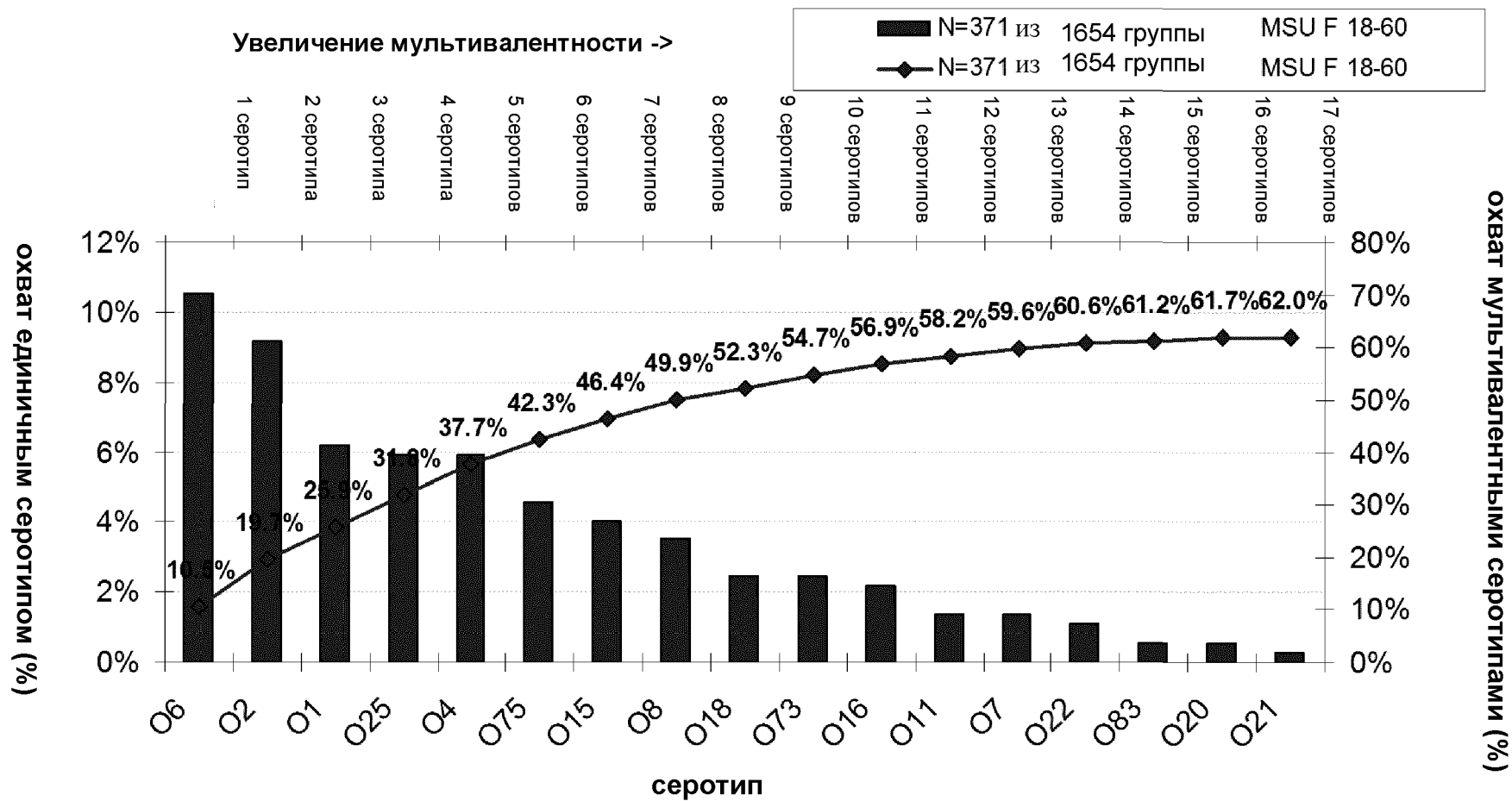
Фиг. 2



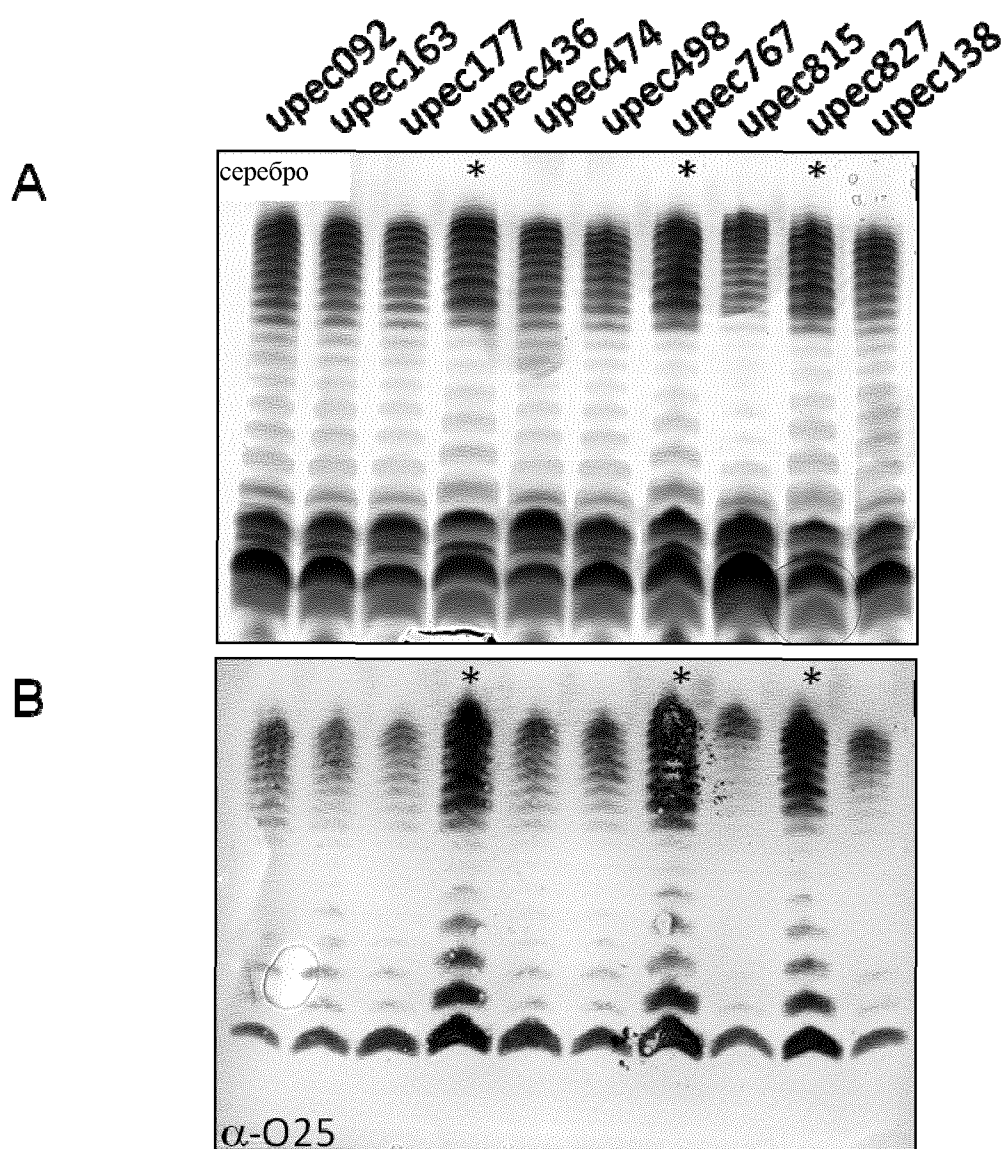
Фиг. 3А



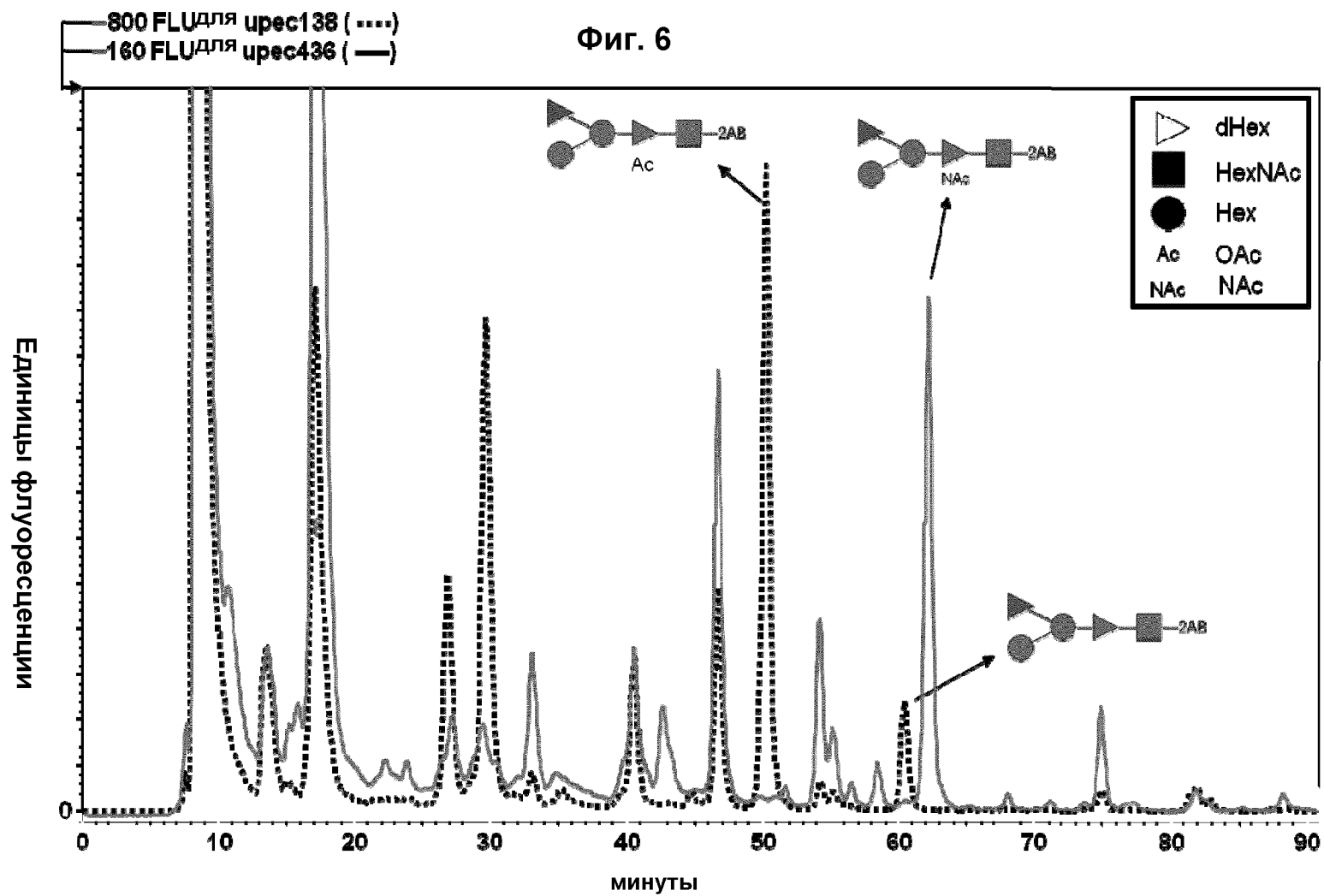
Фиг. 3В

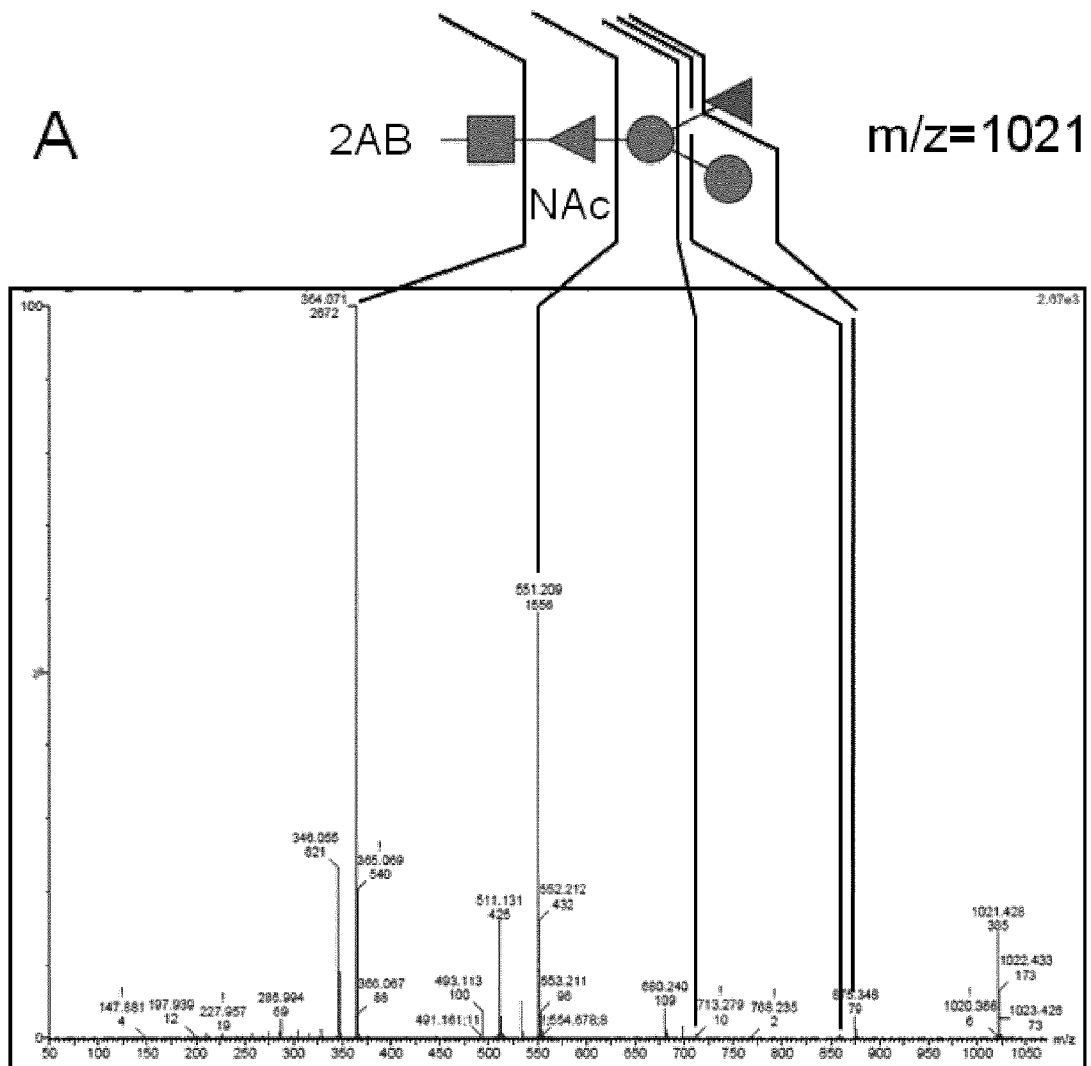


Фиг. 4

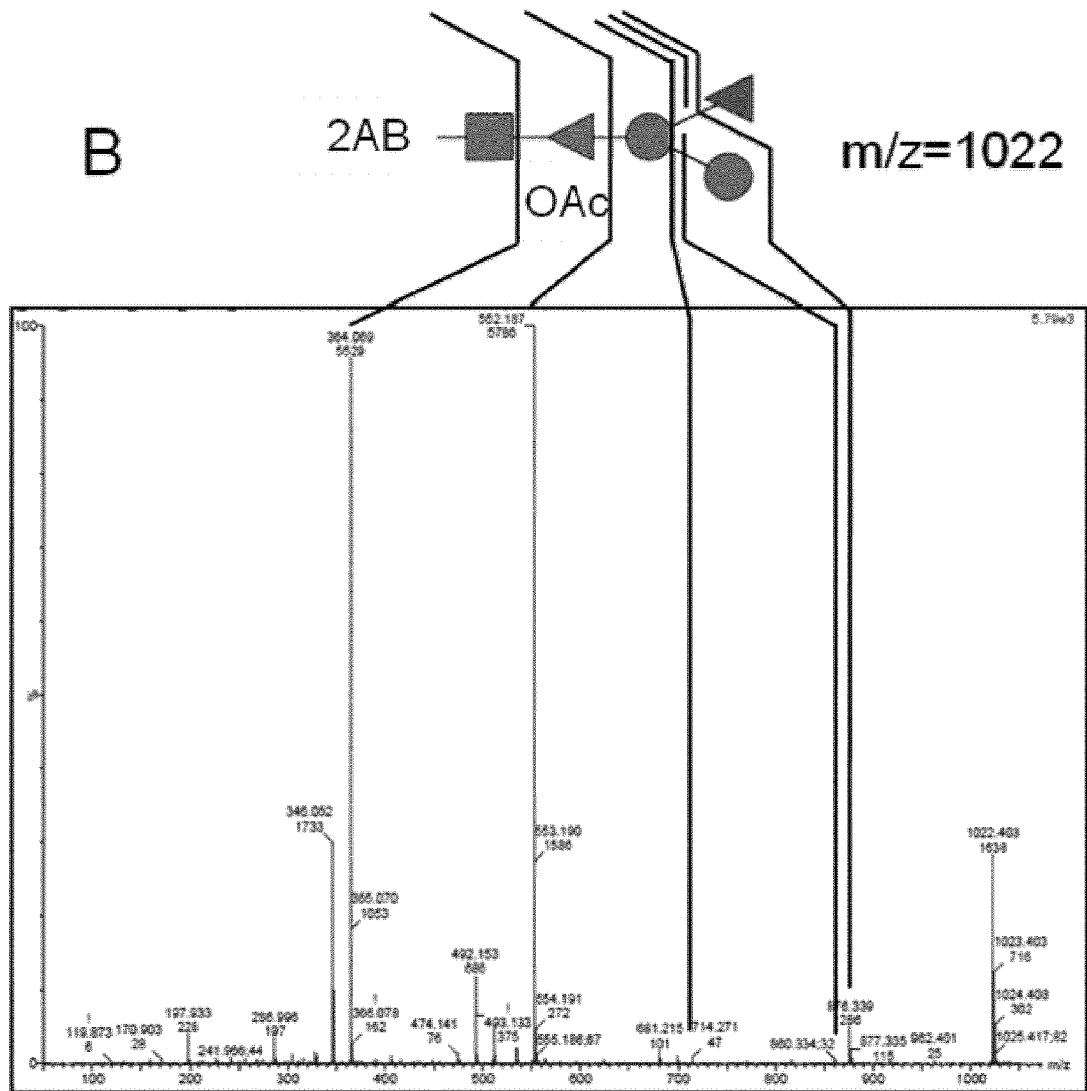


Фиг. 5 А-В

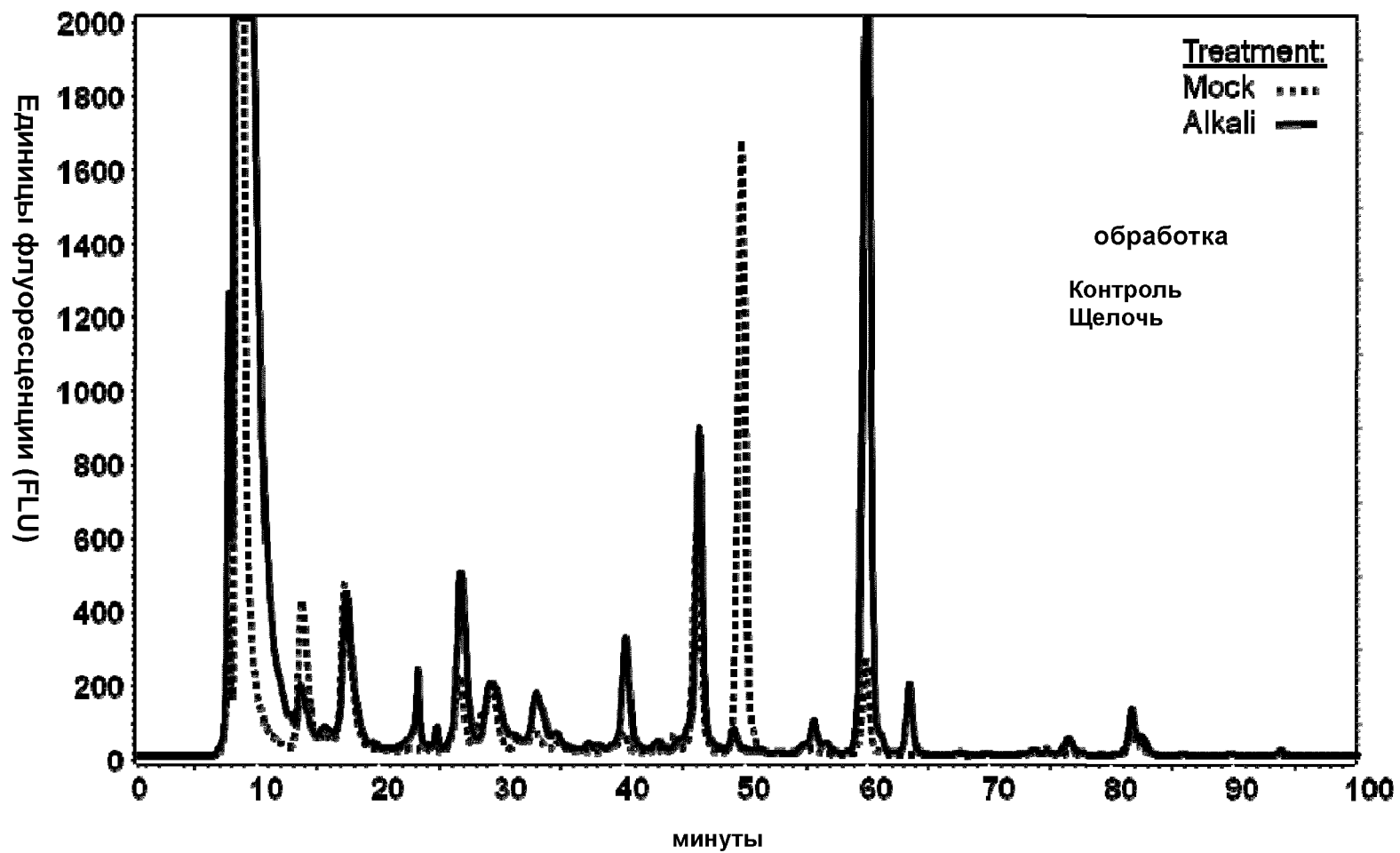


FIG. 7[^]

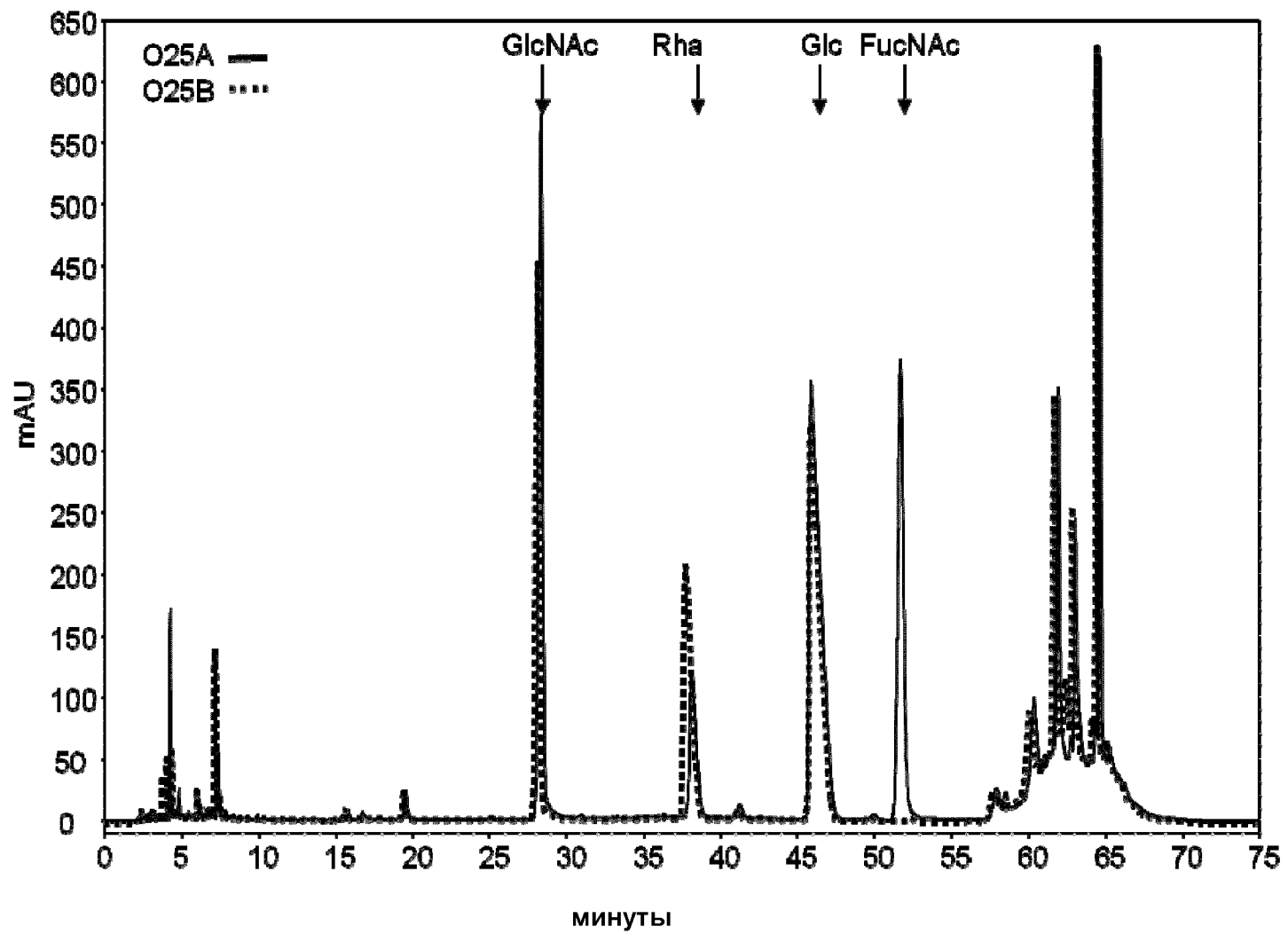
Фиг. 7А



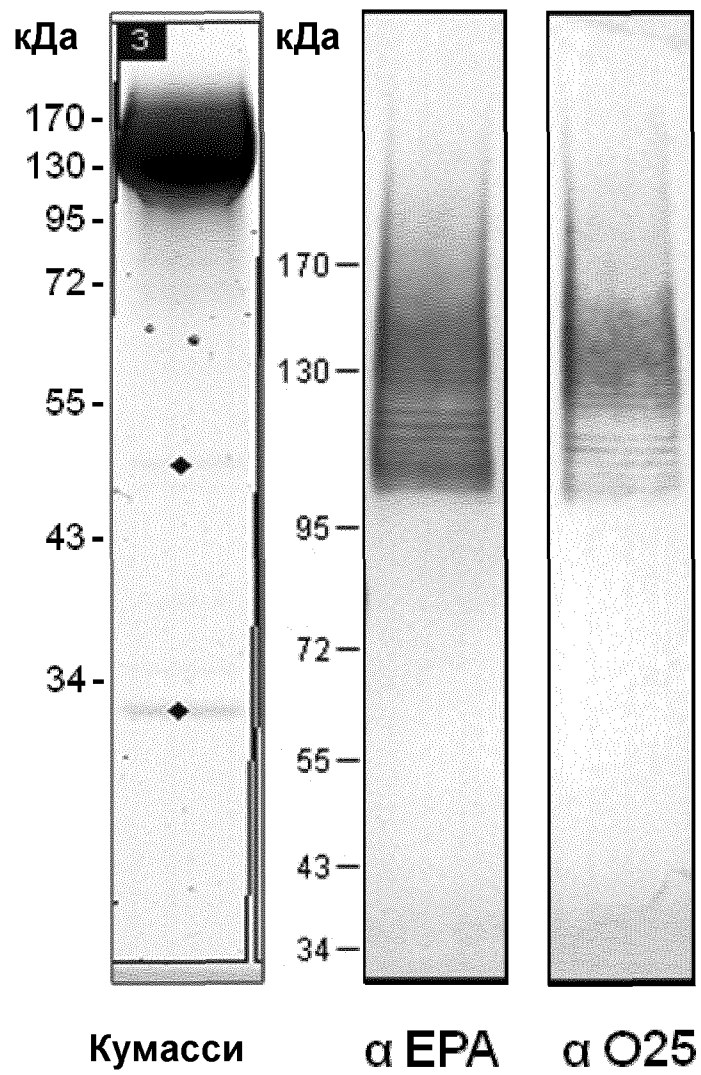
Фиг. 7В



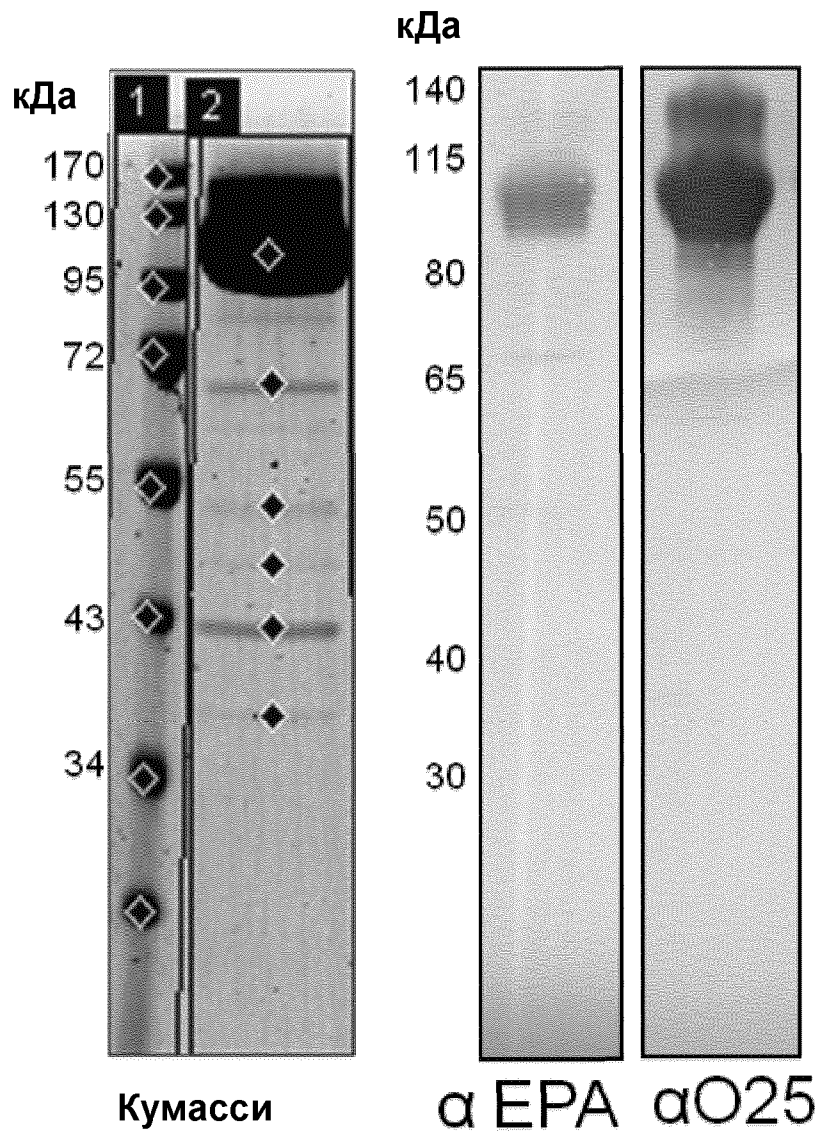
Фиг. 8



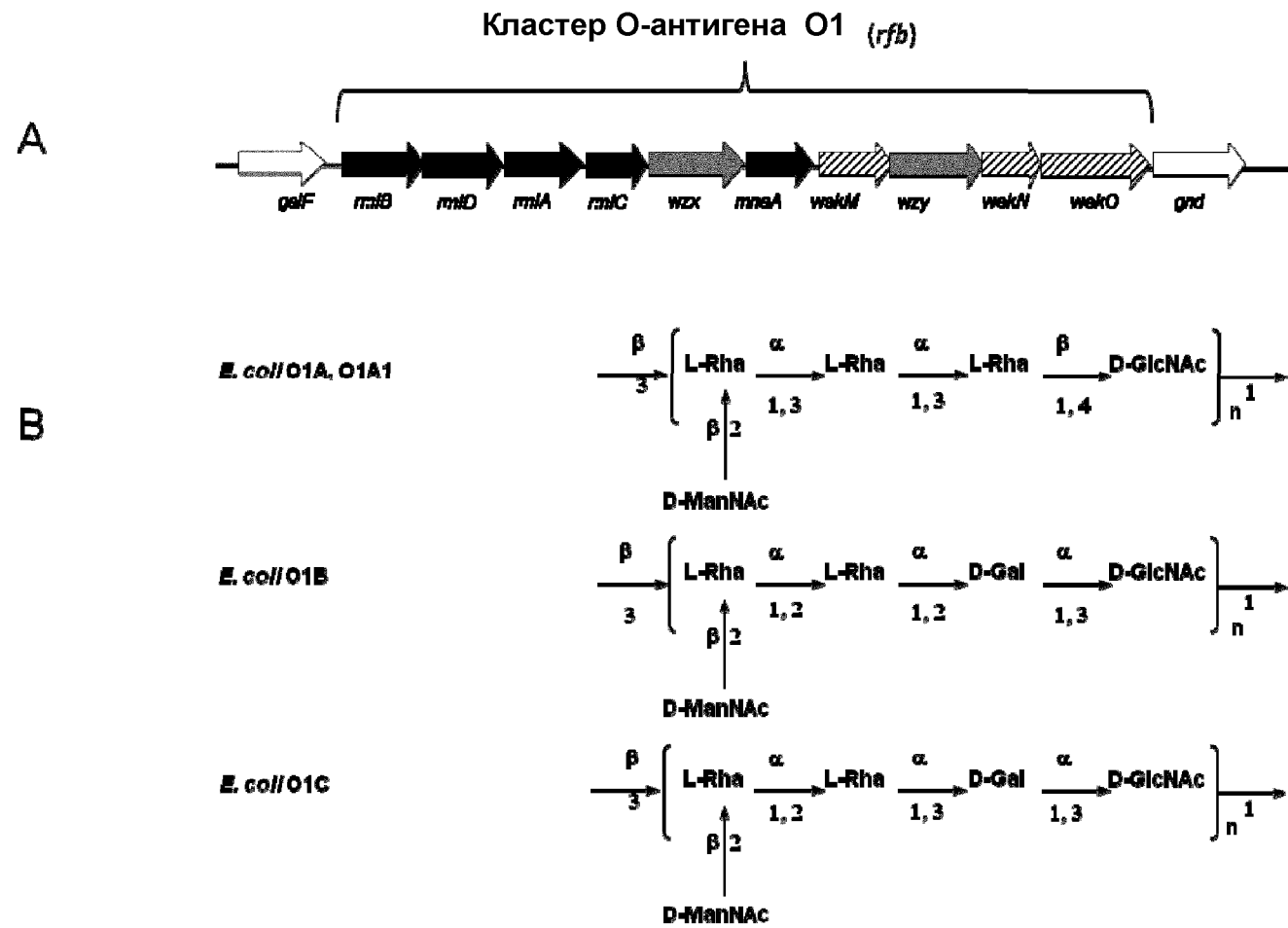
Фиг. 9



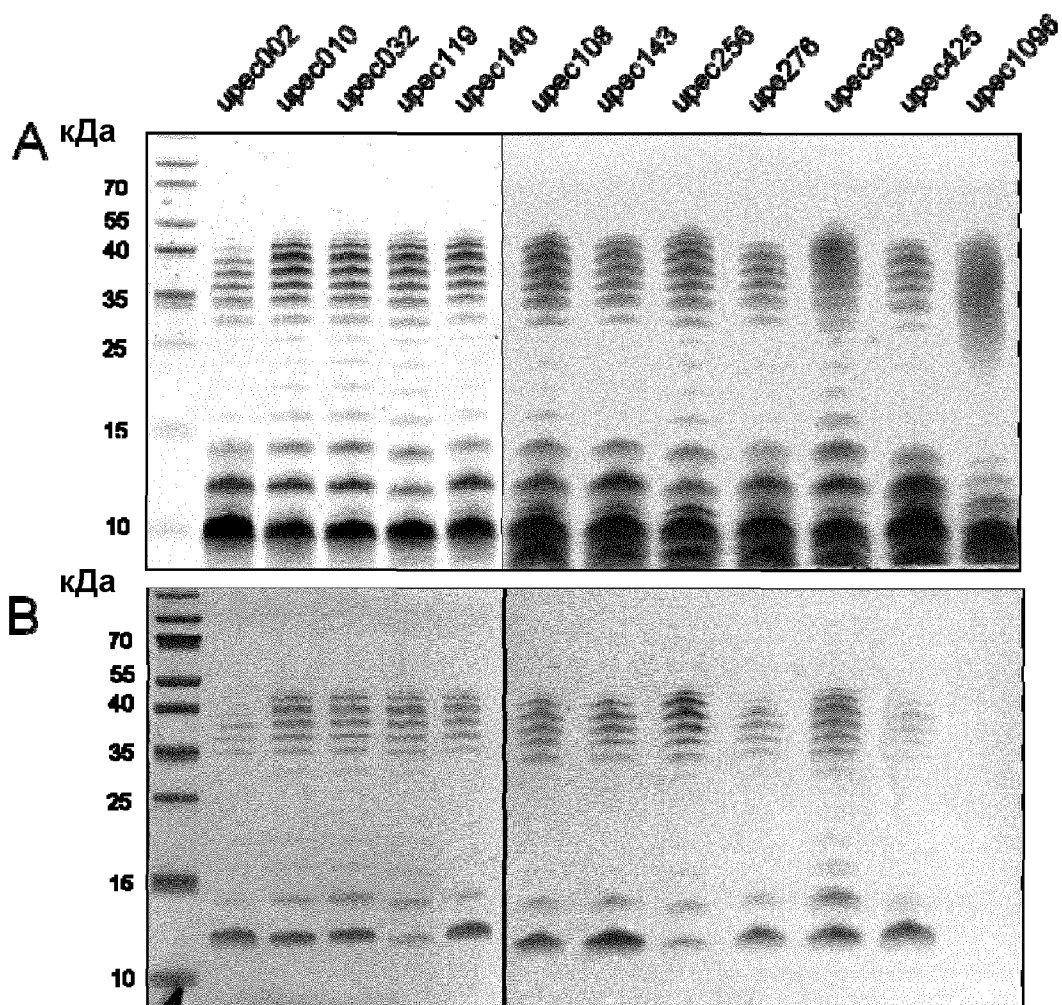
Фиг. 10



Фиг. 11

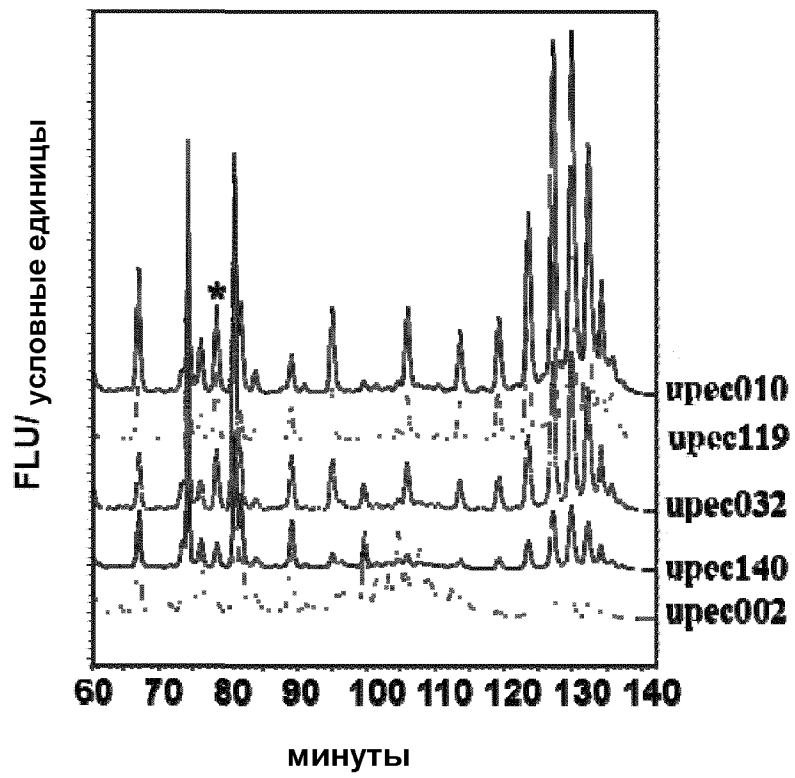


Фиг. 12



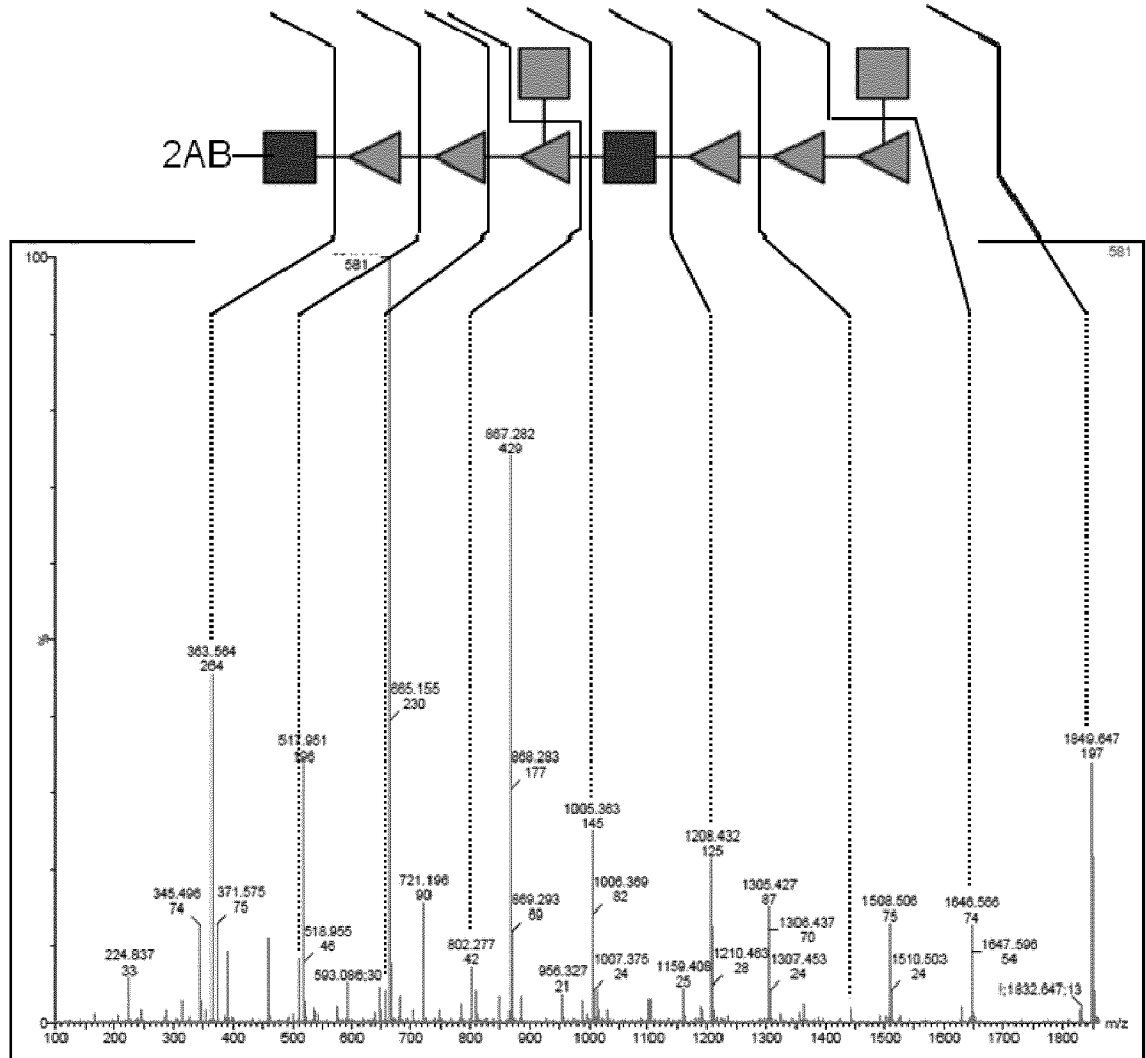
Фиг. 13

А

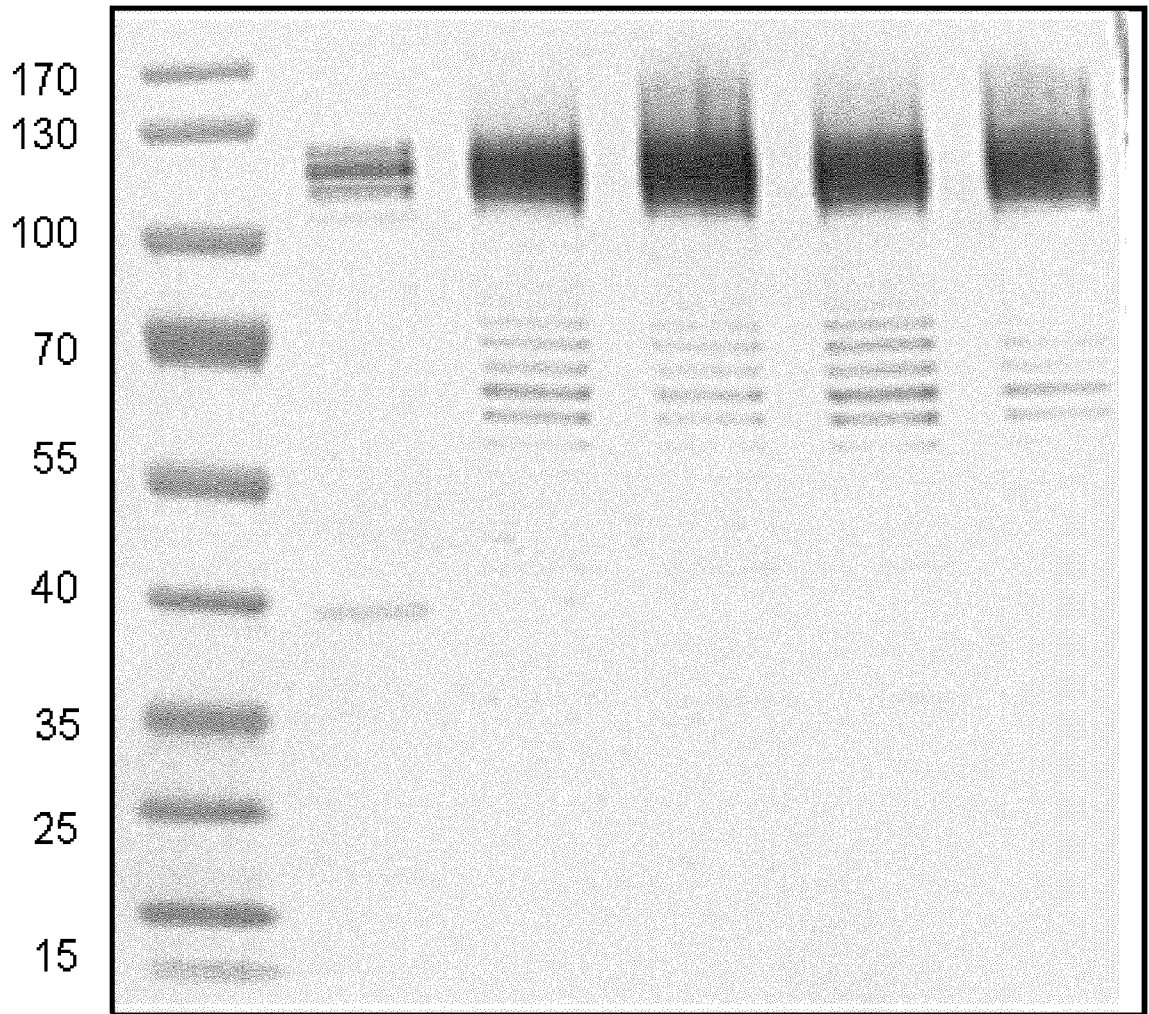


Фиг. 14А

B

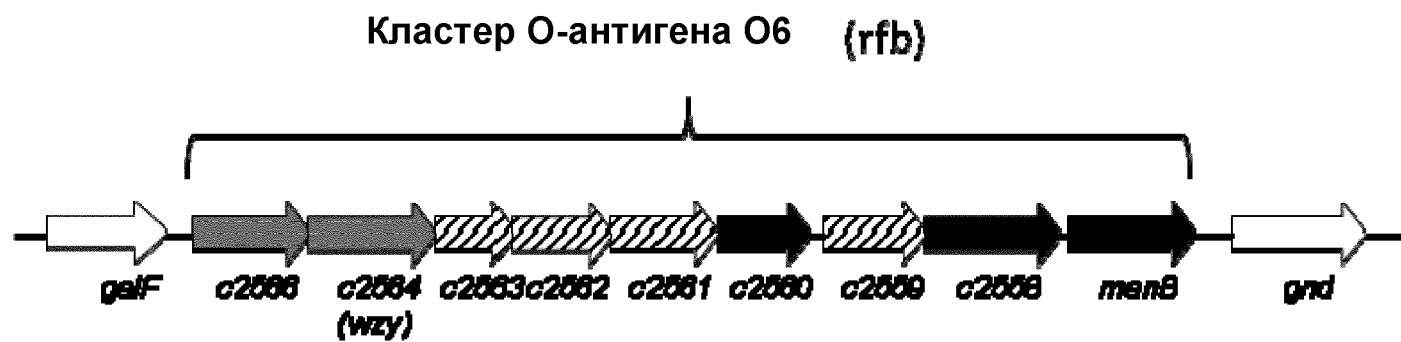


Фиг. 14В

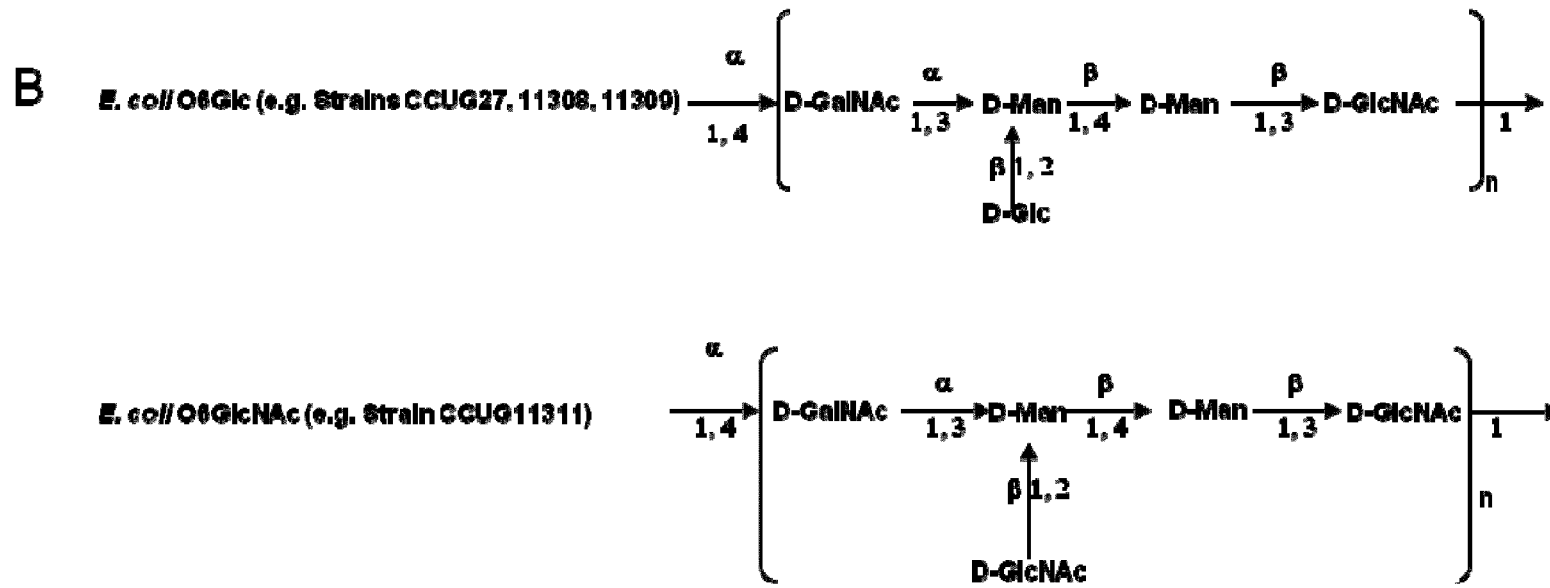


Фиг. 16

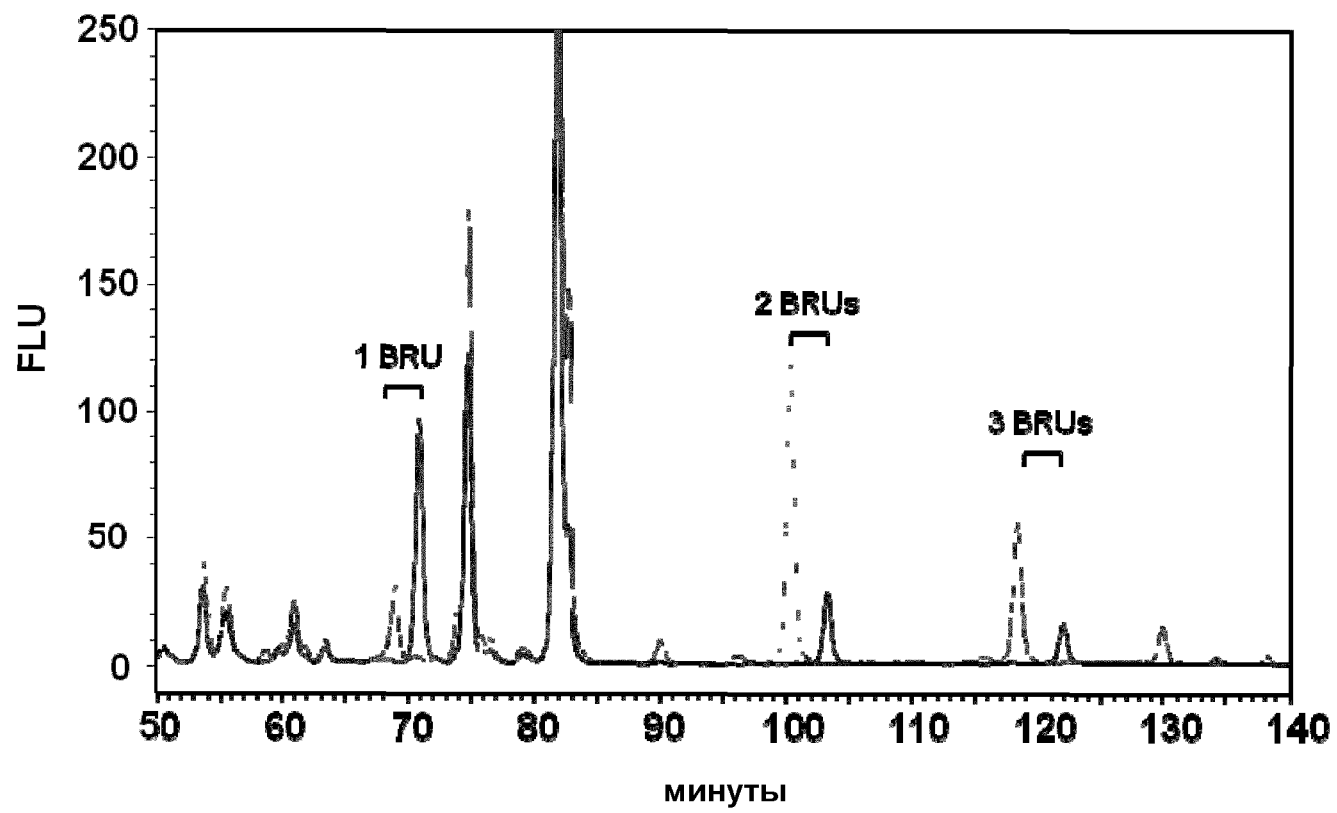
A



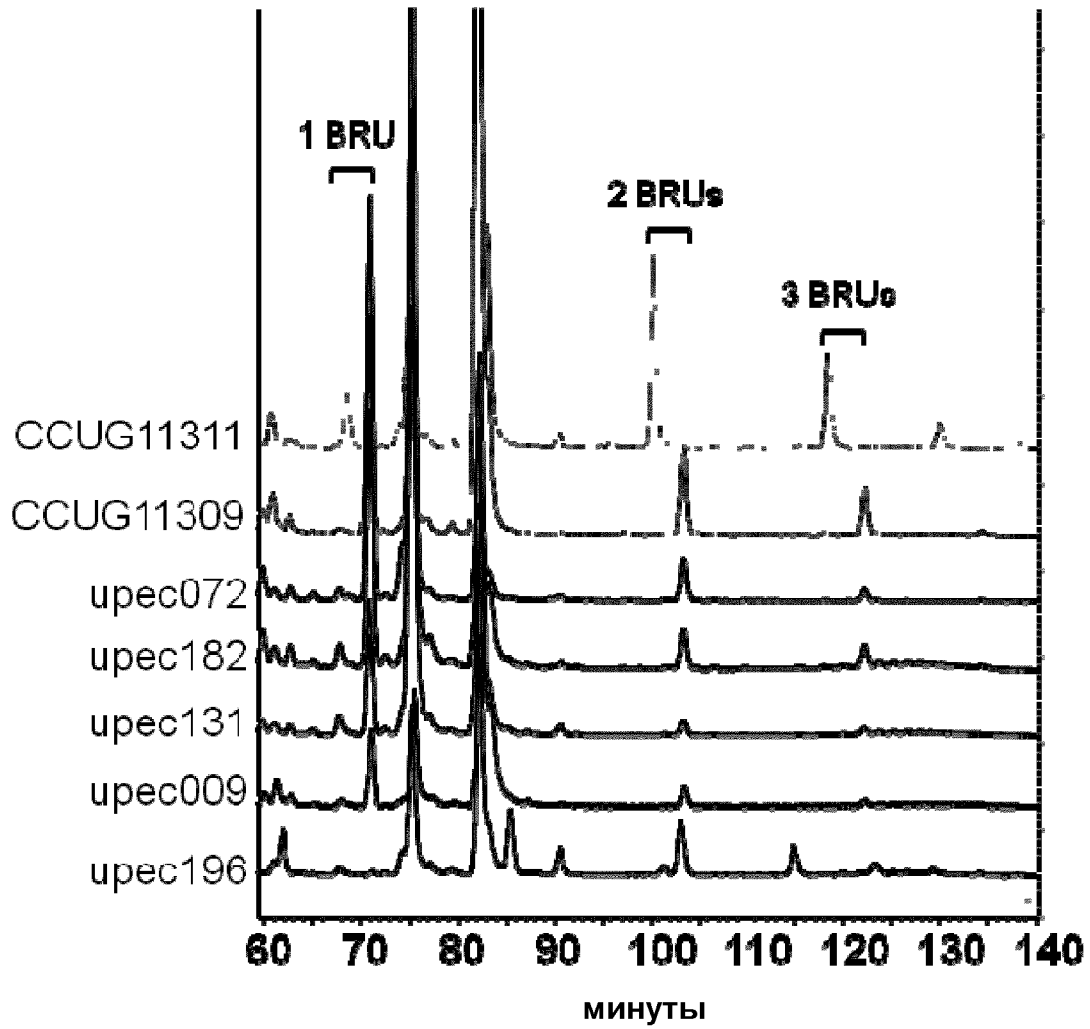
Фиг. 17А



Фиг. 17В

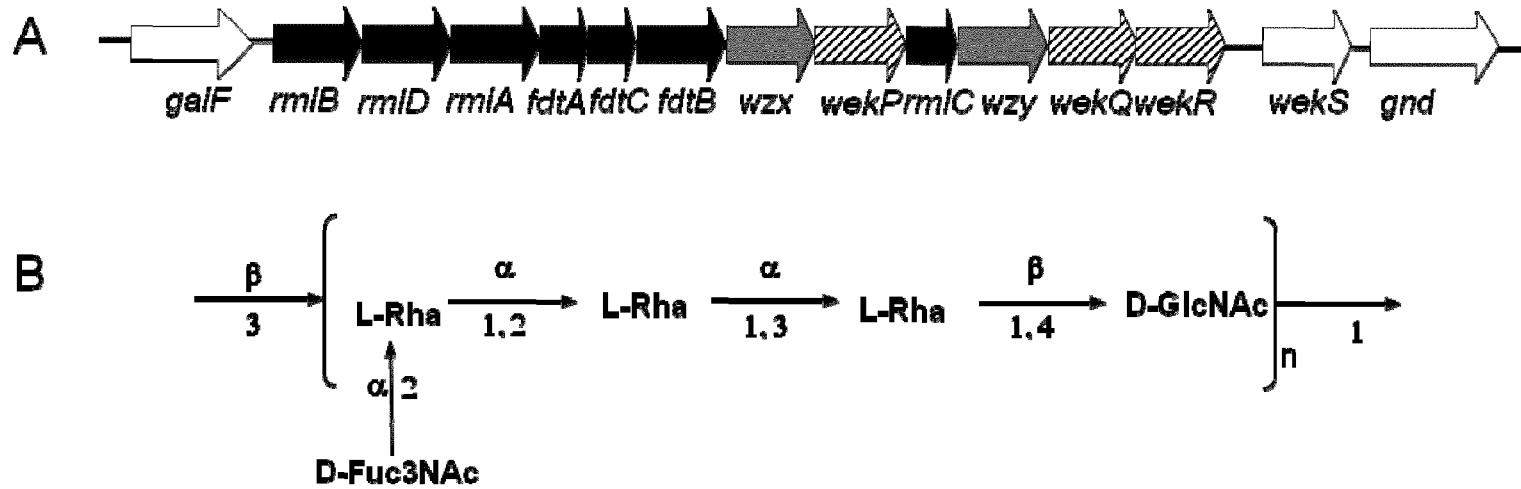


Фиг. 18А

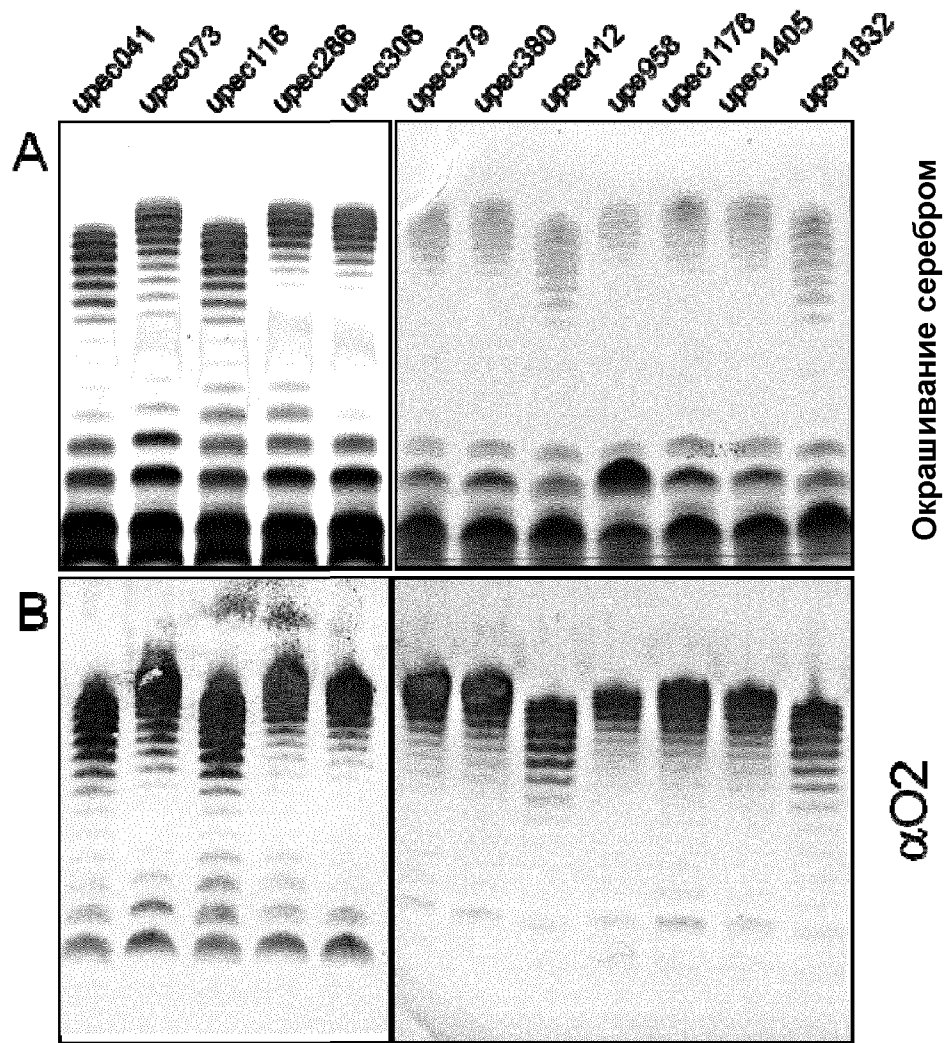


Фиг. 18В

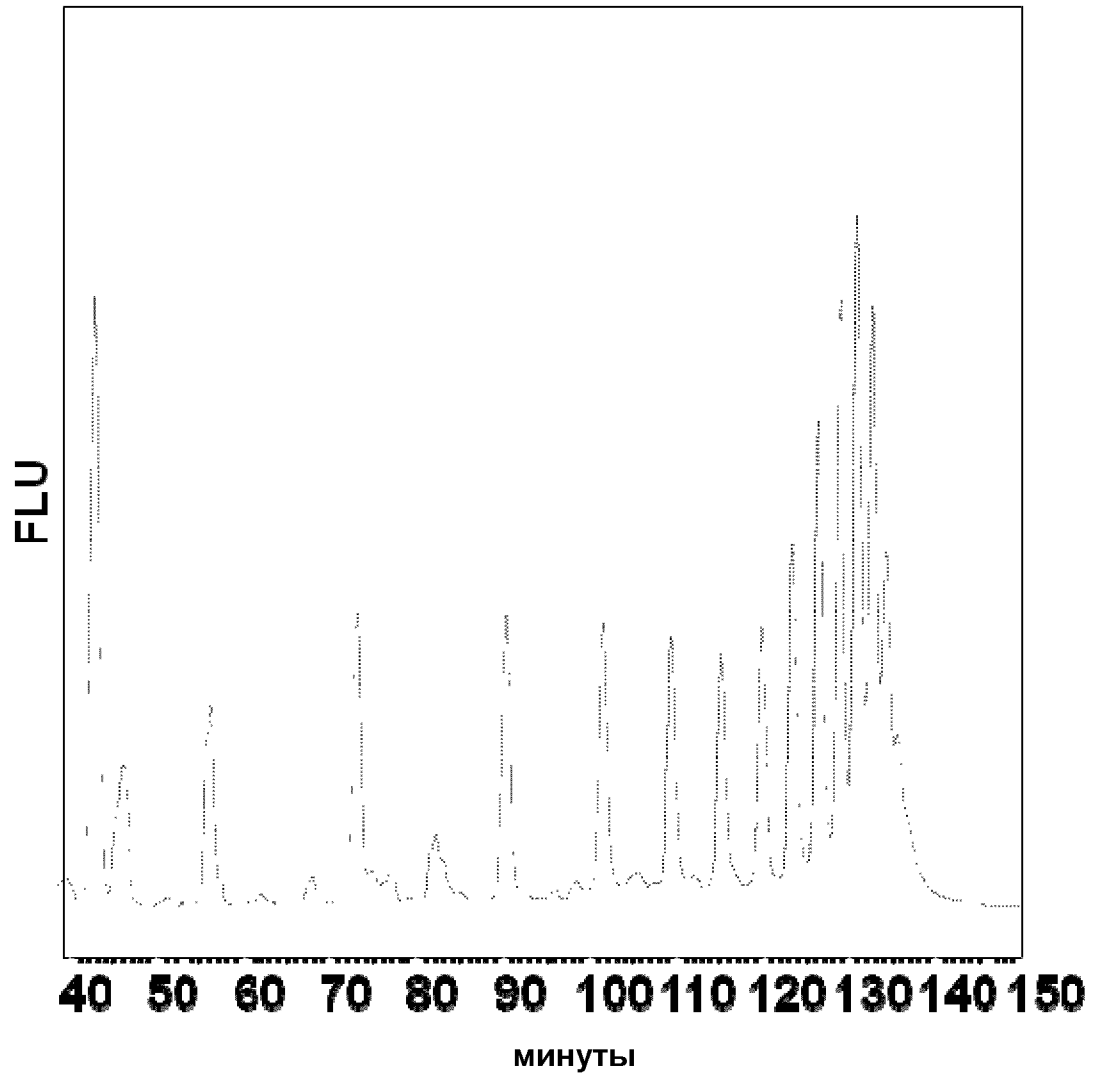
Кластер О-антигена O2 (*rfb*) 15,3 т.н.



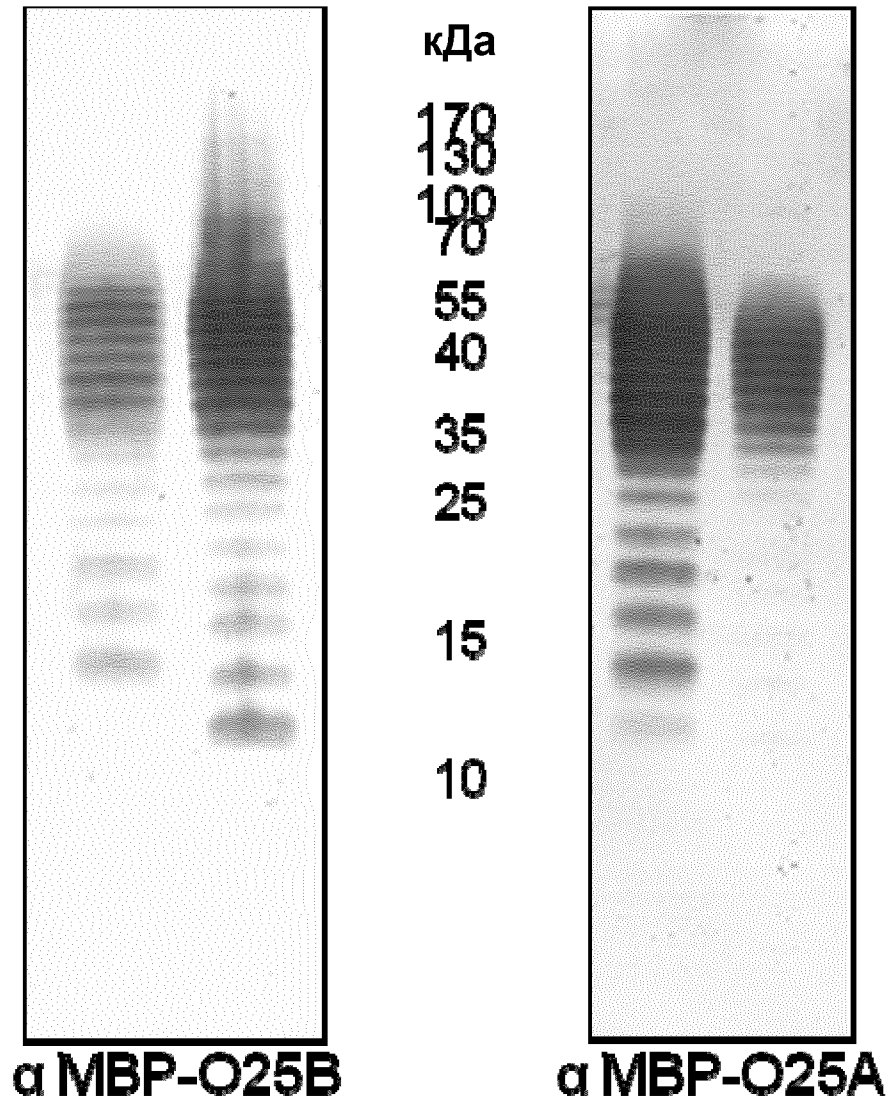
Фиг. 19 А-В



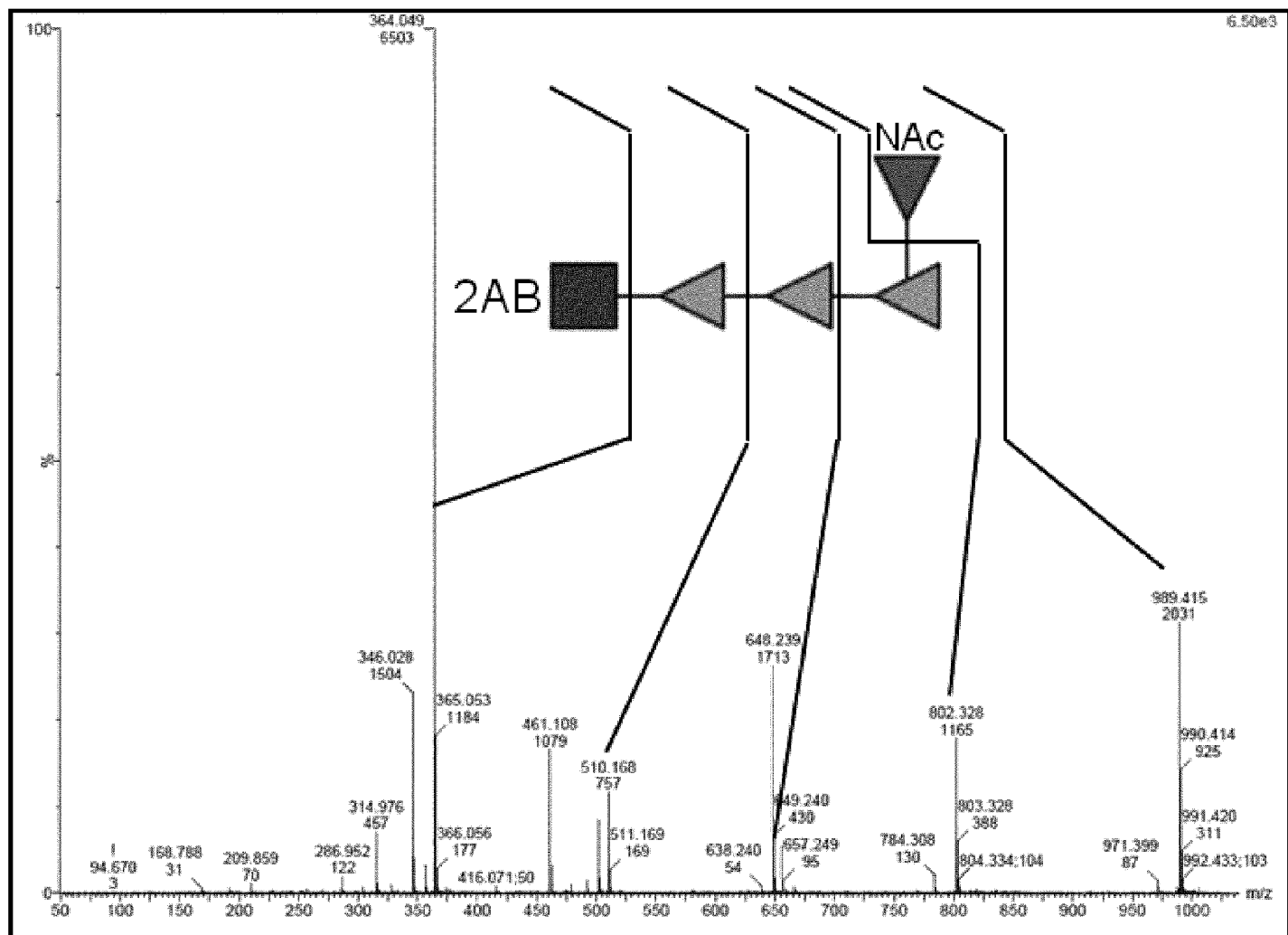
Фиг. 20 А-В



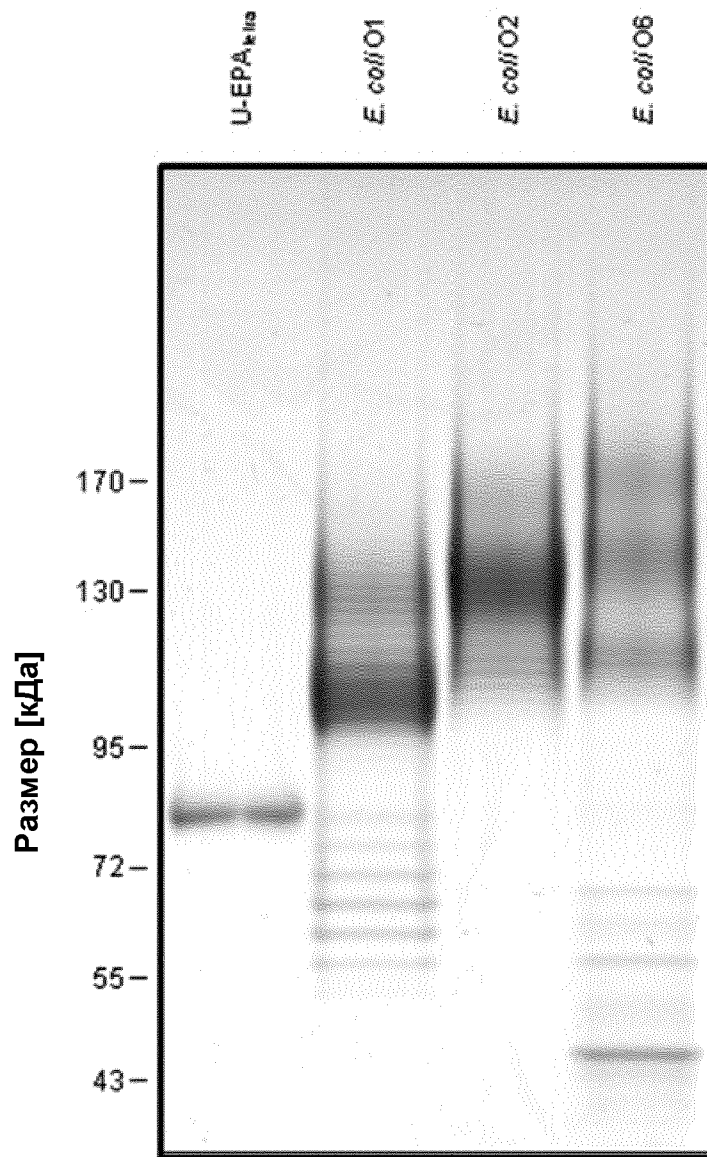
Фиг. 21



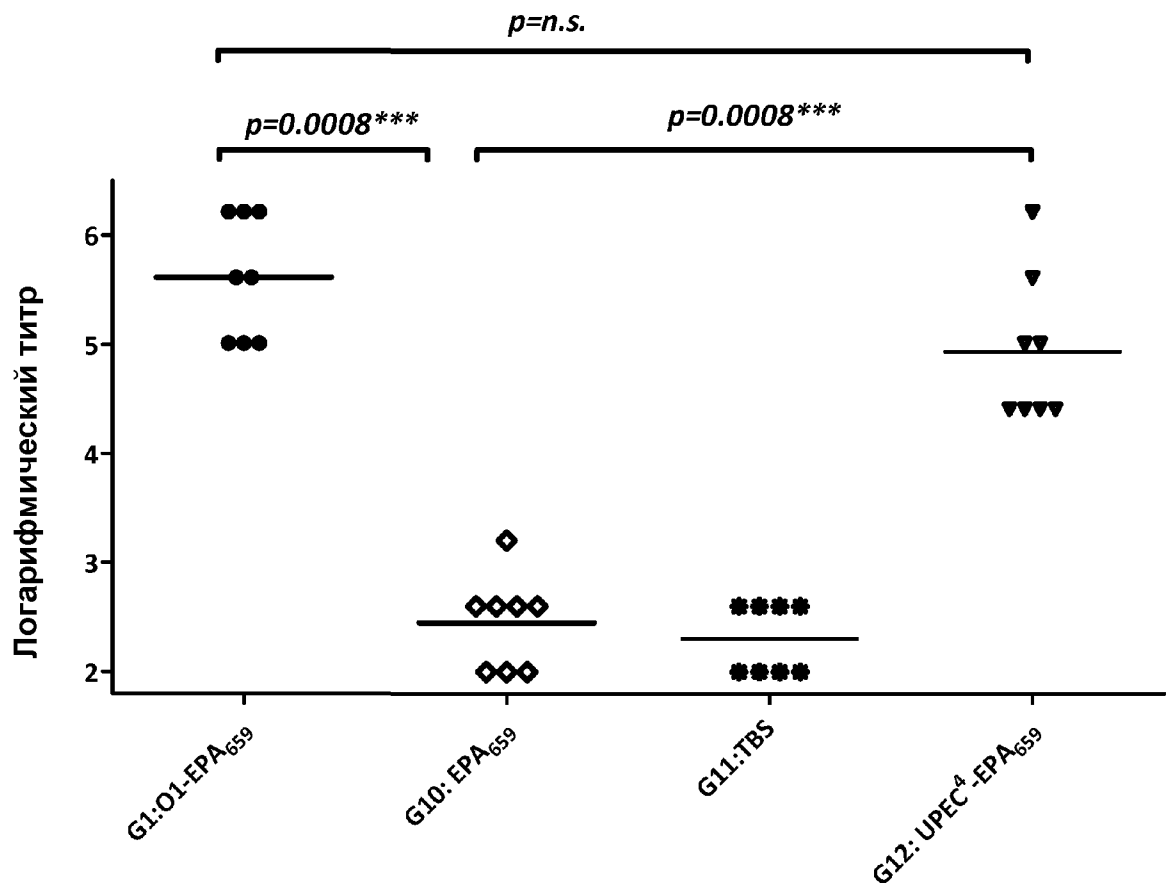
Фиг. 22



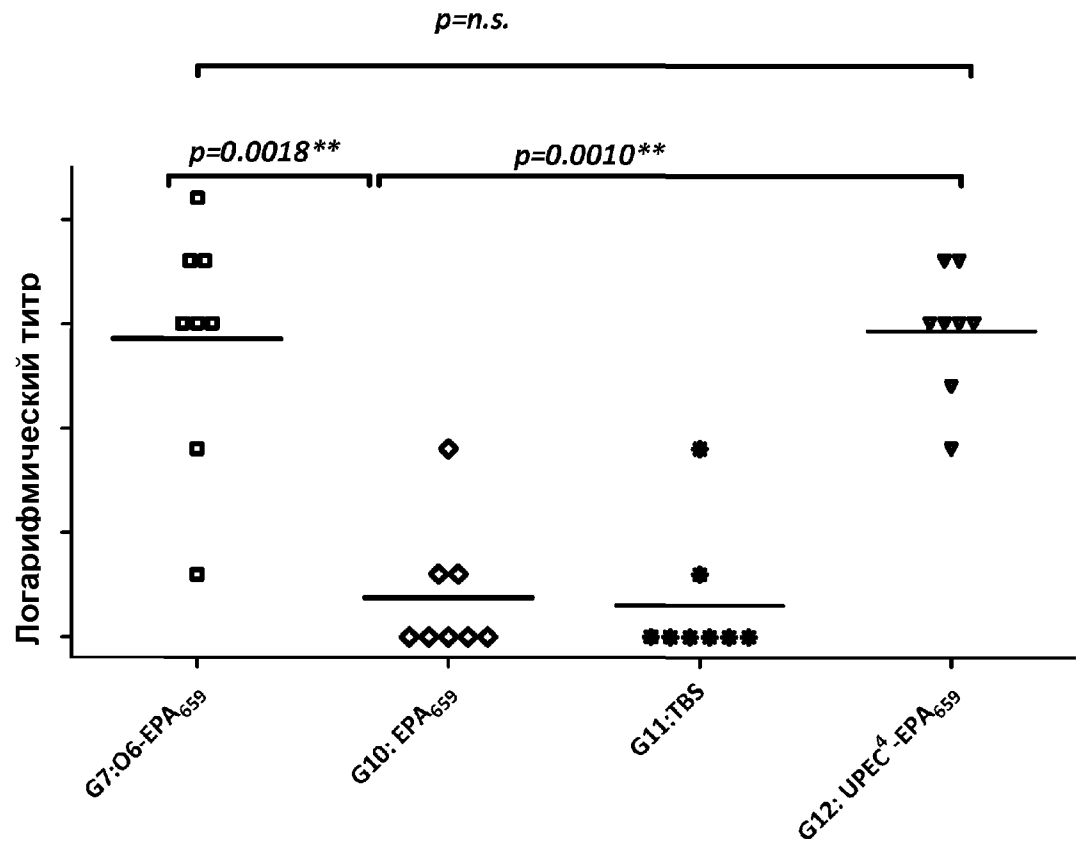
Фиг. 23



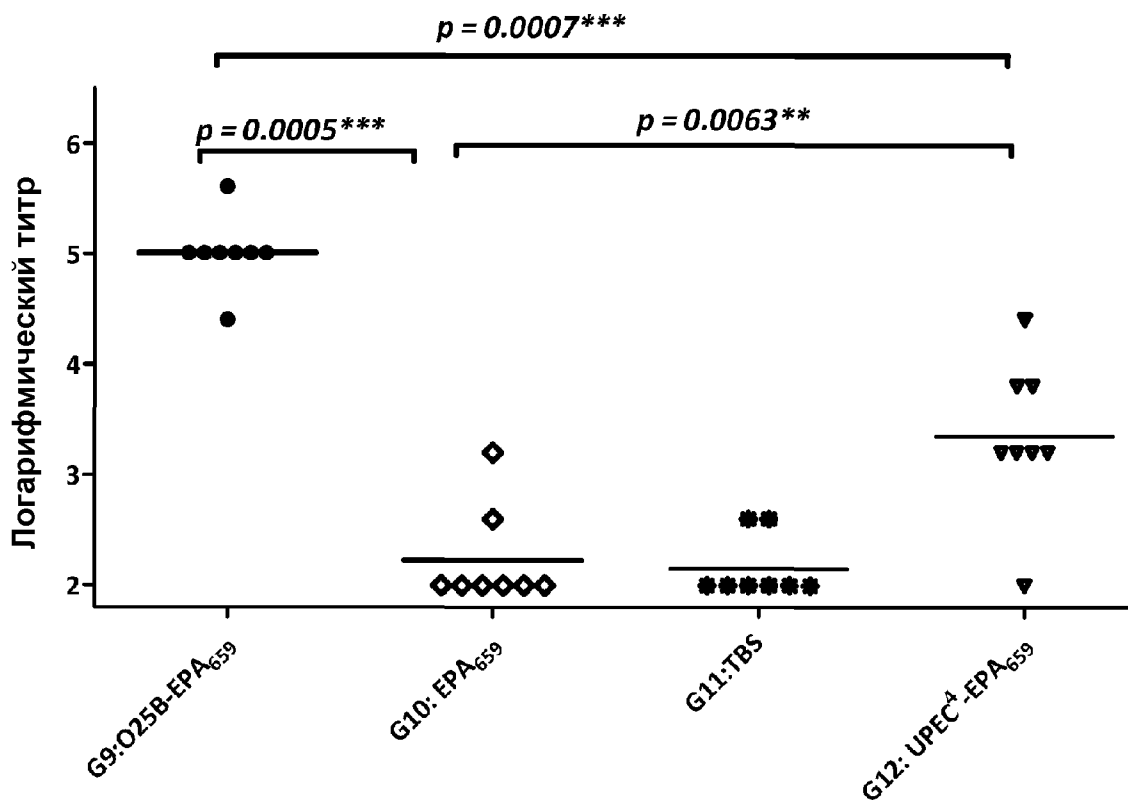
Фиг. 24



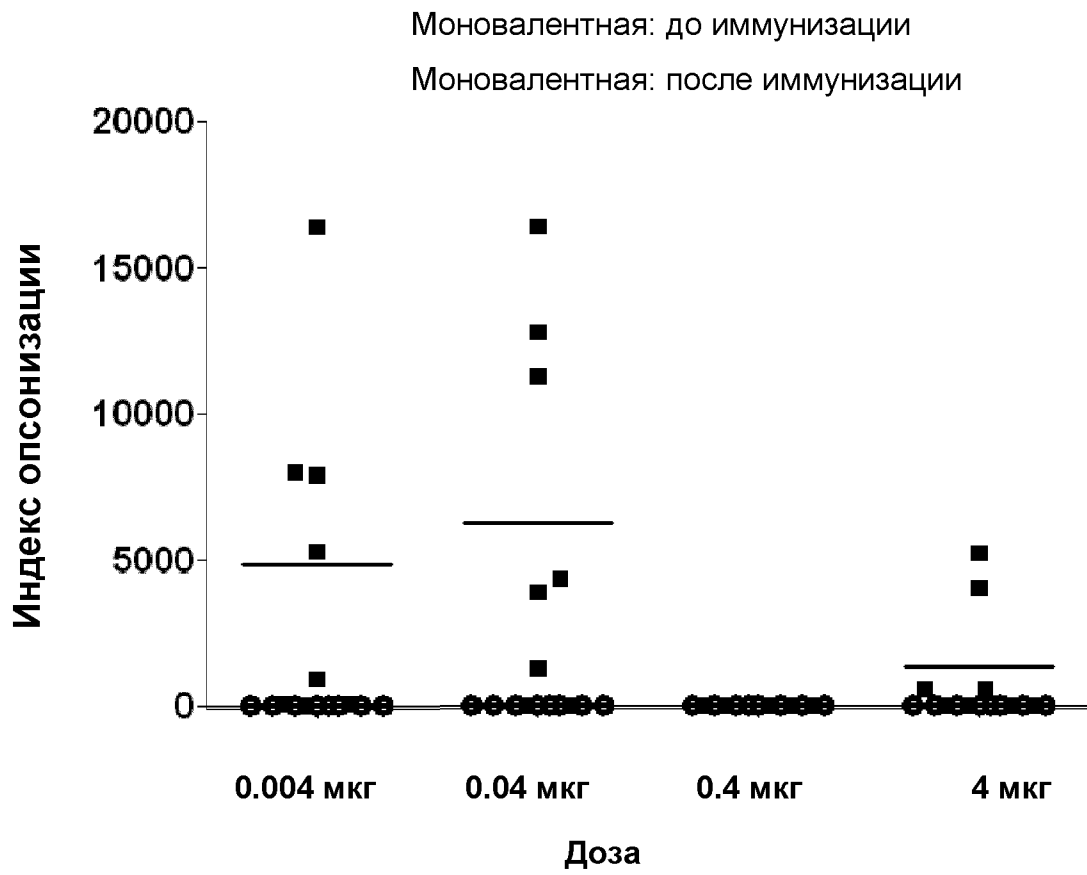
Фиг. 25



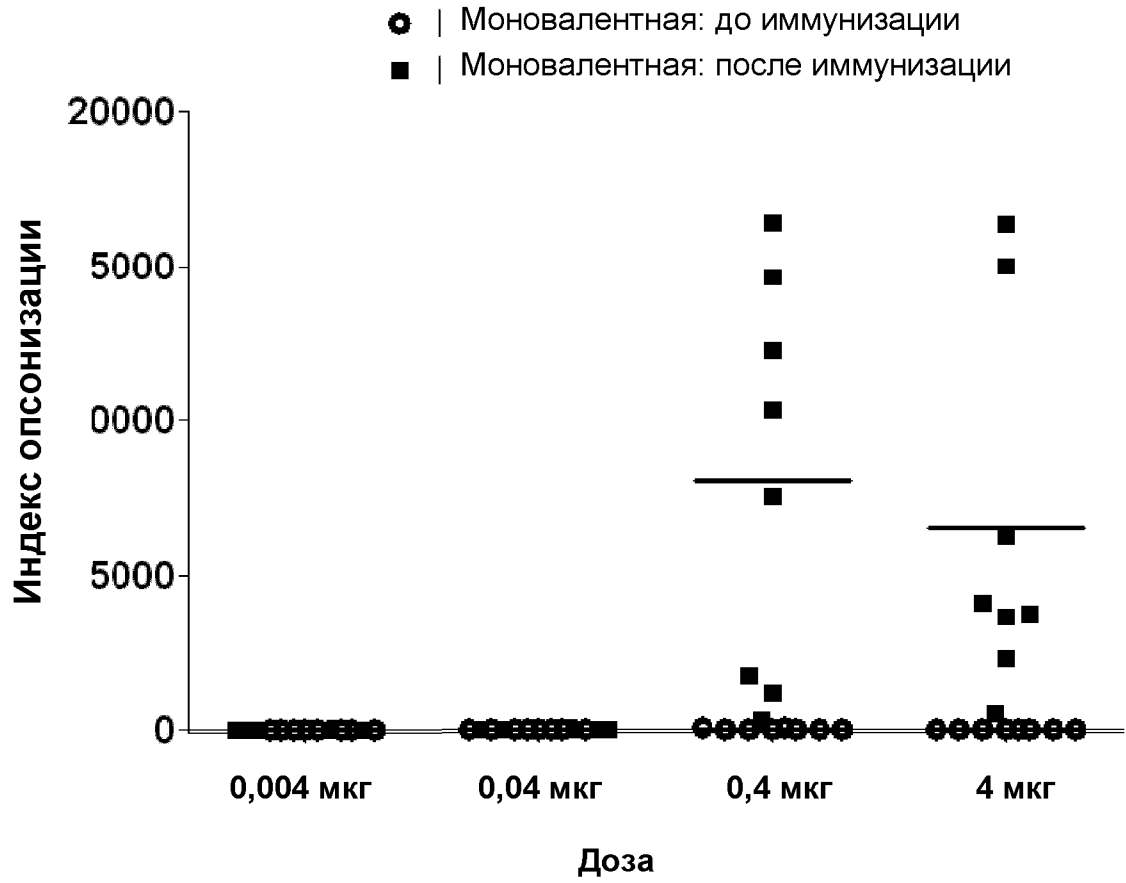
Фиг. 27



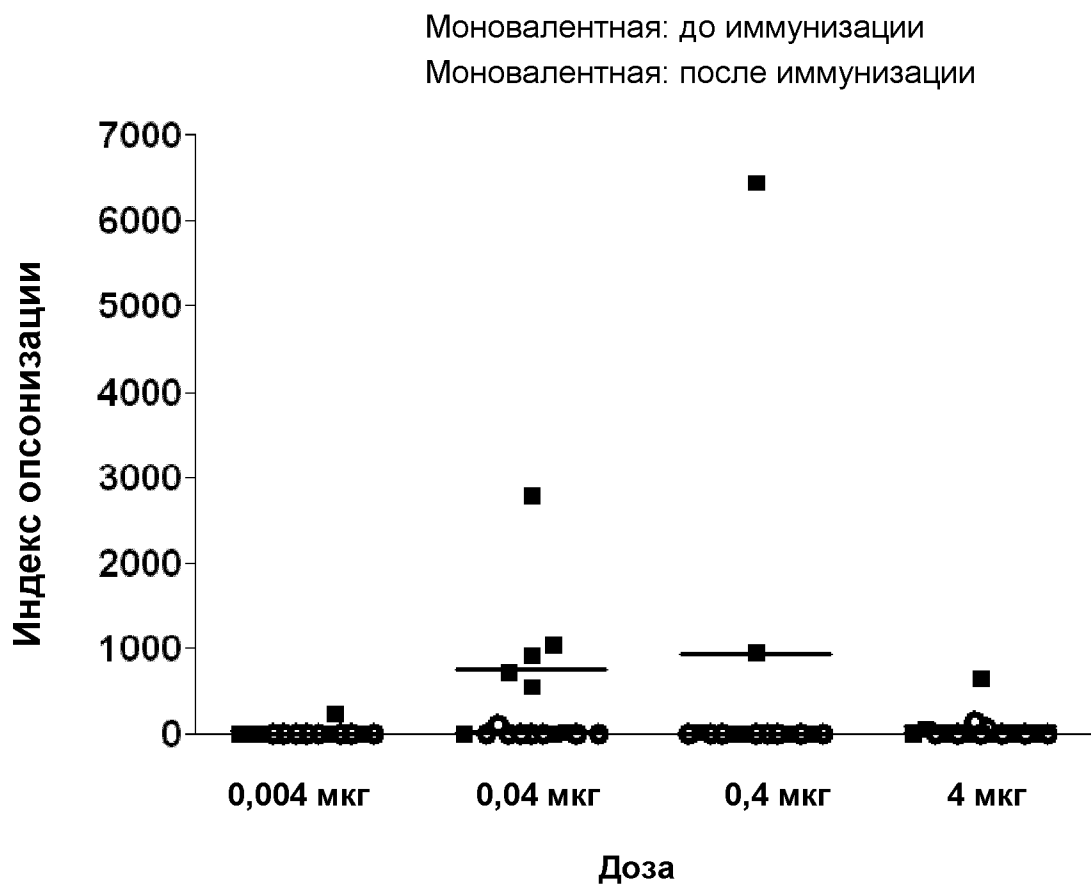
Фиг. 28



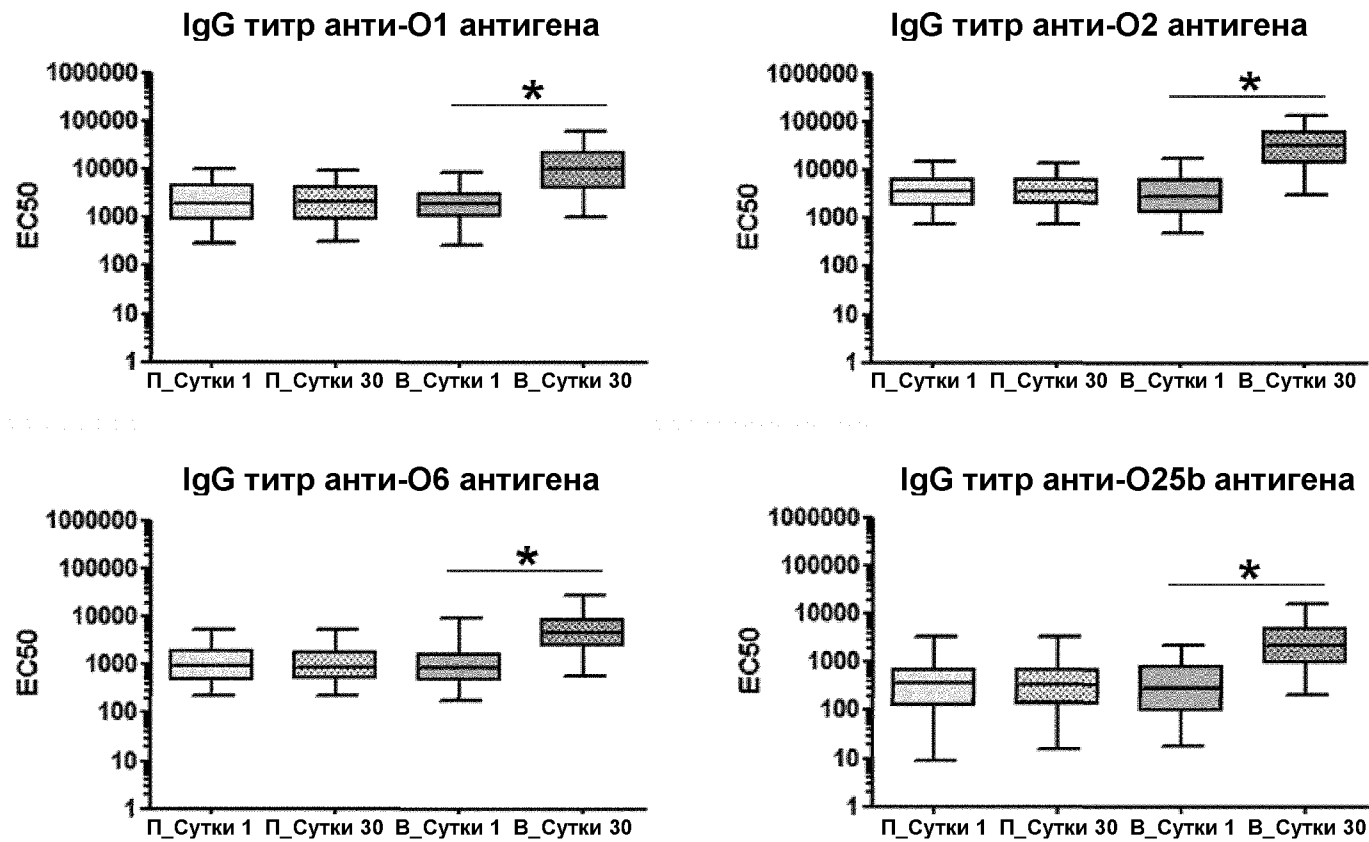
Фиг. 29 А



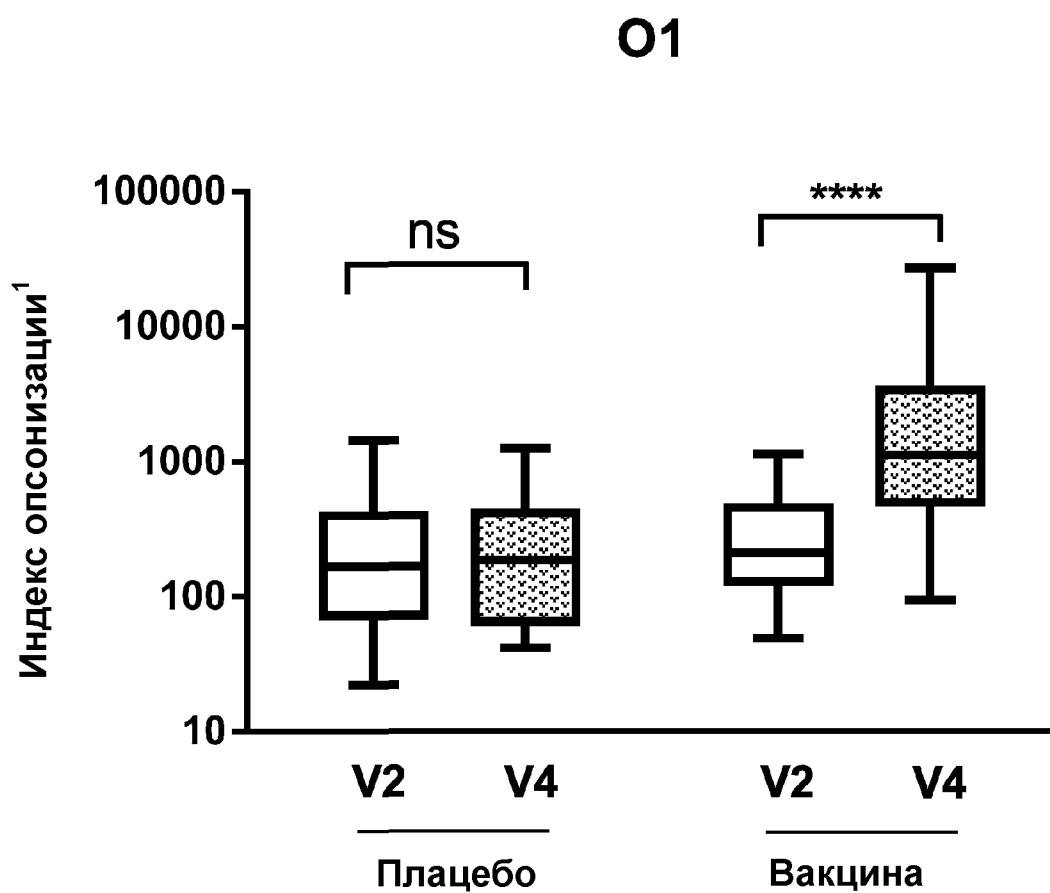
Фиг. 29В



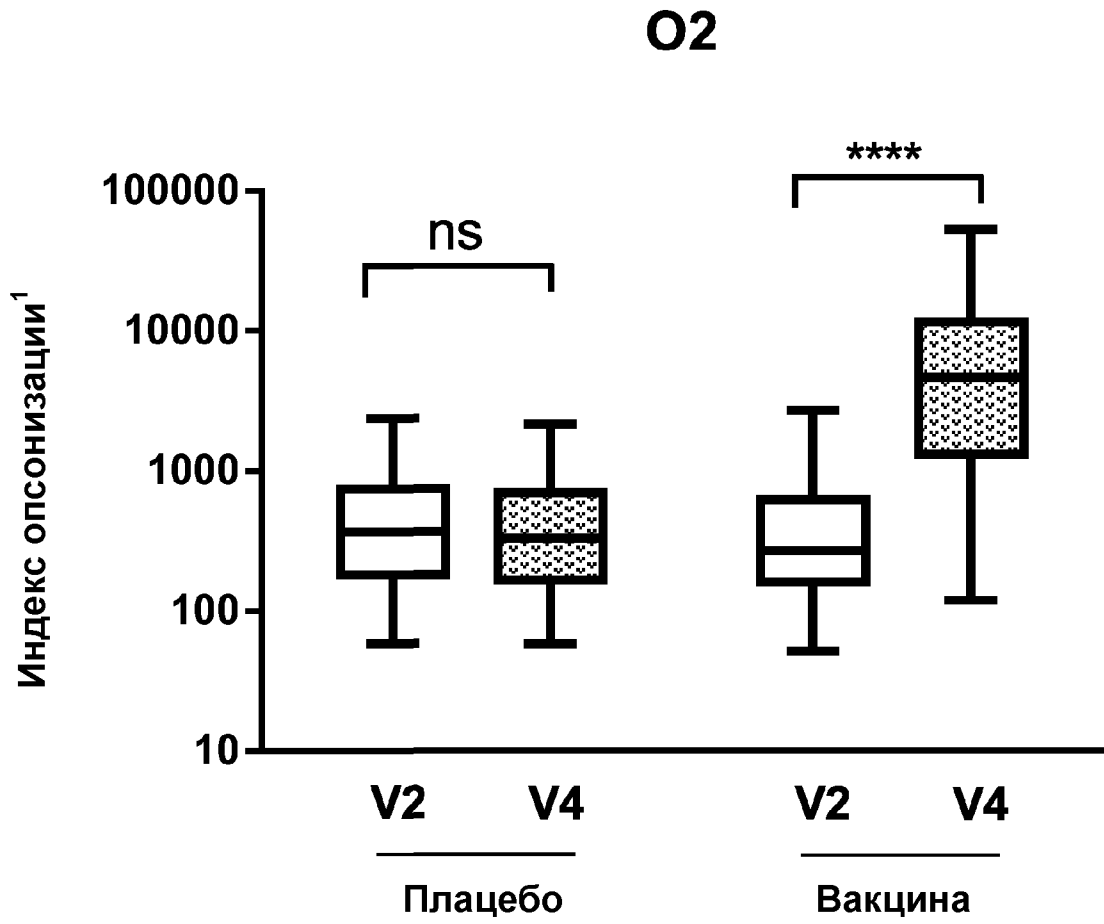
Фиг. 29С



Фиг. 30

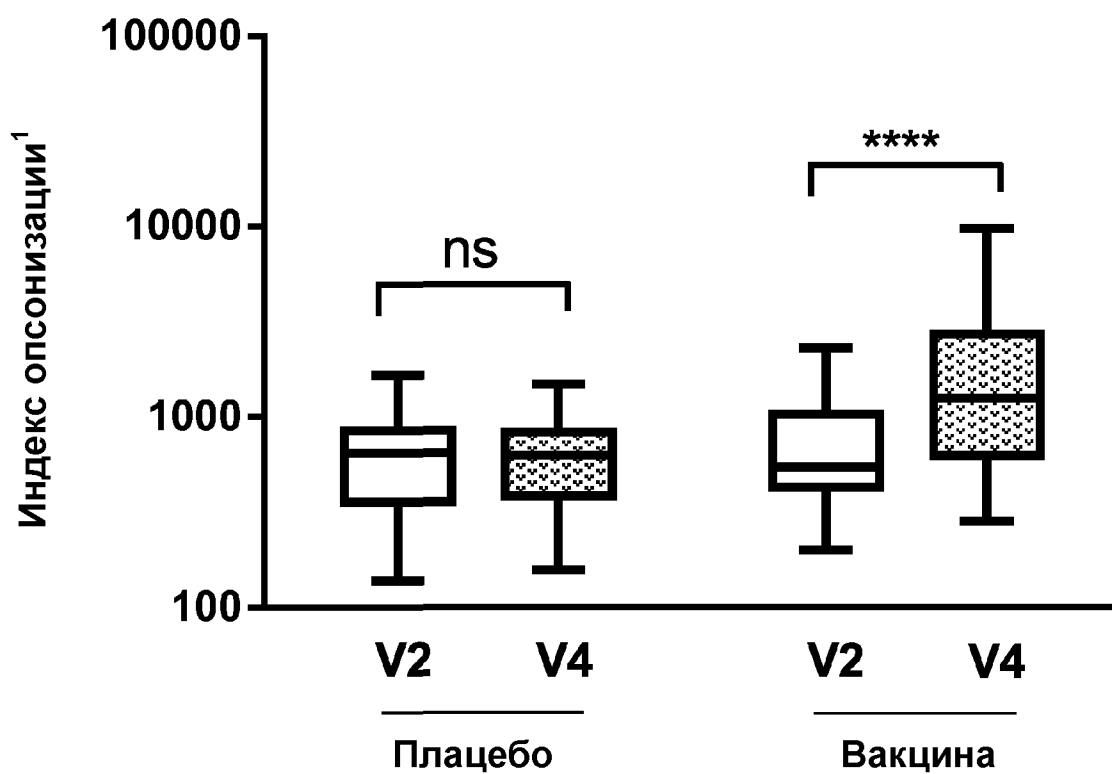


Фиг. 31А

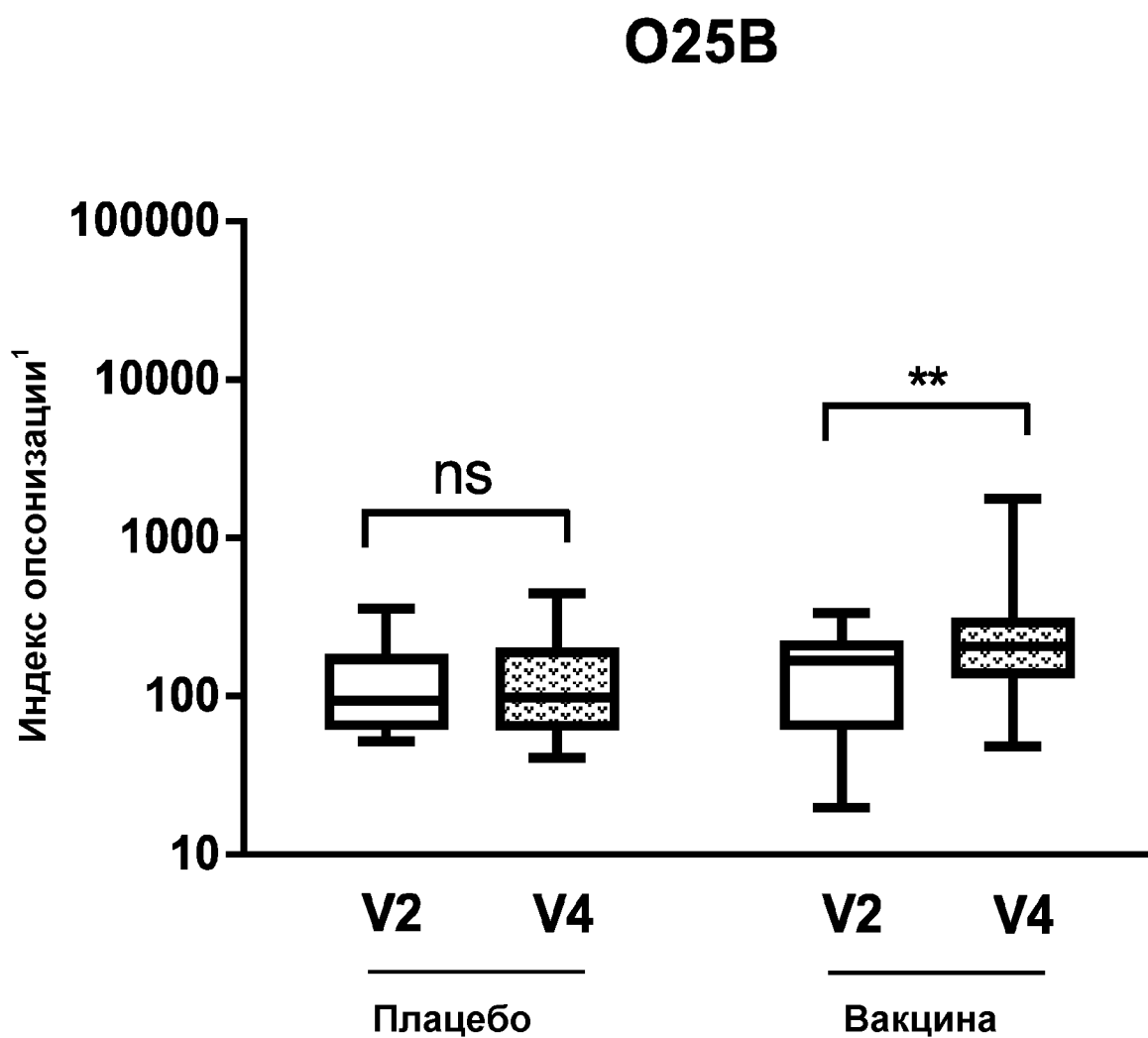


Фиг. 31В

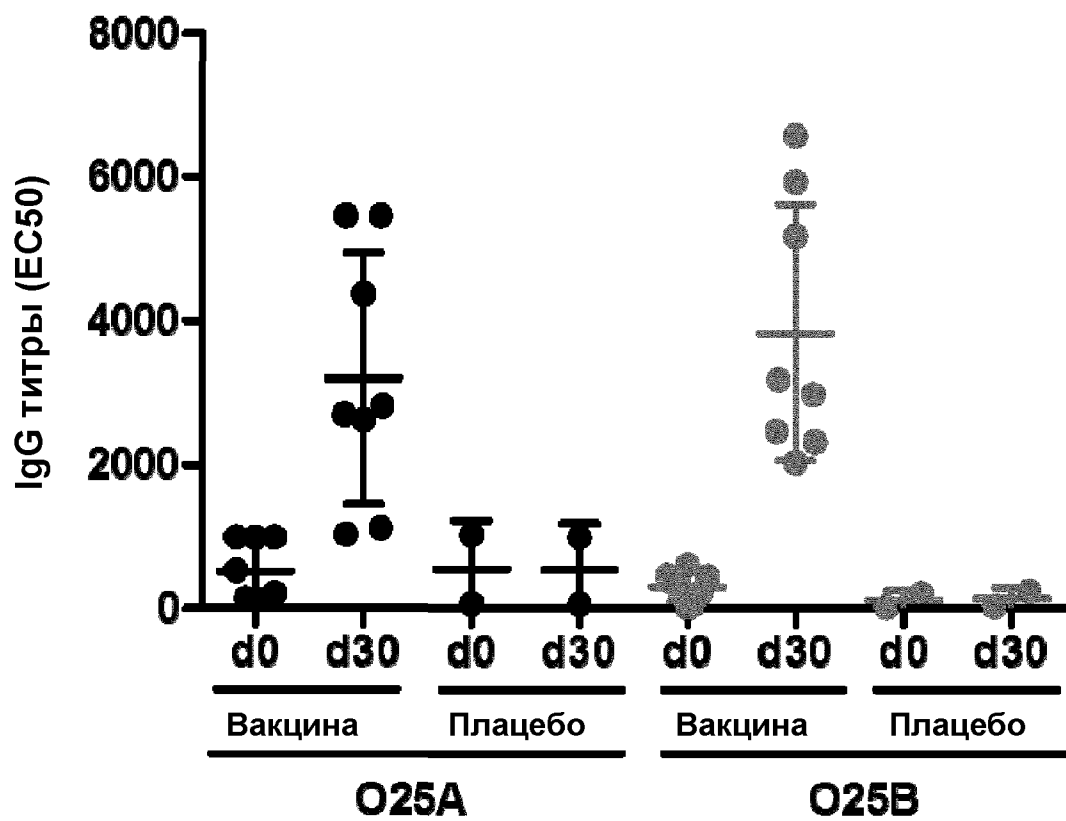
O6



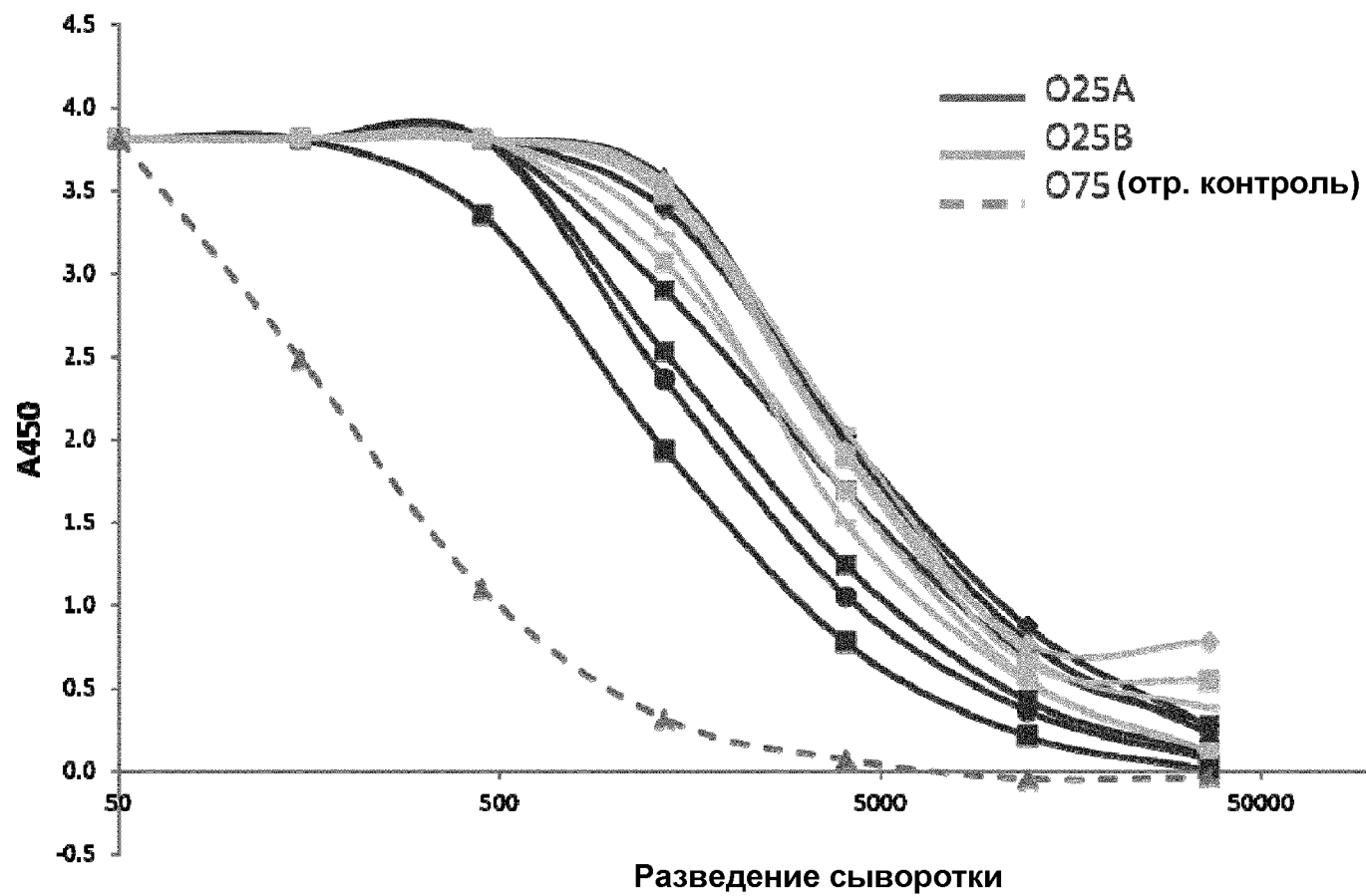
Фиг. 31С



Фиг. 31D



Фиг. 32



Фиг. 33