



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.04.05

(21) Номер заявки
201890400

(22) Дата подачи заявки
2016.08.24

(51) Int. Cl. *A61K 39/02* (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/108 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ИММУННОЙ ЗАЩИТЫ ПРОТИВ
ВНЕКИШЕЧНОЙ ПАТОГЕННОЙ E. COLI

(31) 62/209,091; 62/210,655

(32) 2015.08.24; 2015.08.27

(33) US

(43) 2018.09.28

(86) PCT/US2016/048278

(87) WO 2017/035181 2017.03.02

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ГЛАКСОСМИТКЛАЙН
БАЙОЛОДЖИКАЛС С.А. (ВЕ);
ЯНССЕН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Пулман Ян Тёнис (NL), Жакмин
Берт (ВЕ), Эббэнэт Даррен Роберт
(US), Ён Патрисия Ибарра (CH),
Германс Петер Вилхелмус Мария
(NL), Коварик Михель Томас, Веттер
Михель Лукас, Кеммлер Стэфан
Йохан, Хауптле Миха Андрес,
Гамбиллара Вероника, Малли
Мануэла (CH)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В. (RU)

(56) CROSS A. ET AL.: "Safety And
Immunogenicity Of A Polyvalent Escherichia Coli
Vaccine In Human Volunteers", JOURNAL OF
INFECTIOUS DISEASES. JID, vol. 170, no. 4,
1 October 1994 (1994-10-01), pages 834-840,

XP055311603, CHICAGO, IL. ISSN: 0022-1899,
DOI: 10.1093/infdis/170.4.834 abstract page 834,
right-hand column, paragraph 5 - page 835, left-hand
column, paragraph 1 table 2, table 3

CRYZ S.J. ET AL.: "Synthesis and
characterization of a polyvalent Escherichia
coli O-polysaccharide-toxin A conjugate vaccine",
VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 13,
no. 5, 1 January 1995 (1995-01-01), pages
449-453, XP004057719, ISSN: 0264-410X, DOI:
10.1016/0264-410X(94)00009-C abstract page 450,
right-hand column, paragraph 3

FELDMAN MARIO F. ET AL.: "Engineering
N-linked protein glycosylation with diverse O-antigen
lipopolysaccharide structures in Escherichia coli",
PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY
OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF
SCIENCES, US, vol. 102, no. 8, 22 February
2005 (2005-02-22), pages 3016-3021, XP009121034,
ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.0500044102
[retrieved on 2005-02-09] abstract

ROGERS B.A. ET AL.: "Escherichia coli
O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-
associated strain", JOURNAL OF ANTIMICROBIAL
CHEMOTHERAPY, vol. 66, no. 1, 1 January
2011 (2011-01-01), pages 1-14, XP55056619, ISSN:
0305-7453, DOI: 10.1093/jac/dkq415 abstract

WO-A2-2009104074

WO-A1-2014037585

WO-A1-2015124769

VAN DEN DOBBELSTEEN GERMIE P.J.M.
ET AL.: "Immunogenicity and safety of a tetravalent
E. coli O-antigen bioconjugate vaccine in animal
models", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 34,
no. 35, 6 July 2016 (2016-07-06), pages 4152-4160,
XP029644969, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/
J.VACCINE.2016.06.067 the whole document

(57) Описаны композиции и способы для индукции иммунного ответа против внекишечной патогенной Escherichia coli (ExPEC), за счет этого обеспечивая иммунную защиту против заболеваний, ассоциированных с ExPEC. В частности, описаны композиции и способы применения конъюгатов антигенов полисахаридов E. coli O25B, O1A, O2 и O6A, ковалентно связанных с белком-носителем, обезвреженным экзотоксином A Pseudomonas aeruginosa (EPA), в качестве вакцин для предупреждения инвазивного заболевания ExPEC, вызванного ExPEC серотипов O1A, O2, O6A и O25B.

Перекрестная ссылка на родственные заявки

В настоящей заявке испрашивается приоритет согласно предварительной заявке на патент США 62/209091, поданной 24 августа 2015 г., и предварительной заявке на патент США 62/210655, поданной 27 августа, 2015 г., описание которых включено во всей полноте посредством ссылки.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям и способам для индуцирования иммунного ответа против внекишечной патогенной *Escherichia coli* (ExPEC) для обеспечения за счет этого иммунной защиты против заболеваний, ассоциированных с ExPEC. В частности, воплощения настоящего изобретения относятся к мультивалентным вакцинам, содержащим конъюгаты полисахаридных антигенов *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A, каждый из которых ковалентно связан с белком-носителем, представляющим собой обезвреженный экзотоксин *A Pseudomonas aeruginosa*, и применениям указанных вакцин для обеспечения эффективной иммунной защиты против инфекции ExPEC.

Предшествующий уровень техники

Внекишечная патогенная *E. coli* (ExPEC) обычно является безвредным организмом, заселяющим пищеварительный тракт человека. Однако штаммы ExPEC могут обладать факторами вирулентности для колонизации и инфицирования сайтов за пределами желудочно-кишечного тракта, что вызывает различные тяжелые инвазивные заболевания, следствием которых являются ежегодная значительная заболеваемость, смертность и расходы (см., например, Johnson et al., J. Lab. Clin. Med. 2002; 139(3):155-162; Kohler et al., Int. J. Med. Microbiol. 2011; 301(8):642-647; Foxman, Am. J. Med. 2002; 113 Suppl. 1A:5S-13S; and Russo et al., Microbes Infect. 2003; 5(5):449-456). Штаммы ExPEC являются наиболее частой причиной инфекций мочевыводящего тракта (ИМП). Они также являются причиной инфекций области операционного вмешательства и неонатального менингита (Johnson et al., 2002; and Russo et al., 2003), связаны с инфекциями брюшной полости и таза и нозокомиальной пневмонией, порой сопровождают другие внекишечные инфекции, такие как остеомиелит, пилонидит и раневые инфекции. Все эти первичные очаги инфекции могут привести к бактериемии ExPEC (Russo et al., 2003). Устойчивость бактерий к антибиотикам является основной проблемой в борьбе с бактериальной инфекцией, и штаммы *E. coli* с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) становятся все более и более широко распространенными (см., например, 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). Появление и быстрое массовое распространение ExPEC с типом последовательности 131 (ST131) считается основным фактором, вызывающим повышенную лекарственную устойчивость, включая множественную лекарственную устойчивость (Johnson et al., Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(1):546-550; Rogers et al., J. Antimicrob Chemother. 2011; 66(1): 1-14). Этот клон обнаруживается у 12,5-30% от всех клинических изолятов ExPEC, в основном имеет серотип O25B:H4 и демонстрирует выраженную резистентность к фторхинолону, которая часто сопровождается устойчивостью к триметоприму/сульфаметоксазолу (Rogers et al., 2011, и Banerjee et al., Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58(9):4997-5004). Серотип O-антигена определяется химической структурой O-полисахаридного антигена, липополисахарида (LPS), являющегося составной частью внешней мембраны грамотрицательной бактерии. Описано более 180 O-антигенов *E. coli* (Stenutz et al., FEMS Microbial Rev. 2006; 30: 382-403). Инфекция ExPEC может быть вызвана любым серотипом. Хотя при инфекции ExPEC некоторые серотипы являются преобладающими, тем не менее поверхностные полисахариды изолятов ExPEC демонстрируют существенное антигенное разнообразие, что чрезвычайно осложняет разработку вакцин против ExPEC на основе поверхностных полисахаридов (Russo et al., Vaccine. 2007; 25: 3859-3870). Кроме того, некоторые O-антигены могут быть слабоиммуногенными. Как показали исследования вакцин на основе конъюгатов пневмококков, когда ряд серотипов могут вызывать заболевание, исключительно важное значение может иметь состав вакцины, как, например, выбор серотипов для включения в вакцину и дозировки включенных серотипов, поскольку применение вакцины против некоторых серотипов потенциально может увеличить носительство серотипов и заболевания, вызванные серотипами, не включенными в вакцину, или даже включенными в вакцину, но лишь слабо эффективными для иммунизации против серотипа (Lipsitch, Emerging Infectious Diseases; 1999, 5:336-345). В идеальном случае вакцина должна обеспечивать максимальную пользу в предупреждении заболеваний, вызванных серотипами, включенными в эту вакцину, при этом сводя к минимуму риск дополнительных заболеваний вследствие увеличения носительства серотипов, не входящих в состав вакцины.

Таким образом, в области техники существует потребность в вакцинах против ExPEC. В частности, существует потребность в вакцинах против ExPEC на основе поверхностных полисахаридов, которые могут применяться для обеспечения эффективной иммунной защиты против ExPEC серотипа O25B и других серотипов, широко распространенных среди ExPEC.

Краткое изложение сущности изобретения

При тестировании конъюгатов O-антигенов, каждый из которых ковалентно связан с белком-носителем, представляющим собой обезвреженный экзотоксин *A P. aeruginosa* (ЕРА), неожиданно обнаружили, что антиген O25B *E. coli* является несколько менее иммуногенным по сравнению с другими O-антигенами *E. coli* (например, O1A, O2 и O6A), и что вакцинация композицией, содержащей конъюгаты ЕРА антигена *E. coli* O25B и конъюгаты ЕРА одного или более дополнительных O-антигенов *E. coli* в

соответствующей дозе и соотношении обеспечивает улучшенный иммунный ответ против ExPEC серотипа O25B и одного или более дополнительных О-серотипов ExPEC. Соответственно, в одном общем аспекте изобретение относится к композиции, содержащей антиген E. coli O25B в первой концентрации от 8 до 48 мкг/мл и по меньшей мере один дополнительный О-антиген E. coli во второй концентрации, которая составляет от 10 до 100% от первой концентрации, где каждый из антигена E. coli O25B и по меньшей мере одного дополнительного О-антигена E. coli независимо ковалентно связан с белком-носителем ЕРА, и композиция эффективна в индуцировании иммунного ответа против антигена E. coli O25B и по меньшей мере одного дополнительного О-антигена E. coli у субъекта, нуждающегося в этом. В предпочтительном воплощении по меньшей мере один дополнительный О-антиген E. coli присутствует во второй концентрации по меньшей мере 5 мкг/мл, более предпочтительно во второй концентрации по меньшей мере 8 мкг/мл.

В одном воплощении изобретение относится к композиции, содержащей антиген E. coli O25B в первой концентрации от 10 до 36 мкг/мл, и по меньшей мере один дополнительный О-антиген E. coli, выбранный из группы, состоящей из антигена E. coli O1A, антигена E. coli O2 и антигена E. coli O6A, где каждый из дополнительных О-антигенов E. coli имеет концентрацию, которая независимо составляет от 50 до 100% от первой концентрации антигена E. coli O25B в композиции, и каждый из антигенов E. coli O25B, O1A, O2 и O6A независимо ковалентно связан с белком-носителем ЕРА.

В одном предпочтительном воплощении изобретение относится к композиции, содержащей антиген E. coli O25B в первой концентрации от 10 до 36 мкг/мл, и каждый из антигена E. coli O1A, антигена E. coli O2 и антигена E. coli O6A во второй концентрации, где каждый из антигенов E. coli O25B, O1A, O2 и O6A независимо ковалентно связан с белком-носителем ЕРА и соотношение первой концентрации ко второй концентрации составляет от 1:1 до 2:1. Предпочтительно композиция содержит антигенные полисахариды E. coli O25B, O1A, O2 и O6A в соотношении доз 1:1:1:1 или 2:1:1:1. Более предпочтительно композиция содержит 16 или 32 мкг/мл антигена O25B. В другом общем аспекте изобретение относится к способу индуцирования иммунного ответа против внекишечной патогенной E. coli (ExPEC) у субъекта, нуждающегося в этом. Способ включает введение субъекту антигена E. coli O25B в первом эффективном количестве от 4 до 24 мкг на введение и по меньшей мере одного дополнительного О-антигена E. coli во втором эффективном количестве, которое составляет от 10 до 100% от первого эффективного количества, где каждый из антигена E. coli O25B и по меньшей мере одного дополнительного О-антигена E. coli независимо ковалентно связан с белком-носителем ЕРА, и введение эффективно для индуцирования у субъекта иммунного ответа против антигена E. coli O25B и по меньшей мере одного дополнительного О-антигена E. coli. В предпочтительном воплощении по меньшей мере один дополнительный О-антиген E. coli вводят во втором эффективном количестве по меньшей мере 3 мкг на введение, более предпочтительно во втором эффективном количестве по меньшей мере 4 мкг на введение. Антиген E. coli O25B и по меньшей мере один дополнительный О-антиген E. coli можно вводить в одной композиции или вводить в комбинации нескольких композиций.

В одном воплощении изобретение относится к способу индуцирования иммунного ответа против ExPEC у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту антигена E. coli O25B в первом эффективном количестве от 5 до 18 мкг на введение, более предпочтительно от 8 до 16 мкг на введение и по меньшей мере одного дополнительного О-антигена E. coli, выбранного из группы, состоящей из антигена E. coli O1A, антигена E. coli O2 и антигена E. coli O6A, где каждый из дополнительных О-антигенов E. coli вводят в эффективном количестве, которое независимо составляет от 50 до 100% от первого эффективного количества антигена E. coli O25B, и каждый из антигенов E. coli O25B, O1A, O2 и O6A независимо ковалентно связан с белком-носителем ЕРА. В одном предпочтительном воплощении изобретение относится к способу индуцирования иммунного ответа против ExPEC у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту антигена E. coli O25B в первом эффективном количестве от 5 до 18 мкг на введение, более предпочтительно от 8 до 16 мкг на введение, и каждого из антигена E. coli O1A, антигена E. coli O2 и антигена E. coli O6A во втором эффективном количестве, где каждый из антигенов E. coli O25B, O1A, O2 и O6A независимо ковалентно связан с белком-носителем ЕРА и соотношение первого эффективного количества ко второму эффективному количеству составляет от 1:1 до 2:1. Предпочтительно антигены E. coli O25B, O1A, O2 и O6A вводят в дозовом соотношении 1:1:1:1 или 2:1:1:1 и антиген E. coli O25B вводят в количестве 5 мкг, 8 мкг или 16 мкг на введение. В предпочтительном воплощении антигены E. coli O25B, O1A, O2 и O6A вводят субъекту в одной композиции, более предпочтительно в композициях, содержащих антигены E. coli O25B, O1A, O2 и O6A, каждый из которых независимо ковалентно связан с белком-носителем ЕРА, где концентрации указанных О-антигенов в композициях выбраны, соответственно, из 16:8:8:8 мкг/мл (т.е. 16 мкг/мл антигена O25B, 8 мкг/мл антигена O1A, 8 мкг/мл антигена O2 и 8 мкг/мл антигена O6A), 16:16:16:16 мкг/мл, 32:16:16:16 мкг/мл и 32:32:32:32 мкг/мл. Предпочтительно 0,5 мл такой композиции вводят субъекту для достижения дозы антигенов E. coli O25B, O1A, O2 и O6A на введение, соответственно, 8:4:4:4 мкг (т.е. 8 мкг антигена O25B, 4 мкг антигена O1A, 4 мкг антигена O2 и 4 мкг антигена O6A), 8:8:8:8 мкг, 16:8:8:8 мкг или 16:16:16:16 мкг. Согласно предпочтительному воплощению иммунный ответ, индуцируемый способом по данному изобретению у субъекта, нуждающегося в этом, предупреждает инвазивное заболевание Ex-

РЕС, вызванное ЕхРЕС серотипов O1A, O2, O6A и O25B. Заболевания, связанные с заболеваниями ЕхРЕС, или заболевания ЕхРЕС включают без ограничения инфекции мочевыводящих путей, инфекции области операционного вмешательства, бактериемию, инфекции брюшной полости или таза, пневмонию, нозокомиальную пневмонию, остеомиелит, паникулит, пиелонефрит, раневые инфекции, менингит, неонатальный менингит, перитонит, холангит, инфекции мягких тканей, пиомиозит, септический артрит и сепсис. Предпочтительно субъект-человек является субъектом-человеком, подверженным риску, который имеет инвазивное заболевание ЕхРЕС, или подвержен риску его возникновения, таким как человек пожилого возраста, госпитализированный пациент, ребенок, человек с ослабленным иммунитетом, беременная женщина, люди с диабетом или раневыми повреждениями, люди, у которых недавно было проведено или планируется проведение хирургического вмешательства и т.д.

Согласно воплощению изобретения каждый из О-антигенов ковалентно связан с белком-носителем ЕРА по остатку Asn последовательности гликозилирования, содержащей Asp (Glu)-X-Asn-Z-Ser (Thr) (SEQ ID NO: 3), где X и Z независимо выбраны из любой аминокислоты естественного происхождения, за исключением Pro. В предпочтительном воплощении белок-носитель ЕРА содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В другом воплощении О-антиген ковалентно связан с белком-носителем ЕРА при массовом соотношении полисахарид-белок от 1:7 до 1:2, предпочтительно от 1:5 до 1:2. Например, в конъюгате О-антиген/ЕРА согласно воплощению изобретения масса О-антигена может составлять от 15 до 50% или от 20 до 40% от массы ЕРА.

Другой аспект изобретения относится к способу получения композиции в соответствии с воплощением изобретения, включающий объединение в составе одной композиции антигенов E. coli O25B, O1A, O2 и O6A, каждый из которых независимо связан с белком-носителем ЕРА.

Следующий аспект изобретения относится к применению композиции в соответствии с воплощением изобретения для изготовления вакцины или лекарственного средства для индуцирования иммунного ответа против ЕхРЕС или для предупреждения или лечения заболевания, связанного с ЕхРЕС, у субъекта, нуждающегося в этом.

Краткое описание графических материалов

Приведенное ниже краткое описание, а также подробное описание изобретения будет более понятным при прочтении в привязке к графическим материалам. Следует понимать, что изобретение не ограничено конкретными воплощениями, приведенными в графических материалах. В графических материалах

фиг. 1 является приведенным в качестве примера представлением платформы для получения глико-конъюгатной вакцины: цитоплазма (показана серым) клетки-хозяина содержит все ДНК конструкции, необходимые для рекомбинантной продукции конъюгата О-антиген/ЕРА в периплазме (показана белым) клетки-хозяина;

фиг. 2 является детальным представлением процесса гликозилирования белка, представленным в виде схемы;

на фиг. 3А-3В представлены показатели индекса опсонизации (ИО), полученные с сывороткой, полученной у крыс до иммунизации (незакрашенные круги) и через 42 суток после иммунизации (закрашенные круги) одной примирующей дозой и двумя бустерными дозами моновалентной вакцины в указанных дозах; фиг. 3А: иммунизация O2-ЕРА; фиг. 3Б: иммунизация O6А-ЕРА; фиг. 3В: иммунизация O25В-ЕРА;

на фиг. 4 показаны титры ELISA (иммуноферментный анализ), полученные с сывороткой людей, вакцинированных плацебо или четырехвалентной вакциной, содержащей антигены E. coli O1A, O2, O6A и O25B в количестве 4 мкг полисахарида на серотип; существенное увеличение титров ELISA после инъекции (30 суток после инъекции) по сравнению с титрами до инъекции (1 сутки) наблюдалось только в вакцинированных группах (* означает статистическую значимость, где несколько * означают увеличение уровня значимости; НД означает отсутствие достоверных различий); и

на фиг. 5А-5Г изображены ИО, полученные с сывороткой людей, вакцинированных четырехвалентной вакциной, содержащей антигены E. coli O1A, O2, O6A и O25B в количестве 4 мкг полисахарида на серотип; иммунный ответ представлен ИО для плацебо в сравнении с компонентами четырехвалентной вакцины; фиг. 5А: O1А-ЕРА; фиг. 5Б: O2-ЕРА; фиг. 5В: O6А-ЕРА и фиг. 5Г: O25В-ЕРА; до инъекции (1 сутки) и после инъекции (30 суток после инъекции), где значимое увеличение ИО после инъекции по сравнению со значениями до инъекции (обозначены *, несколько * означают увеличение уровня значимости; НД означает отсутствие достоверных различий) наблюдалось только в вакцинированных группах; НД означает отсутствие достоверных различий.

Подробное описание изобретения

Каждая из публикаций, статей и патентов, которые процитированы или описаны в разделе "Предшествующий уровень техники" или в других разделах описания, включены во всей полноте посредством ссылки. Обсуждение документов, действий, материалов, устройств, изделий и т.п., которые включены в настоящее описание, служит для раскрытия контекста изобретения. Такое обсуждение не является допущением, что какой-либо из указанных объектов или все из них являются частью уровня техники по отношению к любому из изложенных или заявленных изобретений.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют обычное значение, известное специалистам в области, к которой относится настоящее изобретение. В противоположном случае, некоторые упомянутые термины имеют значение, указанное в описании. Все патенты, опубликованные заявки на патент и публикации, процитированные в настоящем описании, включены посредством ссылки во всей полноте. Следует отметить, что в описании и формуле изобретения все термины в единственном числе охватывают указанные объекты во множественном числе, за исключением случаев, когда из контекста явным образом не следует противоположное.

В настоящем описании термины "О-полисахарид", "О-антиген", "О-антиген", "О-антигенный полисахарид", "О-полисахаридный антиген" и аббревиатура "OPS" относятся к О-антигену грамотрицательных бактерий, который является компонентом липополисахарида (LPS) и является специфичным для каждого серотипа или серо(под)типа грамотрицательных бактерий. О-антиген обычно содержит повторяющиеся единицы (RU), включающие от 2 до 7 сахарных остатков. В настоящем описании RU приравнивается к биологическим повторяющимся единицам (BRU). BRU описывает RU О-антигена, когда он синтезируется *in vivo*.

В настоящем описании термины "конъюгат" и "гликоконъюгат" относятся к конъюгированному продукту, содержащему О-антиген *E. coli*, ковалентно связанный с белком-носителем. Конъюгат может представлять собой биоконъюгат, который является продуктом конъюгирования, полученным в клетке-хозяине, где аппарат клетки-хозяина продуцирует О-антиген и белок-носитель и присоединяет О-антиген к белку-носителю, например, посредством N-связей. Конъюгат также может быть получен другими способами, например химическим соединением белка и углеводного антигена. В настоящем описании термин "эффективное количество" применительно к введению субъекту О-антигена способами согласно воплощениям изобретения относится к количеству О-антигена, достаточному для индуцирования у субъекта желаемого иммунного эффекта или иммунного ответа. В некоторых воплощениях "эффективное количество" относится к количеству О-антигена, которое достаточно, чтобы обеспечить иммунитет у субъекта для достижения у субъекта одного или более из следующих эффектов: (i) предотвратить развитие или начало инфекции ЕхРЕС, предпочтительно инвазивного заболевания ЕхРЕС или связанных с ним симптомов; (ii) предотвратить рецидив инфекции ЕхРЕС, предпочтительно инвазивного заболевания ЕхРЕС или связанных с ним симптомов; (iii) предупредить, сократить или уменьшить тяжесть инфекции ЕхРЕС, предпочтительно инвазивного заболевания ЕхРЕС или связанных с ним симптомов; (iv) сократить продолжительность инфекции ЕхРЕС, предпочтительно инвазивного заболевания ЕхРЕС или связанных с ним симптомов; (v) предотвратить прогрессирование инфекции ЕхРЕС, предпочтительно инвазивного заболевания ЕхРЕС или связанных с ним симптомов; (vi) вызвать регрессию инфекции ЕхРЕС или связанных с ней симптомов; (vii) предупредить или уменьшить органную недостаточность, связанную с инфекцией ЕхРЕС; (viii) снизить вероятность или частоту госпитализаций субъекта, имеющего инфекцию ЕхРЕС; (ix) уменьшить продолжительность госпитализации у субъекта, имеющего инфекцию ЕхРЕС; (x) повысить выживаемость субъекта с инфекцией ЕхРЕС, предпочтительно с инвазивным заболеванием ЕхРЕС; (xi) устранить инфекцию ЕхРЕС, предпочтительно инвазивного заболевания ЕхРЕС; (xii) подавить или снизить репликацию ЕхРЕС; и/или (xiii) усилить или улучшить профилактические или терапевтические эффекты другой терапии.

"Эффективное количество" может варьировать в зависимости от различных факторов, таких как физическое состояние субъекта, возраст, масса, состояние здоровья и т.д.; способ введения, такой как пероральный или парентеральный; вводимая композиция, такая как целевой О-антиген, другие вводимые совместно О-антигены, адъювант и т.д.; и конкретное заболевание, против которого необходим иммунитет. Когда О-антиген ковалентно связан с белком-носителем, эффективное количество О-антигена рассчитывают только по О-антигенной полисахаридной группировке, входящей в состав конъюгата.

В настоящем описании термин "в комбинации" применительно к введению субъекту двух или более О-антигенов или композиций не ограничивает порядка, в котором субъекту вводят О-антигены или композиции. Например, первую композицию можно вводить до (например, за 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 12 ч, 16 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель), одновременно или после (например, через 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 12 ч, 16 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) введения субъекту второй композиции.

В настоящем описании "субъект" означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, более предпочтительно человека, которое будет или было вакцинировано способом согласно воплощению изобретения. Термин "млекопитающее", используемый в настоящем описании, охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают без ограничения коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, человека и т.д., наиболее предпочтительно человека. В некоторых воплощениях человеком является ребенок грудного возраста. В другом воплощении человеком является ребенок. В другом воплощении человеком является взрослый человек. В конкретном воплощении субъектом является взрослый человек, подверженный риску. В другом воплощении человеком является человек пожилого возраста. В другом воплощении человеком является ребенок грудного возраста, включая недоношенного ребенка грудного возраста и ребенка грудного возраста, рожденного в

срок. В другом воплощении человеком является ребенок ясельного возраста. Термины "субъект" и "пациент" в настоящем описании могут использоваться взаимозаменяемо.

В настоящем описании термин "недоношенный ребенок грудного возраста" относится к ребенку грудного возраста, появившемуся на свет менее чем на 37 неделе гестации.

В настоящем описании термин "ребенок грудного возраста" охватывает детей от новорожденного до годовалого возраста.

В настоящем описании термин "ребенок ясельного возраста" относится к людям в возрасте от 1 до 3 лет.

В настоящем описании термин "ребенок" относится к людям в возрасте от 1 до 18 лет.

В настоящем описании термин "взрослый" относится к людям в возрасте 18 лет или старше.

В настоящем описании термин "взрослый, подверженный риску" относится к людям в возрасте 18 лет или старше, которые более предрасположены к инфекции ЕхРЕС, по сравнению с популяцией взрослых людей в среднем. Примеры "взрослых, подверженных риску" включают без ограничения людей пожилого возраста, людей с ослабленным иммунитетом, беременных женщин, людей с диабетом или раневыми повреждениями, людей, у которых недавно было проведено или планируется проведение хирургического вмешательства и т.д.

В настоящем описании термин "человек пожилого возраста" относится к людям в возрасте 55, предпочтительно 60, более предпочтительно 65 лет или старше.

В настоящем описании "инвазивное заболевание ЕхРЕС" определяют, как выделение ЕхРЕС из участков организма, в норме являющихся стерильными, и их обнаружение у человека, имеющего острое заболевание, указывающее на бактериальную инфекцию.

В настоящем описании "иммунологический ответ" или "иммунный ответ" на антиген или композицию относится к развитию у субъекта гуморального и/или клеточного иммунного ответа против антигена или против антигена, присутствующего в композиции.

Неожиданно авторами изобретения было обнаружено, что антиген E. coli O25B, конъюгированный с белком-носителем ЕРА, является менее иммуногенным по сравнению с другими О-антигенами E. coli (например, O1A, O2 и O6A), конъюгированными с белком-носителем ЕРА. Данное открытие привело к дальнейшим исследованиям дозировок антигена E. coli O25B и соотношениям дозировок различных О-антигенов E. coli в составе мультивалентной вакцины и, таким образом, к разработке мультивалентных вакцин и способов иммунизации на основе О-антигенов E. coli для улучшения иммунных ответов против серотипа O25B и других серотипов ЕхРЕС.

Эпидемиология.

Исследования распределения серотипов E. coli, вызывающих заболевание ЕхРЕС, указывают, что согласно оценкам Ю преобладающих О-серотипов могут охватывать 60-80% инфекций ЕхРЕС с учетом охвата части нетипируемых штаммов. См., например, табл. 1А-1В ниже. В целевых популяциях с ИМП и бактериемией серотипы O1, O2, O6 и O25 идентифицированы как четыре наиболее широко распространенных серотипа E. coli, среди которых серотип O25 был самым широко распространенным серотипом E. coli при бактериемии. Также обнаружили, что в случае серотипа О-антигена, который включает различные, но при этом структурно и антигенно родственные подтипы, один подтип может быть более широко распространенным среди клинических изолятов по сравнению с другими. Например, установили, что антигены O1A, O6A и O25B являются наиболее распространенными подтипами среди проанализированных клинических штаммов или изолятов для серотипов O1, O6 и O25 соответственно. См. соответствующее описание эпидемиологических исследований в заявке на международный патент РСТ/ЕР 2015/053739, содержание которой включено во всей полноте посредством ссылки.

Таблица 1А

Распределение наиболее часто встречающихся ассоциированных с ИМП серотипов *E. coli* из коллекции, включающей 1841 образец мочи, собранных в Швейцарии в 2012
Показано распределение серотипов в образцах соответствующей субпопуляции, включающей 671 субъект, и распределение во всех ** образцах

Наиболее распространенные серотипы <i>E. coli</i> , ассоциированные с ИМП			
О-серотип	Внебольничные ИМП у 18-70 летних* (n=671)	О-серотип	Внебольничные и внутрибольничные ИМП у 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%

Таблица 1Б

Распространенность наиболее часто встречающихся серотипов, ассоциированных с ИМП, по данным публикаций за период 1987-2011 гг. и по данным ретроспективных исследований, проведенных в США за период 2000-2011 гг. (ECRC)

УСЛОВИЕ	Все ИМП	ЦИСТИТ	ПИЕЛОНЕФРИТ	США 2000-2010
	Данные, имеющиеся для 1860 изолятов	Данные, имеющиеся для 1089 изолятов	Данные, имеющиеся для 373 изолятов	315 (все образцы ИМП за исключением фекальных, М+Ж всех возрастов)*
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	НД	НД	НД	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/ нет данных	33,3%	39,2%	40,2%	
другие О-типы (нетипируемые -нет данных)				21,0%

*Число нетипируемых - нет данных

Таблица 1В

Распределение наиболее часто встречающихся О-серотипов *E. coli*, ассоциированных с бактериемией, из коллекции 860 изолятов из образцов крови, собранных в США и ЕС за период 2011-2013 гг.

Приведено относительное распределение О-серотипов в образцах

О-серотип	Бактериemia у субъектов ≥ 60 лет США/ЕС 2011-2013 (n=860)
25	19,2
2	8,8
6	8,3
1	7,8
75	3,3
4	2,8
16	2,7
18	2,7
15	2,3
8	2,0
153	1,6
73	1,6

Новый агглютинирующий клон O25, недавно появившийся среди изолятов *E. coli*, выделенных в нозокомиальной среде, обозначен O25B. Субтипирование О-серотипа O25 посредством ПЦР позволило установить, что в подавляющем большинстве случаев это был подтип O25B (при исследовании 24 клинических изолятов с фенотипом O25, дающих положительную реакцию агглютинации, 20 были отнесены к подтипу O25B, тогда как оставшиеся 4 были отнесены к подтипу O25A, а в популяции с бактериемией, исследованной позднее, 56 из 57 исследованных изолятов серотипа O25 были типированы как O25B). Подтвердили, что аутологичная антисыворотка распознает аутологичный антиген лучше, чем неаутологичный антиген, и таким образом, включение антигена O25B в вакцину может обеспечить лучшую защиту против преобладающих клинических штаммов O25B группы O25, чем включение антигена O25A (см., например, заявку на международный патент РСТ/ЕР 2015/053739). Результаты показали, что вакцина O25B может привести к получению сыворотки, перекрестно реагирующей с антигеном O25A, таким образом одновременно обеспечивая иммунный ответ против серотипа O25A (Id.). Композиции согласно воплощениям изобретения содержат антиген *E. coli* O25B, конъюгированный с белком-носителем ЕРА, и другие О-антигены *E. coli*, конъюгированные с белком-носителем ЕРА.

Композиции, содержащие конъюгаты О-антигена *E. coli*.

В одном общем аспекте изобретение относится к мультивалентной вакцине, содержащей О-антиген серотипов, преимущественно встречающихся среди клинических изолятов *E. coli*, которую можно применять для обеспечения активной иммунизации для предупреждения заболевания, вызываемого ExPEC,

имеющей О-антигены серотипов, содержащихся в вакцине. В одном воплощении изобретение относится к композиции, содержащей антиген *E. coli* O25B в первой концентрации от 8 до 48 мкг/мл и по меньшей мере один дополнительный О-антиген *E. coli* во второй концентрации, которая составляет от 10 до 100% от первой концентрации, где каждый из антигена *E. coli* O25B и по меньшей мере одного дополнительного О-антигена *E. coli* независимо ковалентно связан с белком-носителем ЕРА.

Предпочтительно по меньшей мере один дополнительный О-антиген *E. coli*, который применяют в композициях согласно воплощениям изобретения, является широкораспространенным среди клинических изолятов *E. coli*. Примеры таких дополнительных О-антигенов включают антигены *E. coli* O1, O2, O4, O6, O7, O8, O15, O16, O18, O21, O73, O75 и O153, но не ограничиваются ими. В зависимости от необходимости композиция может включать более чем один дополнительный О-антиген *E. coli*, например два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или девять дополнительных О-антигенов *E. coli* для обеспечения иммунной защиты против множества серотипов *E. coli* помимо серотипа *E. coli* O25B. В предпочтительном воплощении дополнительный О-антиген *E. coli* выбран из группы, состоящей из антигенов *E. coli* O1, O2 и O6. Более предпочтительно дополнительный О-антиген *E. coli* выбран из группы, состоящей из антигенов *E. coli* O1A, O2 и O6A.

В одном воплощении композиция по изобретению содержит антиген *E. coli* O25B в первой концентрации от 10 до 36 мкг/мл и антигены *E. coli* O1A, O2 и O6A, концентрация каждого из которых независимо составляет от 10 до 100% от первой концентрации, где каждый из антигена *E. coli* O25B и дополнительных О-антигенов *E. coli* независимо ковалентно связан с белком-носителем ЕРА. В предпочтительном воплощении каждый из антигенов *E. coli* O1A, O2 и O6A независимо присутствует в концентрации по меньшей мере 5 мкг/мл, более предпочтительно в концентрации по меньшей мере 8 мкг/мл.

Композиция согласно воплощению изобретения содержит антиген *E. coli* O25B в концентрации, которая является такой же или более высокой, чем концентрация любого из дополнительных О-антигенов в составе композиции. Например, композиция может иметь антиген *E. coli* O25B в первой концентрации, например, 10, 16, 24, 32 или 36 мкг/мл и один или более дополнительных О-антигенов *E. coli*, концентрация каждого из которых составляет, например, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% от первой концентрации. Когда композиция содержит более одного дополнительного О-антигена, все дополнительные О-антигены могут иметь одинаковую концентрацию, которая составляет от 10 до 100% от концентрации антигена *E. coli* O25B в композиции. Альтернативно, дополнительные О-антигены также могут иметь различные концентрации, каждая из которых независимо составляет 10-100% от концентрации антигена *E. coli* O25B. Предпочтительно композиция содержит 32 мкг/мл антигена *E. coli* O25B и независимо от 16 до 32 мкг/мл каждого из одного или более дополнительных О-антигенов, где каждый из антигена *E. coli* O25B и дополнительных О-антигенов *E. coli* независимо ковалентно связан с белком-носителем ЕРА. В другом предпочтительном воплощении композиция содержит 16 мкг/мл антигена *E. coli* O25B и независимо от 8 до 16 мкг/мл каждого из одного или более дополнительных О-антигенов, где каждый из антигена *E. coli* O25B и дополнительных О-антигенов *E. coli* независимо ковалентно связан с белком-носителем ЕРА.

В одном предпочтительном воплощении изобретение относится к композиции, содержащей антиген *E. coli* O25B в первой концентрации от 10 до 36 мкг/мл, и каждый из антигена *E. coli* O1A, антигена *E. coli* O2 и антигена *E. coli* O6A во второй концентрации, где каждый из антигенов *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A независимо ковалентно связан с белком-носителем ЕРА, и соотношение первой концентрации ко второй концентрации составляет от 1:1 до 2:1.

Предпочтительно композиция содержит антигены *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A в соотношении доз 1:1:1:1 или 2:1:1:1 и композиция содержит 32 мкг/мл антигена *E. coli* O25B, где каждый из О-антигенов ковалентно связан с белком-носителем ЕРА. В другом предпочтительном воплощении композиция содержит антигены *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A в соотношении доз 1:1:1:1 или 2:1:1:1 и композиция содержит 16 мкг/мл антигена-*E. coli* O25B, где каждый из О-антигенов ковалентно связан с белком-носителем ЕРА. Более предпочтительно каждый из антигенов *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A независимо ковалентно связан с белком-носителем, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и каждый конъюгат О-антигена и белка-носителя ЕРА получен в клетке, т.е. является биоконъюгатом. Более предпочтительно антигены *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A содержат, соответственно, структуры формулы O25B', формулы O1A', формулы O2' и формулы O6A', раскрытые ниже.

Раскрытые в настоящем описании композиции могут найти применение в лечении и предупреждении у субъектов (например, у людей) инфекции ЕхРЕС. В некоторых воплощениях раскрытая в настоящем описании композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель, помимо того, что она содержит О-антигены *E. coli*, ковалентно связанные с белком-носителем ЕРА. В настоящем описании термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный федеральными или региональными органами регулирования или включенный в фармакопею США или другую общепризнанную фармакопею для применения у животных, и, в частности, у людей. Термин "носитель", используемый в настоящем описании применительно к фармацевтически приемлемому носителю, обозначает разбавитель, адъювант, эксципиент или несущую среду, с которыми вводят фармацевтическую композицию. В качестве жидких носителей, в частности, для инъекционных растворов могут применяться солевые растворы, водные рас-

творы декстрозы и глицерина. Подходящие эксципиенты включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в издании "Remington's Pharmaceutical Sciences" под ред. E.W. Martin.

В конкретном воплощении предложена композиция, содержащая антиген *E. coli* O25B, ковалентно связанный с белком-носителем ЕРА, и один или более дополнительных О-антигенов *E. coli*, каждый из которых ковалентно связан с белком-носителем ЕРА. В другом конкретном воплощении предложена композиция, которая содержит: (i) биоконъюгат, содержащий антиген *E. coli* O25B, ковалентно связанный с белком-носителем ЕРА, и (ii) биоконъюгат, содержащий антиген *E. coli* O1A, ковалентно связанный с белком-носителем ЕРА.

В другом конкретном воплощении предложена композиция, которая содержит: (i) биоконъюгат, содержащий антиген *E. coli* O25B, ковалентно связанный с белком-носителем ЕРА, и (ii) биоконъюгат, содержащий антиген *E. coli* O2, ковалентно связанный с белком-носителем ЕРА.

В другом конкретном воплощении предложена композиция, которая содержит: (i) биоконъюгат, содержащий антиген *E. coli* O25B, ковалентно связанный с белком-носителем ЕРА, и (ii) биоконъюгат, содержащий антиген *E. coli* O6A, ковалентно связанный с белком-носителем ЕРА.

В другом конкретном воплощении предложена композиция, которая содержит биоконъюгат, содержащий антиген *E. coli* O25B, ковалентно связанный с белком-носителем ЕРА, и два или более биоконъюгатов, выбранных из группы, состоящей из (i) биоконъюгата, содержащего антиген *E. coli* O1A, ковалентно связанный с белком-носителем ЕРА; (ii) биоконъюгата, содержащего антиген *E. coli* O2, ковалентно связанный с белком-носителем ЕРА, и (iii) биоконъюгата, содержащего антиген *E. coli* O6A, ковалентно связанный с белком-носителем ЕРА.

В другом конкретном воплощении предложена композиция, которая содержит: (i) биоконъюгат *E. coli* O25B, содержащий антиген *E. coli* O25B, ковалентно связанный с белком-носителем ЕРА; (ii) биоконъюгат *E. coli* O1A, содержащий антиген *E. coli* O1A, ковалентно связанный с белком-носителем ЕРА; (iii) биоконъюгат *E. coli* O2, содержащий антиген *E. coli* O2, ковалентно связанный с белком-носителем ЕРА, и (iv) биоконъюгат *E. coli* O6A, содержащий антиген *E. coli* O6A, ковалентно связанный с белком-носителем ЕРА, где (i), (ii), (iii), и (iv) составлены в виде единой композиции.

В другом конкретном воплощении предложена композиция, которая содержит: (i) биоконъюгат *E. coli* O25B, содержащий антиген *E. coli* O25B, ковалентно связанный с белком-носителем ЕРА; (ii) биоконъюгат *E. coli* O1A, содержащий антиген *E. coli* O1A, ковалентно связанный с белком-носителем ЕРА; (iii) биоконъюгат *E. coli* O2, содержащий антиген *E. coli* O2, ковалентно связанный с белком-носителем ЕРА, и (iv) биоконъюгат *E. coli* O6A, содержащий антиген *E. coli* O6A, ковалентно связанный с белком-носителем ЕРА, где (i), (ii), (iii), и (iv) составлены в виде отдельных композиций, которые вводят в комбинации в соответствии со способом согласно воплощению изобретения. В некоторых воплощениях раскрыты ниже композиции, возможно содержащий белок-носитель ЕРА, ковалентно связанный с О-антигеном *E. coli*, отличным от *E. coli* O1A, O2, O6A и O25B. Другие О-антигены *E. coli* O включают, но не ограничиваются ими, дополнительные О-антигены, представленные в табл. 1A-1B выше. Предложенные композиции могут использоваться для индуцирования иммунного ответа у хозяина, которому вводят композицию, т.е. являются иммуногенными. Таким образом, раскрытые здесь композиции могут применяться в качестве вакцин против инфекции ЕхРЕС и могут содержать любые дополнительные компоненты, подходящие для применения в вакцине. В конкретном воплощении композиции, раскрытые в настоящем описании, являются мультивалентными композициями, например по меньшей мере четырехвалентными композициями, содержащими биоконъюгаты О-антигенов *E. coli* серотипов/подсеротипов O25B, O1A, O6A и O2.

В некоторых воплощениях раскрытые композиции дополнительно содержат консервант, такой как производное ртути, представляющее собой тимеросал. В конкретном воплощении фармацевтические композиции, раскрытые в настоящем описании, содержат от 0,001 до 0,01% тимеросала. В других воплощениях фармацевтические композиции, раскрытые в настоящем описании, не содержат консервант.

В некоторых воплощениях композиции, раскрытые в настоящем описании (например, иммуногенные композиции), содержат адъювант или вводятся в комбинации с адъювантом. Адъювант для введения в комбинации с композицией, раскрытой в настоящем описании, может вводиться до, одновременно или после введения указанной композиции. В некоторых воплощениях термин "адъювант" относится к соединению, которое при введении в сочетании или в составе композиции, раскрытой в настоящем описании, усиливает и/или повышает иммунный ответ на биоконъюгат, однако когда вводят только соединение адъювант, иммунный ответ на биоконъюгат не вырабатывается. В некоторых воплощениях адъювант вызывает иммунный ответ на поливалентный биоконъюгат пептида и не вызывает аллергии или иной нежелательной реакции. Усиление иммунного ответа адъювантами может быть опосредовано несколькими механизмами, включая, например, рекрутинг лимфоцитов, стимулирование В и/или Т клеток или стимулирование макрофагов. В некоторых предпочтительных воплощениях композиции, раскрытые в настоящем описании, не содержат адъювант помимо биоконъюгатов и/или не вводятся в комбинации с

адьювантами помимо биоконъюгатов (в случае, если биоконъюгаты будут обладать некоторыми присущими им адьювантными свойствами, их не будут учитывать и в этих воплощениях внешний адьювант добавлять не будут). Конкретные примеры адьювантов включают соли алюминия (такие как гидроксид алюминия, фосфат алюминия и сульфат алюминия), 3-де-О-ацетилованный монофосфорил липид А (MPL) (см. патент Великобритании GB 2220211), MF59 (Novartis), AS03 (GlaxoSmithKline), AS04 (GlaxoSmithKline), полисорбат 80 (Tween 80; ICL Americas, Inc.), имидазопиридиновые соединения (см. международную заявку PCT/US 2007/064857, опубликованную как международная публикация WO 2007/109812), имидазохиноксалиновые соединения (см. международную заявку PCT/US 2007/064858, опубликованную как международная публикация WO 2007/109813) 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), но не ограничиваются ими. В некоторых воплощениях адьювант представляет собой адьювант Фрейнда (полный или неполный). Другие адьюванты представляют собой эмульсии масло-в-воде (такие как сквален или арахисовое масло), возможно в комбинации с иммуностимуляторами, такими как монофосфорил липид А (см. Stoute et al., 1997, N. Engl. J. Med. 336, 86-91). Другим адьювантом является CpG (Bioworld Today, Nov. 15, 1998).

В некоторых воплощениях композиции, раскрытые в настоящем описании, составлены так, чтобы быть подходящими для предполагаемого способа введения субъекту. Например, композиции, раскрытые в настоящем описании, могут быть составлены, чтобы подходить для подкожного, парентерального, перорального, внутрикожного, чрескожного, колоректального, внутрибрюшинного и ректального введения. В конкретном воплощении фармацевтическая композиция может быть составлена для внутривенного, перорального, внутрибрюшинного, интраназального, интратрахеального, подкожного, внутримышечного, поверхностного, внутрикожного, чрескожного или легочного введения. В некоторых воплощениях композиции, раскрытые в настоящем описании, вводят посредством внутримышечной инъекции. В некоторых воплощениях раскрытые композиции дополнительно содержат один или более буферов, например Трис-буфер, фосфатный буфер и сахарозо-фосфатно-глутаматный буфер.

В некоторых воплощениях композиции, раскрытые в настоящем описании, дополнительно содержат одну или более солей, например Трис-гидрохлорид, хлорид натрия, хлорид кальция, хлорид калия, фосфат натрия, глутамат натрия и соли алюминия (например, гидроксид алюминия, фосфат алюминия, сульфат алюминия-калия или смеси указанных солей алюминия). В одном воплощении композиция по изобретению содержит биоконъюгаты, раскрытые в настоящем описании в Трис-буферном солевом растворе (TBS) pH 7,4 (например, содержащие Трис, NaCl и KCl, например, 25 mM, 137 mM и 2,7 mM соответственно).

Раскрытые в настоящем описании композиции могут находиться в контейнере, упаковке или диспенсере вместе с инструкциями по применению.

Композиции, раскрытые в настоящем описании, можно хранить перед применением, например композиции можно хранить в замороженном состоянии (например, при температуре приблизительно -20°C или приблизительно -70°C); хранить в прохладных условиях (например, приблизительно при 4°C) или хранить при комнатной температуре.

Способы/применения.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу индуцирования иммунного ответа против ExPEC у субъекта, нуждающегося в этом. Предпочтительно иммунный ответ является эффективным для предупреждения или лечения заболевания, связанного с ExPEC у субъекта, нуждающегося в этом. Способ включает введение субъекту антигена *E. coli* O25B в первом эффективном количестве от 4 до 24 мкг на введение и по меньшей мере одного дополнительного О-антигена *E. coli* во втором эффективном количестве, которое составляет от 10 до 100% от первого эффективного количества, где каждый из антигена *E. coli* O25B и по меньшей мере одного дополнительного О-антигена *E. coli* независимо ковалентно связан с белком-носителем ERA, и композиция эффективна для индуцирования у субъекта, нуждающегося в этом, иммунного ответа против антигена *E. coli* O25B и по меньшей мере одного дополнительного О-антигена *E. coli*.

Предпочтительно по меньшей мере один дополнительный О-антиген *E. coli*, который используют в способах и применениях по изобретению, является широко распространенным среди клинических изолятов *E. coli*. Примеры таких дополнительных О-антигенов включают антигены *E. coli* O1, O2, O4, O6, O7, O8, O15, O16, O18, O21, O73, O75 и O153, но не ограничиваются ими. В зависимости от необходимости для обеспечения иммунной защиты против множества серотипов *E. coli* в дополнение к серотипу *E. coli* O25B можно вводить более чем один дополнительный О-антиген *E. coli*, например два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или девять дополнительных О-антигенов *E. coli*.

В предпочтительном воплощении способ по изобретению индуцирует иммунный ответ у субъекта, нуждающегося в этом, против ExPEC серотипа O25, а один или более дополнительных О-антигенов *E. coli* выбраны из группы, состоящей из антигенов *E. coli* O1, O2 и O6. Предпочтительно способ по изобретению индуцирует иммунный ответ у субъекта, нуждающегося в этом, против ExPEC серотипа O25B, и один или более дополнительных О-антигенов *E. coli* выбраны из группы, состоящей из антигенов *E. coli* O1A, O2 и O6A. Способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, антигена *E. coli* O25B в

первом эффективном количестве от 5 до 18 мкг на введение и антигены *E. coli* O1A, O2 и O6A, концентрация каждого из которых независимо составляет от 10 до 100% от первого эффективного количества, где каждый из антигена *E. coli* O25B и дополнительных О-антигенов *E. coli* независимо ковалентно связаны с белком-носителем ЕРА. В предпочтительном воплощении каждый из антигенов *E. coli* O1A, O2 и O6A независимо вводят во втором эффективном количестве по меньшей мере 3 мкг на введение, более предпочтительно во втором эффективном количестве по меньшей мере 4 мкг на введение.

В способе согласно воплощению изобретения вводимое эффективное количество антигена *E. coli* O25B является таким же или более высоким, чем вводимое эффективное количество любого из дополнительных О-антигенов. Например, антиген *E. coli* O25B можно вводить в первом эффективном количестве от 4 до 24 мкг на введение и по меньшей мере один дополнительный О-антиген *E. coli* можно вводить во втором эффективном количестве, которое составляет, например, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% от первого эффективного количества. Когда в комбинации вводят более чем один дополнительный О-антиген, все дополнительные О-антигены можно вводить в одинаковом эффективном количестве, которое составляет от 10 до 100% от первого эффективного количества антигена *E. coli* O25B. Дополнительные О-антигены также можно вводить в различных эффективных количествах, каждое из которых независимо составляет 10-100% от первого эффективного количества антигена *E. coli* O25B. Предпочтительно антиген *E. coli* O25B вводят в первом эффективном количестве от 5 до 18 мкг, и по меньшей мере один дополнительный О-антиген вводят во втором эффективном количестве, которое независимо составляет от 50 до 100% от первого эффективного количества.

В одном воплощении изобретения способ индуцирования иммунного ответа против ЕхРЕС у субъекта, нуждающегося в этом, включает введение субъекту антигена *E. coli* O25B в первом эффективном количестве, составляющем, например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 мкг на введение, и каждый из антигенов *E. coli* O1A, O2 и O6A в эффективном количестве, которое независимо составляет, например, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% от первого эффективного количества, где каждый из антигена *E. coli* O25B и дополнительных О-антигенов *E. coli* независимо ковалентно связаны с белком-носителем ЕРА.

В одном предпочтительном воплощении изобретение относится к способу индуцирования иммунного ответа против ЕхРЕС у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту антигена *E. coli* O25B в первом эффективном количестве от 5 до 18 мкг на введение, и каждого из антигена *E. coli* O1A, антигена *E. coli* O2 и антигена *E. coli* O6A во втором эффективном количестве, где каждый из антигенов *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A независимо ковалентно связан с белком-носителем ЕРА и соотношение первого эффективного количества ко второму эффективному количеству составляет от 1:1 до 2:1. Предпочтительно антигены *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A вводят субъекту в дозовом соотношении 1:1:1:1 или 2:1:1:1 и антиген *E. coli* O25B вводят в количестве 5 мкг, 8 мкг или 16 мкг на введение. Также предпочтительно антигены *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A вводят субъекту в одной композиции.

Предложены способы и применения композиций по изобретению для индуцирования иммунного ответа против ЕхРЕС у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту антигена *E. coli* O25B, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА, и по меньшей мере одного или более дополнительных О-антигенов *E. coli*, ковалентно связанных с белком-носителем ЕРА. В конкретном воплощении раскрытые в настоящем описании композиции также применяют для вакцинации людей для обеспечения защитного иммунитета против инфекции ЕхРЕС у людей. Также предложены способы, индуцирующие образование опсонофагоцитарных антител против ЕхРЕС у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту антигена *E. coli* O25B, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА, и по меньшей мере одного дополнительного О-антигена *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА. В одном воплощении указанный субъект имеет инфекцию ЕхРЕС во время введения. В другом воплощении указанный субъект не имеет инфекцию ЕхРЕС во время введения. Примеры инфекций, вызванных ЕхРЕС, включают инфекции мочевыводящих путей, инфекции области операционного вмешательства, бактериемию, инфекции брюшной полости или таза, пневмонию, нозокомиальную пневмонию, остеомиелит, паникулит, раневые инфекции, менингит, неонатальный менингит, перитонит, холангит, инфекции мягких тканей, пиомиозит, септический артрит и сепсис, но не ограничиваются ими. Предпочтительно инфекции, вызванные ЕхРЕС, представляют собой инвазивное заболевание ЕхРЕС, вызванное ЕхРЕС серотипов, антигены которых включены в композиции или способы согласно воплощениям изобретения.

Результатом способов индуцирования иммунного ответа у субъекта, раскрытых в настоящем описании, является вакцинация субъекта против инфекции, вызванной штаммами ЕхРЕС, антигены которых присутствуют в композиции(ях). Когда используют подтип О-антигена, способ по изобретению также может индуцировать иммунный ответ против другого подтипа О-антигена, обладающего схожими антигенными свойствами. В конкретном воплощении иммунный ответ, индуцированный способом или композицией, раскрытыми в настоящем описании, является эффективным для предупреждения и/или лечения инфекции, вызванной *E. coli* серотипа O25. В конкретном воплощении указанный серотип O25 представляет собой O25B. В другом конкретном воплощении указанный серотип O25 представляет собой O25A.

В конкретном воплощении иммунный ответ, индуцированный способом или композицией, раскрытыми в настоящем описании, является эффективным для предупреждения и/или лечения инфекции, вызванной *E. coli* серотипа O25, например серотипа O25B, и серотипа O1, например серотипа O1A.

В конкретном воплощении иммунный ответ, индуцированный способом или композицией, раскрытыми в настоящем описании, является эффективным для предупреждения и/или лечения инфекции, вызванной *E. coli* серотипа O25, например серотипа O25B, и серотипа O2.

В конкретном воплощении иммунный ответ, индуцированный способом или композицией, раскрытыми в настоящем описании, является эффективным для предупреждения и/или лечения инфекции, вызванной *E. coli* серотипа O25, например серотипа O25B, и серотипа O6, например серотипа O6A.

В конкретном воплощении иммунный ответ, индуцированный способом или композицией, раскрытыми в настоящем описании, является эффективным для предупреждения и/или лечения инфекции, вызванной *E. coli* серотипа O25 (например, O25B и/или O25A), и двумя или более следующими серотипами *E. coli*: O1 (например, O1A, O1B и/или O1C), O2 и/или O6 (например, O6A и/или O6GlcNAc). В конкретном воплощении иммунный ответ, индуцированный способом или композицией, раскрытыми в настоящем описании, является эффективным для предупреждения и/или лечения инфекции, вызванной каждым из следующих серотипов *E. coli*: O25 (например, O25B и/или O25A), O1 (например, O1A, O1B и/или O1C), O2 и O6 (например, O6A и/или O6GlcNAc).

В конкретном воплощении иммунный ответ, индуцированный способом или композицией, раскрытыми в настоящем описании, является эффективным для предупреждения и/или лечения инфекции, вызванной *E. coli* серотипа O25, например серотипа O25B, и серотипа *E. coli*, отличного от O1, O2, O6 или O25, включая, без ограничений, дополнительные О-серотипы, приведенные в табл. 1А-1В. Для иммунизации субъекта против инфекции ExPEC субъекту можно вводить единственную композицию, раскрытую в настоящем описании, где указанная композиция содержит антиген *E. coli* O25B и один, два, три, четыре или более дополнительных О-антигенов *E. coli*, раскрытых в настоящем описании, каждый из которых ковалентно связан с белком-носителем ЕРА. Альтернативно, для лечения субъекта, имеющего инфекцию ExPEC, или для иммунизации субъекта против инфекции ExPEC множество композиций, раскрытых в настоящем описании, можно вводить субъекту в комбинации. Например, субъекту можно вводить композицию, содержащую антиген *E. coli* O25B, конъюгированный с белком-носителем ЕРА, в комбинации с введением двух, трех, четырех или более композиций, содержащих дополнительные О-антигенные конъюгаты согласно воплощениям изобретения.

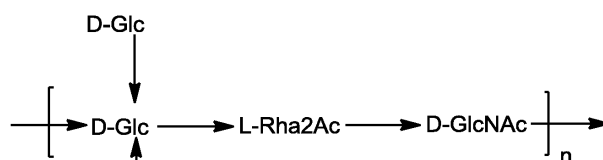
В некоторых воплощениях иммунный ответ, индуцированный у субъекта после введения композиции, раскрытой в настоящем описании, эффективен для предупреждения или уменьшения симптомов, возникающих в результате инфекции ExPEC, предпочтительно по меньшей мере у 30%, более предпочтительно по меньшей мере у 40%, например по меньшей мере у 50% субъектов, которым ввели композицию. Симптомы инфекции ExPEC могут варьировать в зависимости от природы инфекции и могут включать, без ограничения, дизурию, учащенное мочеиспускание или urgency, пиурию, гематурию, боль в спине, боль в области таза, боль при мочеиспускании, лихорадку, озноб и/или тошноту (например, у субъектов, имеющих инфекции мочевыводящих путей, вызванные ExPEC); сильный жар, головную боль, ригидность затылочных мышц, тошноту, рвоту, судороги, сонливость и/или светобоязнь (например, у субъектов, имеющих менингит, вызванный ExPEC); лихорадку, усиленное сердцебиение, учащенное дыхание, пониженный диурез, пониженное количество тромбоцитов, боли в области живота, затрудненное дыхание и/или аномалии сердечной деятельности (например, у субъектов, имеющих сепсис, вызванный ExPEC).

В некоторых воплощениях иммунный ответ, индуцированный у субъекта после введения композиции, раскрытой в настоящем описании, эффективен для снижения вероятности госпитализации субъекта, страдающего инфекцией ExPEC. В некоторых воплощениях иммунный ответ, индуцированный у субъекта после введения композиции, раскрытой в настоящем описании, эффективен для снижения продолжительности госпитализации субъекта, страдающего инфекцией ExPEC.

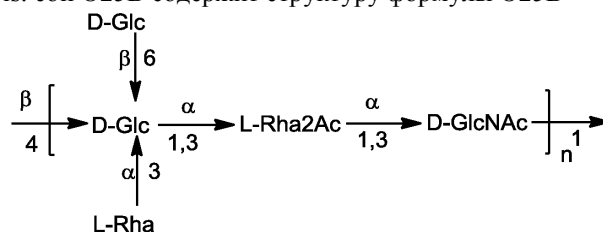
О-антигены *E. coli*.

Воплощения изобретения относятся к композициям и способам, относящимся к антигену *E. coli* O25B и одному или более дополнительным О-антигенам *E. coli*. Предпочтительно дополнительный О-антиген является широкораспространенным среди клинических изолятов *E. coli*. Примеры антигенов *E. coli*, которые могут применяться в изобретении, включают антигены *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A, но не ограничиваются ими.

В настоящем описании "антиген *E. coli* O25B" относится к О-антигену, специфическому для серотипа *E. coli* O25B. В одном воплощении антиген *E. coli* O25B содержит структуру формулы O25B



предпочтительно антиген is. coli O25B содержит структуру формулы O25B'

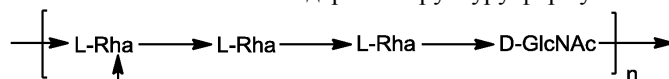


где n в формуле O25B или формуле O25B' является целым числом от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20. В одном воплощении изобретения n в формуле O25B или в формуле O25B' является целым числом от 1 до 20. Предпочтительно популяцию антигенов E. coli O25B, имеющих структуру формулы O25B, более предпочтительно формулы O25B', используют в композициях и способах согласно воплощениям изобретения, где n по меньшей мере у 80% антигенов E. coli O25B в популяции является целым числом 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 одном воплощении изобретения n по меньшей мере у 80% антигенов E. coli O25B в популяции является целым числом от 10 до 20.

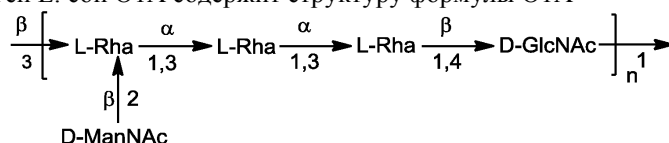
В настоящем описании "антиген E. coli O1" относится к О-антигену, специфическому для серотипа E. coli O1. В одном воплощении антиген E. coli O1 представляет собой антиген E. coli O1A.

В настоящем описании "антиген E. coli O1A" относится к О-антигену, специфическому для серотипа E. coli O1A.

В одном воплощении антиген E. coli O1A содержит структуру формулы O1A

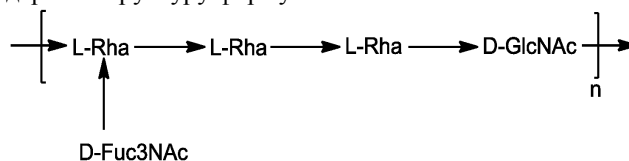


предпочтительно антиген E. coli O1A содержит структуру формулы O1A'

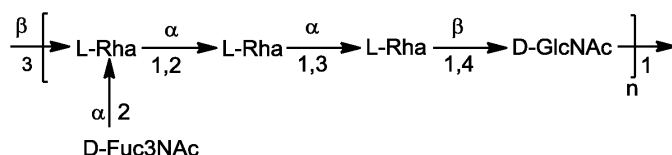


где n в формуле O1A или формуле O1A' является целым числом от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20. В одном воплощении n в формуле O1A или формуле O1A' является целым числом от 7 до 15.

Предпочтительно популяцию антигенов E. coli O1A, имеющих структуру формулы O1A, более предпочтительно формулы O1A' применяют в композициях и способах согласно воплощениям изобретения, где n по меньшей мере у 80% антигенов E. coli O1A в популяции имеет значения 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 одном воплощении изобретения n по меньшей мере у 80% антигенов E. coli O1A в популяции является целым числом от 5 до 15. В настоящем описании "антиген E. coli O2" относится к О-антигену, специфическому для серотипа E. coli O2. В одном воплощении антиген E. coli O2 содержит структуру формулы O2



предпочтительно антиген is. coli O2 содержит структуру формулы O2'

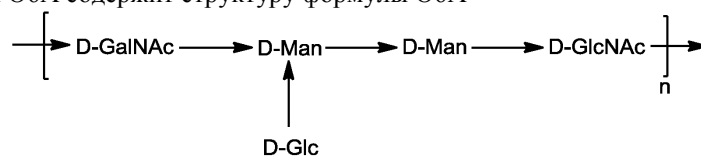


где n в формуле O2 или формуле O2' является целым числом от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20. В одном воплощении n в формуле O2 или формуле O2' является целым числом от 8 до 16.

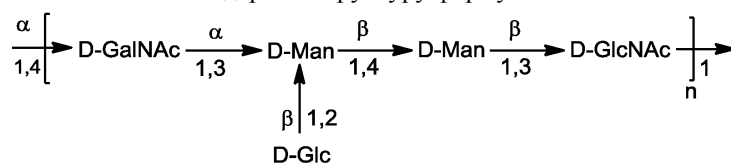
Предпочтительно популяцию антигенов *E. coli* O2, имеющих структуру формулы O2, более предпочтительно формулы O2' применяют в композициях и способах согласно воплощениям изобретения, где n по меньшей мере у 80% антигенов *E. coli* O2 в популяции имеет значения от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 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 одном воплощении n по меньшей мере у 80% антигенов *E. coli* O2 в популяции является целым числом от 5 до 20.

В настоящем описании "антиген *E. coli* O6" относится к O-антигену, специфическому для серотипа *E. coli* O6. В одном воплощении антиген *E. coli* O6 представляет собой антиген *E. coli* O6A.

В настоящем описании "антиген *E. coli* O6A", также обозначаемый "антиген *E. coli* O6K2" или "антиген *E. coli* O6Glc" относится к O-антигену, специфическому для серотипа *E. coli* O6A. В одном воплощении антиген *E. coli* O6A содержит структуру формулы O6A



предпочтительно антиген *E. coli* O6A содержит структуру формулы O6A'



где связь β 1, 2 также обозначается связью β 2, n в формуле O6A или формуле O6A' является целым числом 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 одном воплощении n в формуле O6A или формуле O6A' является целым числом от 8 до 18.

Предпочтительно популяцию антигенов *E. coli* O6A, имеющих структуру формулы O6A, более предпочтительно формулы O6A', применяют в композициях и способах согласно воплощениям изобретения, где n по меньшей мере у 80% антигенов *E. coli* O6A в популяции имеет значения 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 одном воплощении n по меньшей мере у 80% антигенов *E. coli* O6A в популяции является целым числом от 5 до 20. В предпочтительном воплощении композиция по изобретению содержит антигены *E. coli* O25B, имеющие структуру формулы O25B', где n по меньшей мере у 80% антигенов *E. coli* O25B в популяции является целым числом от 10 до 20; антигены *E. coli* O1A, имеющие структуру формулы O1A', где n по меньшей мере у 80% антигенов *E. coli* O1A в популяции является целым числом от 5 до 15; антигены *E. coli* O2, имеющие структуру формулы O2', где n по меньшей мере у 80% антигенов *E. coli* O2 в популяции является целым числом от 5 до 20; и антигены *E. coli* O6A, имеющие структуру формулы O6A', где n по меньшей мере у 80% антигенов *E. coli* O6A в популяции является целым числом от 5 до 20, где каждый из O-антигенов ковалентно связан с белком-носителем EPA, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

O-антиген *E. coli*, который может найти применение в изобретении, можно получать способами, известными в области техники с учетом настоящего описания. Например, они могут быть получены из клетки, предпочтительно рекомбинантной клетки, которая оптимизирована для биосинтеза O-антигена. См., например, соответствующие описания нуклеиновых кислот, белков, клеточных хозяев, способов получения и т.д. для биосинтеза O-антигена *E. coli*, изложенные в WO 2006/119987, WO 2009/104074, заявке на международный патент PCT/EP 2015/053739, Ihssen et al., 2010, Microbial Cell Factories 9, 61, содержание которых включено в настоящее описание во всей полноте посредством ссылки.

Белок-носитель EPA.

Согласно воплощениям изобретения каждый O-антиген *E. coli* ковалентно связан с белком-носителем EPA (см., например, Ihssen et al., 2010, Microbial Cell Factories 9, 61). В литературе описаны различные обезвреженные варианты EPA, и они могут применяться в качестве белков носителей EPA в раскрытых здесь конъюгатах. В некоторых воплощениях белки-носители EPA, используемые в конъюга-

тах, раскрытых в настоящем описании, модифицированы таким образом, что белок является менее токсичным и/или более подверженным гликозилированию. Например, обезвреживание может достигаться за счет мутации и делеции важных для каталитической активности остатков, таких как L552V и AE553, согласно Lukac et al., *Infect Immun*, 56: 3095-3098, 1988 и Ho et al., *Hum Vaccin*, 2:89-98, 2006. В конкретном воплощении белки-носители, использованные для создания конъюгатов, раскрытых в настоящем описании, модифицированы таким образом, что ряд сайтов гликозилирования в белках носителях оптимизирован таким образом, что позволяет вводить белки в более низких концентрациях, например, в иммуногенной композиции, в форме его биоконъюгата.

В некоторых воплощениях белки-носители ЕРА представляют собой модифицированные ЕРА, включающие на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более сайтов гликозилирования, больше, чем обычно связано с белком-носителем (например, по сравнению с количеством сайтов гликозилирования, связанных с белком-носителем в его нативной/естественной форме, например, "дикого типа"). В конкретных воплощениях внедрение сайтов гликозилирования осуществляют путем встраивания консенсусных последовательностей гликозилирования (например, Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой, за исключением Pro (SEQ ID NO: 2); или предпочтительно Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой аминокислоты, за исключением Pro (SEQ ID NO: 3) (см. WO 2006/119987)) в любом участке первичной структуры белка ЕРА. В одном конкретном воплощении белок-носитель ЕРА содержит 4 консенсусных последовательности гликозилирования Asp/Glu-X-Asn-Z-Ser/Thr (SEQ ID NO: 3) и имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1. В некоторых воплощениях белок-носитель ЕРА может быть получен вместе с сигнальной последовательностью (такой как сигнальный пептид *E. coli* DsbA, порин А внешней мембраны *E. coli* (OmpA), связывающий мальтозу белок *E. coli* (MalE), и т.д.), направляющей белок-носитель в периплазматическое пространство клетки-хозяина, экспрессирующей белок-носитель. Кроме того, белок-носитель ЕРА может быть модифицирован, чтобы нести "метку", т.е. последовательность аминокислот, позволяющую выделять и/или детектировать белок-носитель.

Белок-носитель ЕРА, который может найти применение в изобретении, можно получать способами, известными в области техники с учетом настоящего описания. См., например, соответствующие документы, например Ihssen et al., 2010, *Microbial Cell Factories* 9, 61, а также WO 2006/119987, WO 2009/104074, заявку на международный патент PCT/EP 2015/053739, содержание которых включено во всей полноте посредством ссылки.

Конъюгаты.

В некоторых воплощениях клетка-хозяин может продуцировать О-антиген *E. coli* и белок-носитель ЕРА и ковалентно связывать О-антиген с белком-носителем ЕРА с образованием биоконъюгата, который может использоваться в изобретении. См., например, соответствующие документы, например Ihssen et al., 2010, *Microbial Cell Factories* 9, 61, а также WO 2006/119987, WO 2009/104074, заявку на международный патент PCT/EP 2015/053739, содержание которых включено во всей полноте посредством ссылки.

Альтернативно, гликоконъюгаты могут быть получены путем химического синтеза, т.е. получены вне клеток-хозяев (*in vitro*). Например, О-антигены *E. coli*, раскрытые в настоящем описании, например антиген O25B, может быть конъюгирован с белками-носителями, с использованием способов, известных специалистам в области техники, включая способы с использованием активации реакционноспособных групп полисахарида/олигосахарида, а также белка-носителя. См., например, Pawlowski et al., 2000, *Vaccine* 18:1873-1885; и Robbins et al., 2009, *Proc Natl Acad Sci USA* 106:7974-7978, содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки. Такие подходы включают экстрагирование антигенных полисахаридов/олигосахаридов из клеток-хозяев, очистку полисахаридов/олигосахаридов, химическую активацию полисахаридов/олигосахаридов и конъюгирование полисахаридов/олигосахаридов с белком-носителем.

Биоконъюгаты обладают преимуществами по сравнению с гликоконъюгатами, полученными *in vitro*, например, при изготовлении биоконъюгатов требуются меньше химических агентов, а конечный продукт, получаемый из биоконъюгатов, является более устойчивым и гомогенным. Таким образом, биоконъюгаты являются предпочтительными по сравнению с гликоконъюгатами, полученными химическим путем. В конкретном воплощении белок-носитель ЕРА является N-связанным с О-антигеном *E. coli*, который может использоваться в изобретении. Например, О-антиген *E. coli* присоединен к остатку Asn в последовательности гликозилирования белка-носителя, такого как Asn-X-Ser(Thr), где X может представлять собой любую аминокислоту за исключением Pro (SEQ ID NO: 2), предпочтительно Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой аминокислоты естественного происхождения, за исключением Pro (SEQ ID NO: 3).

Раскрытые в настоящем описании конъюгаты могут быть очищены любым способом очистки белка, известным в области техники, например посредством хроматографии (например, ионообменной, анионообменной, аффинной и колоночной хроматографии с разделением по размерам), центрифугирования, по различиям в растворимости или любым другим стандартным способом очистки белков. См., например, Saraswat et al., 2013, *Biomed. Res. Int.* ID#312709 (с. 1-18); см. также способы, раскрытые в WO 2009/104074. Фактические условия, используемые для очистки конкретного конъюгата, будут в оп-

ределенной мере зависеть от стратегии синтеза (например, получения синтетическим путем или рекомбинантным способом) и от таких факторов, как суммарный заряд, гидрофобность и/или гидрофильность биоконъюгата, и будут очевидны для специалиста в области техники.

Комбинированная терапия.

В некоторых воплощениях композицию, раскрытую в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с одним или более чем одним другим препаратом (например, антибактериальными или иммуномодулирующими препаратами). Один или более чем один другой препарат может быть эффективным в лечении или предупреждении инфекции ЕхРЕС или может улучшать симптомы или состояния, связанные с инфекцией ЕхРЕС. В некоторых воплощениях один или более чем один другой препарат является обезболивающим или жаропонижающим препаратом. В некоторых воплощениях препараты вводят с интервалом от менее чем 5 мин до менее чем 1 неделя. В комбинации с композицией, раскрытой в настоящем описании, могут применяться любые антибактериальные агенты, известные специалистам в области техники (например, антибиотики).

Популяции пациентов.

В некоторых воплощениях композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, вводят (или применяют) "наивному" субъекту, т.е. субъекту, не имеющему инфекции ЕхРЕС или ранее не имевшему инфекции ЕхРЕС. В одном воплощении композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, вводят (или применяют) "наивному" субъекту, который подвержен риску развития инфекции ЕхРЕС. В некоторых воплощениях композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, вводят (или применяют) субъекту, у которого диагностирована или ранее была диагностирована инфекция ЕхРЕС. В некоторых воплощениях композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, вводят (или применяют) субъекту, инфицированному ЕхРЕС, до проявления симптомов или до того, как симптомы станут тяжелыми (например, до того, как пациенту потребуется госпитализация).

В некоторых воплощениях композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, вводят (или применяют) субъекту, у которого диагностирована или ранее была диагностирована уropатогенная инфекция *E. coli* (UPEC). В некоторых воплощениях композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, вводят (или применяют) субъекту, страдающему рецидивирующими инфекциями мочевыводящих путей. В некоторых воплощениях композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, вводят (или применяют) субъекту, страдающему рецидивирующими инфекциями мочевыводящих путей, но являющемуся здоровым на момент лечения. В некоторых воплощениях композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, вводят (или применяют) субъекту, имеющему или подверженному риску развития бактериемии или сепсиса.

В некоторых воплощениях субъект, которому вводят (или применяют) композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, является животным. В некоторых воплощениях животное является собакой. В некоторых воплощениях животное является кошкой. В некоторых воплощениях животное является лошастью. В некоторых воплощениях животное является коровой. В некоторых воплощениях животное является млекопитающим, например лошастью, свиньей, кроликом, мышью или приматом. В предпочтительном воплощении субъект является человеком.

В некоторых воплощениях субъект, которому вводят (или применяют) композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, является человеком, предпочтительно человеком, подверженным риску возникновения инвазивного заболевания ЕхРЕС. В некоторых воплощениях субъект, которому вводят (или применяют) композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, является человеком старше 50 лет. В некоторых воплощениях субъект, которому вводят (или применяют) композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, является человеком старше 55 лет, старше 60 или старше 65 лет.

В некоторых воплощениях субъект, которому вводят (или применяют) композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, является ребенком. В некоторых воплощениях субъект, которому вводят (или применяют) композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, является ребенком. В некоторых воплощениях субъект, которому вводят (или применяют) композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, является ребенком грудного возраста, включая недоношенного ребенка грудного возраста. В некоторых воплощениях субъект, которому вводят (или применяют) композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, является ребенком ясельного возраста. В некоторых воплощениях субъект, которому вводят (или применяют) композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, не является ребенком грудного возраста младше 6 месяцев.

В некоторых воплощениях субъект, которому вводят (или применяют) композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, является беременным индивидуумом. В некоторых воплощениях субъект, которому вводят (или применяют) композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, является женщиной, у которой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель назад состоялись роды.

В некоторых воплощениях субъект, которому вводят (или применяют) композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, является индивидуумом с повышенным риском ЕхРЕС, например индивидуумом с ослабленным иммунитетом или иммунодефицитом, индивидуумом, у которого планируется проведение хирургического вмешательства или недавно было проведено хирургическое вмешательство.

во, индивидуумом, имеющим раневое повреждение, пациентом, находящимся в палате интенсивной терапии или реанимации и т.д. В некоторых воплощениях субъект, которому вводят (или применяют) композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, является индивидуумом, находящимся в близком контакте с индивидуумом, имеющим или подверженным повышенному риску инфекции ExPEC.

В некоторых воплощениях субъект, которому вводят (или применяют) композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, является медицинским работником. В некоторых воплощениях субъект, которому вводят (или применяют) композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, имеет ослабленный иммунитет (например, имеет ВИЧ-инфекцию) или подавленный иммунитет. В некоторых воплощениях субъект, которому вводят (или применяют) композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, имеет диабет. В некоторых воплощениях субъект, которому вводят (или применяют) композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, имеет рассеянный склероз.

В некоторых воплощениях субъект, которому вводят (или применяют) композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, имеет состояние, требующее применения катетера, например мочевого катетера. В некоторых воплощениях субъект, которому вводят (или применяют) композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, имеет спинно-мозговую травму.

В некоторых воплощениях субъект является мужчиной, которому предстоит или недавно была проведена биопсия простаты.

В предпочтительном воплощении субъект, которому вводят (или применяют) композицию (или способ), раскрытые в настоящем описании, является подверженным риску взрослым человеком, которому необходима иммунизация для предупреждения инвазивного заболевания ExPEC, вызванного ExPEC серотипов O1A, O2, O6A и O25B. Примеры людей, подверженных риску, включают раскрытых выше, но не ограничиваются ими. Другие примеры людей, подверженных риску, включают, например, индивидуумов, проходящих трансректальное ультразвуковое исследование с пункционной биопсией простаты (TRUS-PNB) или страдающих рецидивирующим уросепсисом, находящихся в стационарах длительного пребывания (LTCF), проживающих в пансионатах с предоставлением ухода (LTAC), пациентов перед операцией (включая пациентов, которым планируется урогенитальное/полостное хирургическое вмешательство, но не ограничиваясь ими); пациентов перед диализом и т.д.

Дозы и частота введения.

Введение конъюгатов О-антигенов и белка-носителя ЕРА и/или их композиции можно осуществлять различными способами, известными клиницистам, например подкожным, парентеральным, внутривенным, внутримышечным, поверхностным, пероральным, внутрикожным, чрескожным, интраназальным и т.д. В одном воплощении введение осуществляют посредством внутримышечной инъекции.

Согласно воплощениям изобретения уровень доз антигена *E. coli* O25B должен быть не ниже, предпочтительно выше уровня доз других О-антигенов *E. coli*, используемых в композиции или способе по изобретению, где каждый из О-антигенов *E. coli* ковалентно связан с белком-носителем ЕРА. Конкретные дозы, используемые в композиции и способе, будут зависеть от способа введения и тяжести инфекции и должны определяться по усмотрению практикующего врача и в зависимости от ситуации у каждого пациента.

В некоторых воплощениях изобретения приведенные в качестве примера дозы антигена *E. coli* O25B находятся в диапазоне от 4 до 24 мкг антигена O25B на введение и приведенные в качестве примера дозы каждого дополнительного О-антигена *E. coli*, которые будут применяться в комбинации с антигеном *E. coli* O25B, находятся в диапазоне от 10 до 100% от дозы антигена-*E. coli* O25B, где каждый из дополнительных О-антигенов *E. coli* ковалентно связан с белком-носителем ЕРА. В некоторых воплощениях приведенная в качестве примера доза гликоконъюгата *E. coli* O25B составляет, например, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 мкг антигена O25B на введение и приведенная в качестве примера доза другого О-гликоконъюгата *E. coli* для применения в комбинации с гликоконъюгатом *E. coli* O25B составляет, например, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% от дозы гликоконъюгата *E. coli* O25B, где доза рассчитана по количеству О-антигена в О-гликоконъюгате на введение.

В некоторых воплощениях изобретения субъекту, которому необходимо, вводят 0,5 мл композиции по изобретению.

В некоторых воплощениях приведенная в качестве примера доза на введение человеку соответствует 0,5 мл композиции, содержащей первую концентрацию приблизительно 8-48 мкг/мл, например приблизительно 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 или 48 мкг/мл антигена *E. coli* O25B, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА, и концентрацию от 10 до 100% от первой концентрации одного или более дополнительных О-антигенов *E. coli*, ковалентно связанных с белком-носителем ЕРА. В некоторых воплощениях приведенная в качестве примера доза на введение человеку соответствует 0,5 мл композиции, содержащей концентрацию приблизительно 16 мкг/мл антигена *E. coli* O25B, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА, приблизительно 8 мкг/мл антигена *E. coli* O1A, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА, приблизительно 8 мкг/мл антигена *E. coli* O2, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА, и приблизительно 8 мкг/мл антигена *E. coli* O6A, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА.

В некоторых воплощениях приведенная в качестве примера доза на введение человеку соответству-

ет 0,5 мл композиции, содержащей концентрацию приблизительно 16 мкг/мл антигена *E. coli* O25B, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА, приблизительно 16 мкг/мл антигена *E. coli* O1A, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА, приблизительно 16 мкг/мл антигена *E. coli* O2, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА, и приблизительно 16 мкг/мл антигена *E. coli* O6A, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА.

В некоторых воплощениях приведенная в качестве примера доза на введение человеку соответствует 0,5 мл композиции, содержащей концентрацию приблизительно 32 мкг/мл антигена *E. coli* O25B, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА, приблизительно 16 мкг/мл антигена *E. coli* O1A, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА, приблизительно 16 мкг/мл антигена *E. coli* O2, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА, и приблизительно 16 мкг/мл антигена *E. coli* O6A, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА.

В некоторых воплощениях приведенная в качестве примера доза на введение человеку соответствует 0,5 мл композиции, содержащей концентрацию приблизительно 32 мкг/мл антигена *E. coli* O25B, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА, приблизительно 32 мкг/мл антигена *E. coli* O1A, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА, приблизительно 32 мкг/мл антигена *E. coli* O2, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА, и приблизительно 32 мкг/мл антигена *E. coli* O6A, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА.

В некоторых воплощениях конъюгаты О-антигена *E. coli*, предпочтительно биоконъюгаты, раскрытые в настоящем описании или композиции, раскрытые в настоящем описании, вводят субъекту однократно в виде однократной дозы. В некоторых воплощениях конъюгаты О-антигена *E. coli*, предпочтительно биоконъюгаты, раскрытые в настоящем описании или композиции, раскрытые в настоящем описании, вводят субъекту в виде однократной дозы, после чего через 3-6 недель следует введение второй дозы. Согласно указанным воплощениям бустерные инокуляции можно осуществлять субъекту с интервалами от 6 до 24 месяцев после второй инокуляции. В некоторых воплощениях в бустерных инокуляциях можно применять другой О-антиген *E. coli*, биоконъюгат или композицию. В некоторых воплощениях введение того же самого конъюгата О-антигена *E. coli* или композиции можно повторять, и интервалы между введениями могут составлять по меньшей мере 1 сутки, 2 суток, 3 суток, 5 суток, 7 суток, 10 суток, 15 суток, 30 суток, 45 суток, 2 месяца, 75 суток, 3 месяца или по меньшей мере 6 месяцев. В некоторых воплощениях конъюгат О-антигена *E. coli*, раскрытый в настоящем описании, или композицию, раскрытую в настоящем описании, вводят субъекту в виде однократной дозы один раз в год. В некоторых воплощениях конъюгат О-антигена *E. coli*, раскрытый в настоящем описании, или композицию, раскрытую в настоящем описании, вводят субъекту в виде однократной дозы один раз в *n* лет, где *n* составляет, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 лет.

В некоторых воплощениях конъюгат О-антигена *E. coli*, раскрытый в настоящем описании, или композицию, раскрытую в настоящем описании, 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 субъекту вводят 2, 3, 4, 5 или более доз конъюгата О-антигена *E. coli*, раскрытого в настоящем описании, или композиции, раскрытой в настоящем описании, с интервалом 2, 3, 4, 5 или 6 недель. В некоторых воплощениях вводимые конъюгат О-антигена *E. coli* или композиция каждый раз являются одинаковыми. В некоторых воплощениях вводимые конъюгат О-антигена *E. coli* или композиция каждый раз являются разными.

Исследования.

Способность конъюгатов/композиций, раскрытых в настоящем описании, вырабатывать иммунный ответ у субъекта можно оценивать с использованием любого подхода, известного специалистам в области техники с учетом настоящего описания. Исследования для оценки способности биоконъюгатов индуцировать иммунный ответ В некоторых воплощениях способность биоконъюгата вызывать иммунный ответ у субъекта можно оценивать посредством иммунизации субъекта (например, мыши) или ряда субъектов биоконъюгатом и иммунизации дополнительного субъекта (например, мыши) или ряда субъектов контролем (например, плацебо). Субъекта или ряд субъектов можно впоследствии инфицировать ЕхРЕС и определять способность ЕхРЕС вызывать заболевание (например, ИМП) у субъекта или ряда субъектов. Специалистам в области техники понятно, что если субъект или ряд субъектов, иммунизированных контролем, страдают от заболевания после инфицирования ЕхРЕС, а субъект или ряд субъектов, иммунизированных биоконъюгатом(ами) или его композицией, раскрытыми в настоящем описании, страдают меньше или не страдают заболеванием, биоконъюгат способен вызывать у субъекта иммунный ответ. Способность биоконъюгата(ов) или его (их) композиции, раскрытых в настоящем описании, вызывать образование антисыворотки, перекрестно реагирующей с О-антигеном ЕхРЕС, можно исследовать, например, при помощи иммунологического анализа, такого как ELISA.

Исследования бактерицидной активности *in vitro*.

Способность конъюгатов/композиций, раскрытых в настоящем описании, вызывать иммунный ответ у субъекта можно оценивать с использованием сывороточного бактерицидного теста (SBA) или опсофагоцитарного теста (ОРК-теста), который представляет собой общепринятый метод, используемый для получения разрешения на применение вакцин на основе гликоконъюгатов. Такие тесты хорошо известны в области техники и, вкратце, включают стадии выработки и выделения антител против мишени,

представляющей интерес (например, О-антигена *E. coli*, например O25B), посредством введения субъекту (например, мыши) соединения, вызывающего выработку таких антител. Впоследствии можно оценивать бактерицидную способность антител, например, посредством культивирования бактерий, о которых идет речь (например, *E. coli* соответствующего серотипа) в присутствии указанных антител и комплемента и в зависимости от теста нейтрофилов и оценивать способность антител вызывать гибель и/или нейтрализацию бактерий, например, с помощью стандартных микробиологических подходов.

Наборы.

Предложен комплект или набор, содержащий один или более чем один контейнер, заполненный одним или более чем одним ингредиентом композиций, раскрытых в настоящем описании, таким как один или более О-антигенов *E. coli* и/или конъюгатов О-антигенов *E. coli*, ковалентно связанных с белком-носителем ЕРА согласно воплощениям изобретения. Возможно, к такому контейнеру может быть присоединен листок с информацией или инструкциями по форме, предписанной государственными органами, регулирующими изготовление, применение или продажу фармацевтической или биологической продукции, где отражено разрешение на изготовление, применение или продажу для введения человеку, выданное соответствующими органами. Наборы, предусмотренные данным изобретением, можно применять в указанных выше способах лечения и иммунизации субъектов.

Следующие примеры предназначены для дальнейшей иллюстрации сути изобретения. Следует понимать, что приведенные примеры не ограничивают объем изобретения и что объем изобретения определяется приведенной ниже формулой изобретения.

Воплощения изобретения

Воплощение 1 представляет собой композицию, содержащую антигенный полисахарид *E. coli* O25B в первой концентрации и каждый из антигенного полисахарида *E. coli* O1A, антигенного полисахарида *E. coli* O2, антигенного полисахарида *E. coli* O6A во второй концентрации, где соотношение первой концентрации к второй концентрации составляет от 1:1 до 2:1, каждый из антигенных полисахаридов *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A независимо ковалентно связан с белком-носителем, представляющим собой обезвреженный экзотоксин A *Pseudomonas aeruginosa* (ЕРА), и первая концентрация составляет от 10 до 36 мкг/мл.

Воплощение 2 представляет собой композицию по воплощению 1, содержащую антигенные полисахариды *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A в соотношении доз 1:1:1:1.

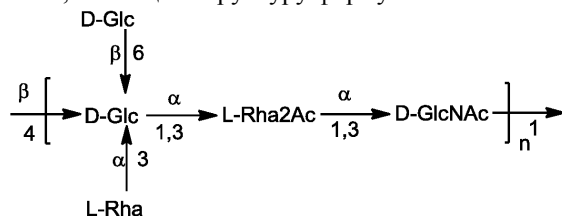
Воплощение 3 представляет собой композицию по воплощению 1, содержащую антигенные полисахариды *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A в соотношении доз 2:1:1:1.

Воплощение 4 представляет собой композицию по любому из воплощений 1-3, содержащую 16 мкг/мл антигенного полисахарида O25B.

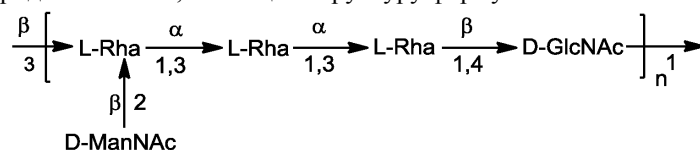
Воплощение 5 представляет собой композицию по любому из воплощений 1-3, содержащую 32 мкг/мл антигенного полисахарида O25B.

Воплощение 6 представляет собой мультивалентную иммунную композицию, содержащую антигенный полисахарид *E. coli* O25B в первой дозе от 5 до 18 мкг и каждый из антигенного полисахарида *E. coli* O1A, антигенного полисахарида *E. coli* O2, антигенного полисахарида *E. coli* O6A в дозе, которая независимо составляет от 50 до 100% от первой дозы, где каждый из антигенных полисахаридов *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A независимо ковалентно связан с белком-носителем, представляющим собой обезвреженный экзотоксин A *Pseudomonas aeruginosa* (ЕРА).

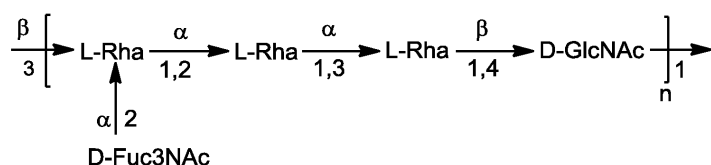
Воплощение 7 представляет собой мультивалентную иммунную композицию, содержащую антигенный полисахарид *E. coli* O25B, имеющий структуру формулы O25B'



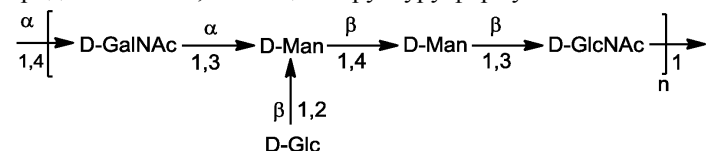
антигенный полисахарид *E. coli* O1A, имеющий структуру формулы O1A'



антигенный полисахарид *E. coli* O2, имеющий структуру формулы O2'



и антигенный полисахарид *E. coli* O6A, имеющий структуру формулы O6A'



где n независимо представляет собой целое число от 5 до 25 и каждый из антигенных полисахаридов *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A независимо ковалентно связан с белком-носителем, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и концентрации антигенных полисахаридов *E. coli* O25B, O1A, O2, O6A в композициях составляют, соответственно, 16:8:8:8 мкг/мл, 16:16:16:16 мкг/мл, 32:16:16:16 мкг/мл или 32:32:32:32 мкг/мл.

Воплощение 8 представляет собой способ индуцирования иммунного ответа против внекишечной патогенной *E. coli* (ExPEC) у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту композиции по любому из воплощений 1-7.

Воплощение 9 представляет собой способ индуцирования иммунного ответа на внекишечную патогенную *E. coli* (ExPEC) у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту антигенного полисахарида *E. coli* O25B в первом эффективном количестве и каждого из антигенного полисахарида *E. coli* O1A, антигенного полисахарида *E. coli* O2 и антигенного полисахарида *E. coli* O6A во втором эффективном количестве, где отношение первого эффективного количества к второму эффективному количеству составляет от 1:1 до 2:1, каждый из антигенных полисахаридов *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A независимо ковалентно связан с белком-носителем, представляющим собой обезвреженный экзотоксин A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA), и первое эффективное количество составляет от 5 до 18 мкг на введение.

Воплощение 10 представляет собой способ по воплощению 9, где антигенные полисахариды *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A вводят в соотношении доз 1:1:1:1.

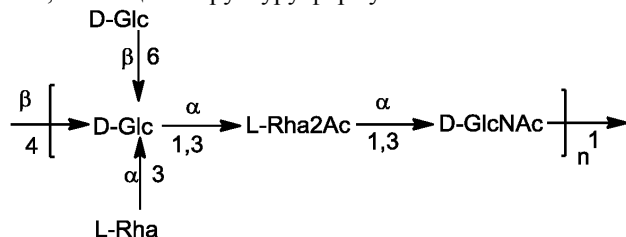
Воплощение 11 представляет собой способ по воплощению 9, где антигенные полисахариды *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A вводят в соотношении доз 2:1:1:1.

Воплощение 12 представляет собой способ по любому из воплощений 8-11, где вводят 8 мкг антигенного полисахарида O25B на введение.

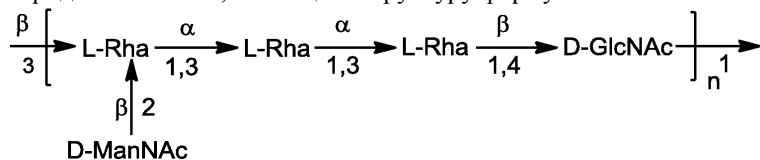
Воплощение 13 представляет собой способ по любому из воплощений 8-11, где вводят 16 мкг антигенного полисахарида O25B на введение.

Воплощение 14 представляет собой способ по любому из пп. 8-13, где антигенные полисахариды *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A вводят вместе в составе одной композиции.

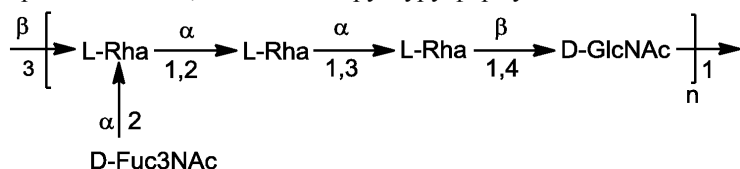
Воплощение 15 представляет собой способ индуцирования иммунного ответа на внекишечную патогенную *E. coli* (ExPEC) у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту антигенного полисахарида *E. coli* O25B, имеющего структуру формулы O25B'



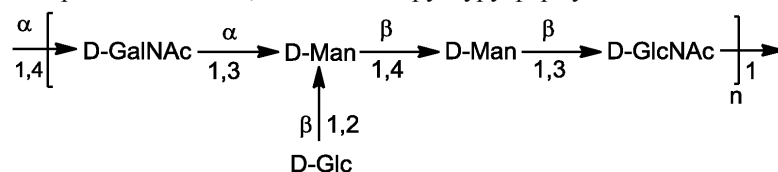
антигенного полисахарида *E. coli* O1A, имеющего структуру формулы O1A'



антигенного полисахарида *E. coli* O2, имеющего структуру формулы O2'



и антигенного полисахарида *E. coli* O6A, имеющего структуру формулы O6A'



где n независимо представляет собой целое число от 5 до 25, каждый из антигенных полисахаридов *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A независимо ковалентно связан с белком-носителем, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и антигенные полисахариды *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A вводят в соотношении 8:4:4:4 мкг, 8:8:8:8 мкг, 16:8:8:8 мкг или 16:16:16:16 мкг на введение.

Воплощение 16 представляет собой способ по любому из воплощений 8-15, где иммунный ответ ограничивает тяжесть или предупреждает инвазивное заболевание ExPEC, вызванное ExPEC серотипов O1A, O2, O6A и O25B, у человека, подверженного риску.

Воплощение 17 представляет собой способ по воплощению 16, где взрослый человек имеет инвазивное заболевание ExPEC, выбранное из группы, состоящей из инфекции мочевыводящих путей, инфекции области операционного вмешательства, инфекции брюшной полости или таза, пневмонии, нозокомиальной пневмонии, остеомиелита, паникулита, сепсиса, бактериемии, раневой инфекции, пиелонефрита, менингита, неонатального менингита, перитонита, холангита, инфекции мягких тканей, пиомозита и септического артрита, или подвержен риску его возникновения.

Воплощение 18 представляет собой способ получения композиции по любому из воплощений 1-7, включающий объединение антигенного полисахарида *E. coli* O25B, антигенного полисахарида *E. coli* O1A, антигенного полисахарида *E. coli* O2 и антигенного полисахарида *E. coli* O6A с получением таким образом композиции.

Примеры

Биоконъюгаты O-антигена.

Биоконъюгаты O1A-EPA, O2-EPA, O6A-EPA и O25B-EPA, содержащие, соответственно, *E. coli* O1A, O2, O6A и O25B, ковалентно связанные с сайтами гликозилирования белка-носителя EPA, можно получать, очищать и характеризовать, как описано, например, в Ihssen et al., 2010, Microbial Cell Factories 9, 61, а также в WO 2006/119987, WO 2009/104074 и в заявке на международный патент PCT/EP 2015/053739, содержание которых включено во всей полноте посредством ссылки. Биоконъюгаты синтезируют с использованием клеток рекомбинантных *E. coli*, которые экспрессируют ферменты, синтезирующие полисахариды различных O-серотипов, в присутствии олигосахарилтрансферазы PglB и белка-носителя (EPA). В данном подходе вакцину на основе гликоконъюгата можно экспрессировать в периплазме *E. coli*, выделять и очищать с использованием биохимического процесса, проиллюстрированного на фиг. 1 и 2. В табл. 2 указаны штаммы-хозяева, использованные при получении конъюгатов в соответствии с воплощением изобретения.

Таблица 2

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

Продукт	Штамм	Плазмида, экспрессирующая EPA	Плазмида, экспрессирующая PglB
EPA-O1A	W3110 $\Delta rfb::rfb(upec032) \Delta waaL$	pGVXN1076	pGVXN970
EPA-O2	W3110 $\Delta rfb::rfb(upec116) \Delta waaL$	pGVXN1076	pGVXN971
EPA-O6A	W3110 $\Delta rfb::rfb(CCUG11309) \Delta waaL$	pGVXN659	pGVXN114
EPA-O25B	W3110 $\Delta rfb::rfb(upec138) \Delta waaL \Delta gtrABS$	pGVXN1076	pGVXN970

Например, для получения O25B-EPA конструировали штамм с интегрированным в геном кластером O25B: W3110 $\Delta waaL \Delta gtrABS \Delta rfbO16::rfb(upec138)$, который трансформировали плазмидами pGVXN1076 (экспрессирующей EPA с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1) и pGVXN970 (экспрессирующей олигосахарилтрансферазу PglB) (WO/2009/104074). Данный штамм конструировали на основе штамма W3110 способом, предложенным Datsenko and Wanner (2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 6640-6645), и методом гомологичной рекомбинации для сайт-направленной интеграции больших вставок в бактериальные хромосомы (см. WO 2014/057109). Кластер *rfb*, относящийся к антигену O25B, клонировали из штамма-*E. coli* upec138, положительного по O25B. Рекомбинантные клетки-хозяева продуцировали биоконъюгаты O25B/EPA в периплазме. Полученные биоконъюгаты O25B характеризовали с использованием стандартных тестов, в которых определяли их высвобождение и присутствие. Биоконъюгаты очищали посредством двух последовательных стадий анионообменной и эксклюзионной хроматографии, получая препараты биоконъюгата O25B с чистотой 98,1%.

Аналогично были сконструированы штаммы-хозяева для рекомбинантной продукции O1A-EPA, O2-EPA и O6A-EPA (табл. 2). Указанные штаммы содержали кластеры *gfb*, относящиеся к O1A, O2 и O6A, которые клонировали из *E. coli* штаммов *ucres032*, *ucres116* и *CCUG11309* соответственно. Биоконъюгаты O1A-EPA, O2-EPA и O6A-EPA получали из указанных рекомбинантных клеток-хозяев и очищали способами, известными в области техники, с учетом настоящего описания.

Для анализа чистоты проводили количественное определение с помощью SDS PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия). Отношение углеводов к белкам рассчитывали по результатам количественного определения углеводов антроновым методом (см. Laurentin and Edwards, 2003, Anal. Biochem. 315, 143-145) и определения концентрации белка методом с бичинхониновой кислотой. Аналитическая эксклюзионная хроматография показала, что частицы находились в мономерном состоянии, что согласовывалось с ожидаемым гидродинамическим радиусом EPA с присоединенными гликановыми цепями.

Для количественного определения степени моно- и дигликозилирования отдельных биоконъюгатов и для определения молекулярной массы (MW) белка-носителя и присоединенного к нему O-PS (О-полисахарида) биоконъюгаты и негликозилированный референтный стандарт EPA анализировали посредством эксклюзионной хроматографии с детектором многоугольного лазерного светорассеяния (SEC-MALS). Образцы разделяли на колонке TSKgel-G3000 SWxl в фосфатном буфере (pH 7,0; 50 mM NaCl, 150 mM фосфат натрия) и осуществляли детекцию по поглощению в УФ-области (214 и 280 нм), показателю преломления (RI) и многоугольному светорассеянию (MALS).

Композиции вакцин.

Данный пример иллюстрирует композиции вакцин, пригодные для настоящего изобретения.

Таблица 3-1

Композиции вакцин		
Ингредиент	Количество (мкг/мл)	
<u>Действующее вещество</u>	ExPEC4V	Композиция 3
<i>O-antigen polysaccharide</i>		
E. coli O1A	8	8
E. coli O2	8	8
E. coli O6A	8	8
E. coli O25B	8	16
<i>Белок-носитель</i>		
EPA	109	Расчетное: 126
Экспципенты		
TBS буфер, содержащий	pH 7,4	
Трис	25 mM	
NaCl	137 mM	
KCl	2,7 mM	

Таблица 3-2

Композиции вакцин		
Ингредиент	Количество (мкг/мл)	
<u>Действующее вещество</u>	Композиция 1	Композиция 2
<i>O-antigen polysaccharide</i>		
E. coli O1A	32	16
E. coli O2	32	16
E. coli O6A	32	16
E. coli O25B	32	32
<i>Белок-носитель</i>		
ЕРА	Расчетное: 436	Расчетное: 251
Экспципенты		
TBS буфер, содержащий	pH 7,4	
Трис	25 мМ	
NaCl	137 мМ	
KCl	2,7 мМ	

Каждая из раскрытых выше композиций вакцин упакована во флакон и готова для инъекции. Препараты вакцины следует хранить при температуре от +2 до +8°C. Действующие вещества в композиции вакцины представляют собой гликозилированные белки (биоконъюгаты, состоящие из белка-носителя ЕРА, ковалентно связанного с О-антигенным полисахаридом E. coli), дозу рассчитывают только на основании содержания полисахаридной группировки (О-антигена).

Доза белка-носителя ЕРА зависит от соотношения полисахарид:белок. Расчетное соотношение полисахарид:белок составляло от 15 до 50% в зависимости от серотипа О-антигена, т.е. масса полисахарида в конъюгате составляла приблизительно от 15 до 50% от массы белка-носителя ЕРА в конъюгате. Для каждого серотипа в ExPEC4V проводили количественное определение отношения полисахарид:белок, например определяли количество полисахарида (О-антиген) антроновым методом (см. Laurentin and Edwards, 2003, Anal Biochem 315, 143-145), и для определения концентрации белка использовали метод с бисинхониновой кислотой. Для каждого серотипа в продуктах 1-3 значение ЕРА, которое приведено в табл. 3-1 и 3-2, представляет собой значение, рассчитанное на основании аналитических данных, полученных для ExPEC4V. Стабильность композиций четырехвалентной вакцины (биоконъюгаты O25B, O1A, O2 и O6) исследовали в течение 3-месячного периода. Для определения путей деградации проводили исследования стабильности в условиях ускоренного старения. Данные исследования показали, что действующие вещества и композиции четырехвалентной вакцины стабильны по меньшей мере в течение трех месяцев и, следовательно, в части стабильности являются подходящими композициями вакцины.

Исследование токсичности при многократном введении крысам.

Исследование токсичности проводили в соответствии с требованиями надлежащей лабораторной практики (GLP) на крысах Sprague-Dawley для оценки токсичности и местной переносимости композиции вакцины после 2 внутримышечных (в/м) инъекций (в четырехглавую мышцу бедра) на 1 и 14 сутки с 14-дневным восстановительным периодом. Обратимость, персистирование и отсроченное возникновение любых изменений оценивали после 14-дневного восстановительного периода (т.е. на 28 сутки). Схема исследования 1 фазы для оценки токсичности при многократном введении крысам представлена в табл. 4.

Таблица 4

Схема исследования токсичности при многократном введении крысам

Группа	Величина дозы	Концентрация (мкг/мл)	Объем дозы (мл) ^b	Животные основной группы (n) ^c	Животные группы восстановления (n) ^d
Плацебо ^a	-	-	0,5	10 M + 10 F	5 M + 5 F
ExPEC4V	4 мкг полисахарида каждого О-антигена = суммарно 16 мкг полисахарида в одной дозе + 48 мкг белка-носителя ЕРА в одной дозе	8 мкг/мл полисахарида каждого О-антигена + белок-носитель ЕРА: 96 мкг/мл	0,5	10 M + 10 F	5 M + 5 F

ЕРА = экзобелок А/экзотоксин А *Pseudomonas aeruginosa* в обезвреженной форме, использованный в качестве белка-носителя;

F означает самка,

M означает самец.

Примечание: 1 сутки означает начало применения препарата,

^a группе плацебо вводили рецептурный буфер (контроль с несущей средой),

^b животные получали 2 инъекции по 0,25 мл на введение (в левую и правую заднюю конечность); введение животным осуществляли 2-кратно: на 1 сутки и 14 сутки,

^c животных в основной группе подвергали эвтаназии на 17 сутки,

^d животных, прошедших восстановительный период, подвергали эвтаназии на 28 сутки, т.е. через 14 суток после второго применения препарата.

В данном исследовании испытывали дозу 4 мкг на О-антиген полисахарида (PS) ExPEC4V (общая доза PS 16 мкг). Указанная доза эквивалентна максимальной дозе, которую испытывали в клиническом исследовании 1 фазы, описанном ниже. Таким образом, в исследовании токсичности на крысах, проводившемся в соответствии с требованиями GLP, вводили полную дозу, которую применяли у людей в исследовании 1 фазы. Исследование проводили на партии препарата для доклинических исследований, которая была репрезентативной для партии препарата, использованной в клиническом исследовании 1 фазы.

В ходе исследования не наблюдалось ни летальных исходов, ни связанных с использованием препарата клинических проявлений (включая температуру тела), ни офтальмологических изменений. Кроме того, токсикологически значимых побочных действий на массу тела, увеличение массы тела, потребление пищи или на гематологические, биохимические, коагуляционные показатели и показатели анализа мочи не наблюдалось. По окончании применения препарата (14 сутки) и по окончании восстановительного периода (28 сутки) макроскопические изменения или изменения массы органов, связанные с исследуемым препаратом, отсутствовали. Нежелательных изменений, связанных с исследуемым препаратом, не наблюдали. В местах инъекций в четырехглавую мышцу бедра в конце периода применения препарата как в группе, получавшей плацебо, так и в группе, получавшей исследуемый препарат, по результатам микроскопического исследования отмечали изменения от минимальных до умеренных (интерстициальное воспаление, дегенерация/некроз миофибрилл и полиморфно-клеточный воспалительный инфильтрат), которые не относили к нежелательным. Указанные изменения не связывали с введением исследуемого препарата, а считали следствием самой процедуры введения (т.е. в/м инъекции). В конце восстановительного периода место инъекции, произведенной в мышцу на 1 сутки, восстанавливалось, тогда как в месте инъекции, произведенной на 14 сутки, в мышце наблюдались остаточные минимальные полиморфно-клеточные воспалительные инфильтраты, что позволяло предположить текущее восстановление как у животных, получавших плацебо, так и у получавших исследуемый препарат. В целом, вакцина хорошо переносилась, и побочных действий, связанных с исследуемым препаратом, не отмечалось.

Была подтверждена иммуногенность вакцины, вызывавшей выработку сывороточного иммуноглобулина G (IgG) против 4 О-антигенов в вакцинированной группе в более высоком титре по сравнению с группой плацебо, получавшей только рецептурный буфер.

Исследование токсичности при многократном введении кроликам.

Исследование токсичности проводили в соответствии с требованиями надлежащей лабораторной практики (GLP) на кроликах NZW (TOX11163, предварительный отчет) для оценки токсичности и местной переносимости ExPEC4V после 3 в/м инъекций (на 0, 14 и 28 сутки), выполнявшихся с интервалом 2

недели, с 3-месячным восстановительным периодом. Обратимость, персистирование и отсроченное возникновение любых изменений оценивали на 49 сутки, после 3-недельного периода отсутствия применения препарата после 3 инъекции, выполнявшейся на 28 сутки. Схема исследования 2 фазы для оценки токсичности при многократном введении кроликам представлена в табл. 5.

Таблица 5

Схема исследования токсичности при многократном введении кроликам

Группа	Величина дозы ^a (мкг/дозу)	Концентрация (мкг/мл)	Вводимый объем на дозу	ADM ^d	Дни введения	Число животных	
						Терминальная группа ^e	Группа восстановления ^e
1	-	0	2x1 мл	ADM 1, 2 ADM 3, 4 ADM 5, 6	0 сутки, 14 сутки, 28 сутки	5 М + 5 F	5 М + 5 F
2	32 ^b	32	1 мл	ADM 1 ADM 3 ADM 5	0 сутки, 14 сутки, 28 сутки	5 М + 5 F	5 М + 5 F
3	64 ^c	32	2x1 мл	ADM 1, 2 ADM 3, 4 ADM 5, 6	0 сутки, 14 сутки, 28 сутки	5 М + 5 F	5 М + 5 F

ADM: место введения;

F означает самка;

М означает самец.

Примечание: 0 сутки означает начало применения препарата; группа 1 получала физиологический раствор (контрольная группа),

^a общее количество О-антигенного полисахарида (соотношение 1:1:1:1 для серотипов O1A, O2, O6A и O25B соответственно),

^b 8 мкг полисахарида на серотип плюс суммарно 109 мкг белка-носителя ЕРА,

^c 16 мкг полисахарида на серотип плюс суммарно 218 мкг белка-носителя ЕРА,

^d ADM1: левая нижняя часть двуглавой мышцы бедра; ADM2: правая нижняя часть двуглавой мышцы бедра; ADM3: левая верхняя часть двуглавой мышцы бедра; ADM4: правая верхняя часть двуглавой мышцы бедра; ADM5: левая четырехглавая мышца бедра; ADM6: правая четырехглавая мышца бедра,

^e животных в терминальной группе подвергали эвтаназии на 30 сутки, а животных в группе восстановления на 49 сутки.

В данном исследовании испытывали ExPEC4V в максимальной дозе по 16 мкг каждого О-антигена PS (общая доза PS 64 мкг, наряду с 218 мкг белка-носителя ЕРА). Указанная доза в 4 раза превышает максимальную дозу, которую испытывали в предыдущем исследовании токсичности (1 фазы) на крысах, соответствующем требованиям GLP, и эквивалентна максимальной дозе PS (и ЕРА), которую оценивали в клиническом исследовании 2 фазы, описанном ниже. Таким образом, в данном исследовании токсичности на кроликах, соответствующем требованиям GLP, вводили полную (максимальную) дозу, предназначенную для применения у людей в исследовании 2 фазы.

Исследование проводили с использованием ExPEC4V (содержащей суммарно 32 мкг/мл PS), которую использовали в клиническом исследовании 1 фазы, описанном ниже. Данную партию препарата считали репрезентативной для композиции вакцины, которую использовали в клиническом исследовании 2 фазы, описанном ниже (содержащей суммарно 128 мкг/мл PS), поскольку в обеих композициях вакцины использовали одинаковые лекарственные субстанции.

В ходе исследования летальных случаев не наблюдалось. Влияние на температуру тела, массу тела, увеличение массы тела, потребление пищи, офтальмологические, кожные показатели (тест Дрейза), биохимические показатели и С-реактивный белок отсутствовало.

Самки, получавшие 64 мкг ExPEC4V, демонстрировали минимальное снижение уровней гемоглобина по окончании применения препарата и восстановительного периода с минимальным снижением общего числа эритроцитов и гематокрита в конце восстановительного периода, которое не считали желательным. Через 1 неделю после 1 инъекции и в конце периода применения препарата у самок отмечалось минимальное повышение фибриногена, однако в конце восстановительного периода, когда применение препарата отсутствовало, изменений уже не наблюдалось.

Вскоре после введения у некоторых животных в группах, получавших ExPEC4V, наблюдалась депигментация гиподермы, которая коррелировала с очагами/областями депигментации, обнаруженными при вскрытии (30 сутки) в местах инъекций, произведенных на 28 сутки, во всех группах (включая контрольную группу). По окончании восстановительного периода аномалий не отмечалось. Гистопатологи-

ческие изменения были представлены множественными очагами воспалительной полиморфно-клеточной инфильтрации (от минимальной до легкой степени), которые наблюдались преимущественно в местах инъекций, произведенных на 28 сутки, у животных, получавших ExPEC4V. По окончании восстановительного периода (49 сутки) только у 1 самки в группе, получавшей высокую дозу, наблюдалась воспалительная полиморфно-клеточная инфильтрация в месте инъекции, произведенной на 28 сутки, что свидетельствовало о (текущем) восстановлении.

В дренирующих медиальных подвздошных лимфатических узлах кроликов, получавших ExPEC4V, по окончании периода применения препарата наблюдалась продукция (в терминальных центрах) и секвестрация лимфобластов в паракорткесе и/или медуллярных связках, что в результате приводило к увеличению общего клеточного содержимого. Кроме того, лимфоузлы были увеличены у обоих полов, что коррелировало с увеличением массы тела у самок. По окончании восстановительного периода этих результатов не наблюдалось. В селезенке самцов и самок, получавших исследуемый препарат, по окончании периода применения препарата и восстановительного периода отмечалось увеличение количества герминативных центров, сопровождавшееся увеличением массы селезенки у обоих полов по окончании периода применения препарата.

Эти изменения не считали нежелательными и связывали с иммунным ответом на введение вакцины.

Иммуногенность вакцины была подтверждена, поскольку уровни IgG к О-антигенам всех 4 серотипов, а также ЕРА были повышены у самцов и самок. В целом, вакцинация кроликов (3 в/м инъекции с интервалом 2 недели) ExPEC4V в дозах, содержащих суммарно до 64 мкг PS, была безопасной и хорошо переносимой. Все явления, наблюдавшиеся в связи с использованием препарата, расценивали как нормальный, не являющийся нежелательным ответ на введение вакцины.

Функциональность гуморальных ответов, индуцированных вакциной, у крыс.

Для оценки функциональной активности индуцированных вакциной гуморальных ответов на био-конъюгаты O25B, O1A, O2 и O6A сыворотку крыс, вакцинированных одновалентной или четырехвалентной вакцинами, содержащими био-конъюгаты O25B, O1A, O2 и O6A в отдельности или в комбинации, исследовали с помощью ОРК-теста, в котором определяли комплемент- и антителозависимый фагоцитоз и уничтожение бактерий, например *E. coli*, *in vitro*. ОРК-тест характеризует способность сыворотки усиливать опсонизацию, фагоцитоз и уничтожение *E. coli* различных серотипов. В каждой лунке 96-луночных планшетов инкубировали определенные разведения образцов сыворотки с бактериями 1-4 серотипов *E. coli*, соответствующих вакцине, определенное количество клеток HL60 и комплемент крольчонка. После инкубации часть смеси наносили на триптон-соевый агар (TSA) и подсчитывали число бактериальных колоний. Способность антител связываться с бактериальными клетками и активировать присоединение комплемента, а также опосредовать поглощение и уничтожение бактерий клетками HL60, выражали в виде опсонического титра. Опсонический титр или индекс опсонизации (IO) соответствует разведению сыворотки, вызывающему уничтожение 50% бактериальных клеток. Представлены индексы опсонизации сыворотки до и после иммунизации. Значимым считали по меньшей мере 4-кратное увеличение IO сыворотки после иммунизации по сравнению с показателем до иммунизации.

Производили предварительную опсонизацию *E. coli* с использованием разведений сыворотки вакцинированных крыс, инкубировали с комплементом и фагоцитами (дифференцированные клетки HL60) и подсчитывали колониеобразующие единицы (CFU). Затем подсчитывали максимальный % уничтожения и индекс опсонизации (IO: разведение сыворотки, вызывающее уничтожение 50% *E. coli*). Для ОРК-теста выбирали *E. coli* OC 24453 (серотип O2), OC 24781 (серотип O6A) и OC 24176 (серотип O25B).

Как показывают результаты, представленные на фиг. 3А-3В, одновалентные вакцины, содержащие O2-EPA, O6A-EPA и O25B-EPA, индуцировали выраженные гуморальные ответы у крыс, и такие гуморальные ответы являлись функциональными, приводя к уничтожению *E. coli* указанных серотипов.

В табл. 6 показаны общие титры IO для О-антигенов O2, O6A и O25B крыс, иммунизированных четырехвалентной вакциной, содержащей по 0,4 или 4 мкг каждого О-антигена. Титры определяли в двух отдельных экспериментах. При дозе 0,4 мкг у всех животных были получены значимые IO в отношении серотипов O2 и O6A. В случае O25B 3 из 8 животных демонстрировали значимое увеличение IO после иммунизации в дозе 0,4 мкг. У всех животных доза 4 мкг вызывала меньшее увеличение IO в отношении O2 по сравнению с дозой 0,4 мкг. В группе, получавшей дозу 4 мкг, 3 из 8 животных демонстрировали увеличение IO, когда сыворотку тестировали на *E. coli* O25B.

Результаты подтвердили, что четырехвалентная вакцина способна вызывать выработку у животных опсонизирующих О-антиген-специфичных антител против O2, O6A и O25B, что свидетельствует о том, что композиции вакцины, раскрытые в настоящем описании, индуцируют гуморальный ответ против серотипов *E. coli*, О-антигены которых входят в состав вакцины, и что указанный гуморальный ответ является функциональным, приводя к уничтожению *E. coli* указанных серотипов.

Таблица 6

ИО против E. coli O2, O6A и O25B
Для всех животных приведены ИО для отдельных сывороток до вакцинации и после 3 вакцинаций,
полученные в двух отдельных экспериментах

Индексы опсонизации (ИО) сыворотки крыс, иммунизированных четырехвалентной вакциной с ЕРА												
Животное №	E.coli O2				E.coli O6				E.coli O25			
	Доза 0,4 мкг		Доза 4 мкг		Доза 0,4 мкг		Доза 4 мкг		Доза 0,4 мкг		Доза 4 мкг	
	Эксп. 1	Эксп. 2	Эксп. 1	Эксп. 2	Эксп. 1	Эксп. 2	Эксп. 1	Эксп. 2	Эксп. 1	Эксп. 2	Эксп. 1	Эксп. 2
1: до вакцинации	6	7	5	0	17	6	6	16	2404	2082	0	0
после вакцинации	>16384	1476	293	32	202	226	2045	2821	1847	1578	9	0
2: до вакцинации	21	11	11	20	11	90	0	0	0	0	0	0
после вакцинации	11148	>16384	150	120	436	475	10262	11460	0	0	4	0
3: до вакцинации	6	6	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0
после вакцинации	11073	>16384	46	19	98	37	7959	8597	6	0	355	197
4: до вакцинации	5	5	5	6	23	17	0	0	0	0	0	0
после вакцинации	>16384	63	57	45	108	116	2189	4488	0	0	70	26
5: до вакцинации	7	0	0	4	30	8	8	7	0	0	0	0
после вакцинации	10413	7050	105	108	>16384	12672	3107	7564	0	0	105	69
6: до вакцинации	8	0	8	7	299	164	5	0	269	154	0	0
после вакцинации	89	34	24	17	1725	1475	540	896	0	0	0	0
7: до вакцинации	9	9	6	6	18	21	22	5	0	0	0	0
после вакцинации	>16384	>16384	109	92	1249	1863	160	143	1130	630	9	8
8: до вакцинации	4	6	6	5	26	22	0	0	0	0	0	0
после вакцинации	5058	4201	39	25	6590	3826	288	656	3336	1986	0	0
Сред. до вакцинации	8	5	5	6	53	42	5	3	334	280	0	0
Сред. после вакцинации	10867	7747	103	57	3349	2586	3319	4578	790	524	69	37

Влияние на человека. Исследование фазы I.

ExPEC4V испытывали в первом исследовании 1 фазы у человека, в которое всего вошли 194 субъекта. Указанное исследование 1 фазы представляло собой рандомизированное плацебо-контролируемое многоцентровое исследование. Исследование представляло собой простое слепое исследование, поскольку исследователю и персоналу, участвующему в исследовании, была известна группа рандомизации субъектов, тогда как субъекты в течение всего времени держались в неведении относительно группы их рандомизации.

Задачей указанного первого исследования у человека была оценка безопасности, иммуногенности и эффективности экспериментальной вакцины у здоровых женщин в возрасте от больше или равно 18 до меньше или равно 70 лет, имеющих в анамнезе рецидивирующую инфекцию мочевыводящих путей (рИМП). Главной задачей исследования было сравнение нежелательных явлений, сообщаемых в процессе направленного опроса и спонтанно (АЕ), а также серьезных нежелательных явлений (SAE) у субъектов, получавших ExPEC4V, и субъектов, получавших плацебо. Дополнительные задачи включали показатели иммуногенности, число симптоматических эпизодов ИМП, вызванных серотипами *E. coli*, входящими в состав вакцины, а также частоту возникновения и клинические симптомы ИМП, вызванные серотипами *E. coli*, специфическими для вакцины.

Субъекты, подходящие для участия в исследовании, должны были иметь по меньшей мере 3 независимых эпизода ИМП за последние 12 месяцев или по меньшей мере 2 независимых эпизода ИМП за последние 6 месяцев; по меньшей мере 1 независимый эпизод ИМП должен был быть связан с инфекцией *E. coli*, подтвержденной культуральными методами. Всего было включено 194 субъекта и их рандомизировали на группы для однократного в/м введения ExPEC4V в дозе 0,5 мл или плацебо (см. табл. 7). Включение в исследование осуществляли с разнесением по времени, чтобы оценить результаты по безопасности на 14 сутки до перехода к следующей фазе.

1. Первые 8 субъектов рандомизировали (3:1) для получения дозы 1 мкг каждого PS или плацебо.
2. Следующие 8 субъектов рандомизировали (3:1) для получения дозы 4 мкг каждого PS или плацебо.
3. Оставшиеся 178 субъектов рандомизировали (1:1) для получения дозы 4 мкг каждого PS или плацебо.

Таблица 7

Демографические и исходные характеристики субъектов, включенных в исследование 1 фазы

		ExPEC4V			
		Плацебо	1 мкг полисахарида каждого серотипа ^a N = 6	4 мкг полисахарида каждого серотипа ^a N = 93	Всего N = 19
Возраст (лет)	N Среднее (ст. откл.) Медиана (размах)	95 42,1 (15,9) 42,6 (18, 71)	6 28,1 (9,6) 23,1 (20, 43)	93 42,0 (17,6) 38,5 (19, 72)	194 41,6 (16,7) 39,6 (18, 72)
Раса	N Европеоиды Другие	95 91 (96%) 4 (4%)	6 6 (100%) 0	93 87 (94%) 6 (6%)	194 184 (95%) 10 (5%)
Масса тела (кг)	N Среднее (ст. откл.) Медиана (размах)	95 63,1 (11,0) 61 (46,2, 95,0)	6 59,7 (10,3) 56,5 (50, 79)	93 63,8 (11,0) 63 (44, 105)	194 63,3 (10,9) 61 (44, 105)
Индекс массы тела (кг/м ²)	N Среднее (ст. откл.) Медиана (размах)	95 23,2 (4,1) 22 (17,8, 33,7)	6 21,1 (4,3) 19,9 (17,5, 29,4)	93 23,3 (3,8) 22,7 (17,6, 34,3)	194 23,2 (3,9) 22,2 (17,5, 34,3)
Менопаузальный статус	N Пременопауза	95 64 (67%)	6 6 (100%)	93 57 (61%)	194 127 (65%)
Способность к деторождению	N да	64 55 (86%)	6 6 (100%)	57 54 (95%)	127 115 (91%)

^a Доза ExPEC4V содержит О-антигенный полисахарид ExPEC серотипов O1A, O2, O6A и O25B.

В ходе первого визита субъекты, подходящие для участия в исследовании, давшие информированное согласие, проходили скрининг и подтверждалось их соответствие критериям включения/исключения. Брели образцы крови и мочи. В ходе 2 визита (1 сутки) каждый субъект получал одну внутримышечную инъекцию 0,5 мл раствора (ExPEC4V или плацебо) в дельтовидную мышцу. Уменьшенная доза экспериментальной вакцины содержала 1 мкг каждого полисахарида (суммарно 4 мкг полисахаридов). Целевая доза экспериментальной вакцины содержала 4 мкг каждого полисахарида (суммарно 16 мкг полисахаридов).

Безопасность оценивали по местным (боль, покраснение и припухлость в месте инъекции) и системным (жар, т.е. температура тела $>38^{\circ}\text{C}$) АЕ, зафиксированным в дневнике при ответе на соответствующий вопрос, начиная с 1 суток и до 7 суток после вакцинации, а также АЕ и SAE, зафиксированным до 270 суток (визит в конце исследования). Имуногенность оценивали с помощью сертифицированного ELISA и ОРК-теста с использованием сыворотки из образцов крови, взятых до вакцинации в 1 сутки и после вакцинации на 30 и 270 сутки.

Описательная статистика (n, среднее арифметическое, стандартное отклонение, медиана и размах для непрерывных переменных, частота и проценты для категориальных переменных) представлены по группам воздействия и/или по визитам, где это применимо. Все данные указаны для субъектов, группы воздействия и, где применимо, визитов. Всех субъектов из группы В, получавших плацебо, объединяли для формирования группы плацебо.

Безопасность.

К настоящему времени в исследовании 1 фазы (которая все еще продолжается) не зафиксировали нежелательных лекарственных реакций, существенных аномалий клинико-лабораторных показателей, побочных действий со стороны сердечно-сосудистой, дыхательной, центральной нервной системы, почек или других существенных побочных действий, передозировки. Возникновение нежелательных явлений и серьезных нежелательных явлений сравнивали между группами, получавшими плацебо и вакцинацию.

Имуногенность - общий титр антител.

Для оценки имуногенности компонентов вакцины получали сыворотку женщин, принимавших участие в клиническом исследовании, и исследовали при помощи ELISA для количественного определения IgG к четырем различным О-антигенам, входящим в четырехвалентную вакцину (*E. coli* O1, *E. coli* O2, *E. coli* O6 и *E. coli* O25B).

Суммарные титры IgG антител на 1 сутки (до вакцинации) и на 30 суток оценивали при помощи сертифицированного ELISA, оптимизированного для изолята каждого серотипа, с использованием очищенного серотип-специфического О-антигена в качестве первичного анализируемого антигена. Суммарные титры IgG антител для каждого серотипа вычисляли с использованием 4-параметрической логистической регрессии для определения значений концентрации, вызывающей полумаксимальный эффект (EC_{50}), для каждого образца.

1 мкг полисахарида каждого серотипа в составе ExPEC4V ($N = 6$).

Шесть субъектов получали ExPEC4V в дозе 1 мкг PS каждого серотипа (суммарно 4 мкг PS). Анализ серотип-специфических иммунных ответов указанных субъектов на 30 суток показал, что доля субъектов с ≥ 2 -кратным увеличением общего количества антител к каждому серотипу составляла 50% (серотип O1A), 83% (серотип O2), 50% (серотип O6A) и 67% (серотип O25B). Доля субъектов с ≥ 4 -кратным увеличением титра антител была ниже, т.е. 17% (серотип O6A), 33% (серотип O1A), 33% (серотип O6A) и 50% (серотип O25B).

Анализ ответов в группе, получавшей дозу 1 мкг PS каждого серотипа, показал сопоставимую степень увеличения для всех 4 серотипов. Для серотипов O1A, O2, O6A и O25B медианные значения кратности увеличения титров антител при сравнении на 30 суток и на 1 сутки составляли 2,5, 3,7, 2,2 и 4,1 соответственно. У отдельных субъектов кратность увеличения варьировала от 1 до 6 для серотипов O1A и O2, от 1 до 7 для серотипа O6A и от 1 до 11 для серотипа O25B. Средние геометрические значения титров (GMT) для соответствующих 4 серотипов на 30 суток составляли 4053, 13768, 1236 и 227 (табл. 8), что соответствовало приблизительно 2,2-3,5-кратному увеличению по сравнению со значениями GMT на 1 сутки.

Таблица 8

GMT и 95% доверительные интервалы общих титров антител с 1 суток (до вакцинации) до 30 суток при определении методом ELISA - исследование 1 фазы

		ExPEC4V					
		Плацебо N = 95		1 мкг полисахарида каждого серотипа ^a N = 6		4 мкг полисахарида каждого серотипа ^a N = 93	
Антитело		1 сутки	30 суток	1 сутки	30 суток	1 сутки	30 суток
O1A	GMT	1895	1887	1720	4053	1807	9460
	95% ДИ	1515 – 2369	1517 – 2347	633 – 4672	2160 – 7605	1489 – 2191	7511 – 11916
O2	GMT	3529	3502	4266	13768	2855	27973
	95% ДИ	2926 – 4257	2910 – 4214	1731 – 10511	6516 – 29091	2279 – 3576	22026 – 35526
O6A	GMT	943	953	558	1236	920	4475
	95% ДИ	777 – 1145	789 – 1151	292 – 1067	799 – 1911	743 – 1138	3608 – 5549
O25B	GMT	285	282	64	227	261	2164
	95% ДИ	211 – 384	209 – 381	16 – 254	53 – 976	188 – 363	1676 – 2794

^a 4 мкг полисахарида каждого серотипа в составе ExPEC4V (N = 93).

Введение ExPEC4V в дозе 4 мкг PS каждого серотипа (суммарно 16 мкг PS) приводило к более выраженному иммунному ответу по сравнению с дозой, содержащей 1 мкг PS каждого серотипа (суммарно 4 мкг PS). Анализ указанных субъектов на 30 суток показал, что доля субъектов с ≥ 2 -кратным увеличением общего количества антител к каждому серотипу составляла 81% (серотип O1A), 92% (серотип O2), 80% (серотип O6A) и 82% (серотип O25B). Доля субъектов с ≥ 4 -кратным увеличением титров антител варьировала от 57% (серотипы O1A и O6A) до 80% (серотип O2), что было ниже доли с 2-кратным увеличением, однако заметно выше по сравнению с тем, что наблюдалось, когда доза включала 1 мкг PS каждого серотипа. См. также фиг. 4, выраженный иммунный ответ на каждый из O1A, O2, O6A и O25B и существенное увеличение титров ELISA после инъекции (30 суток после инъекции) по сравнению с титрами до инъекции (1 сутки) наблюдались только в вакцинированных группах (B_30 суток по сравнению с B_1 сутки), но не в группах плацебо (П_30 суток по сравнению с П_1 сутки). Анализ ответов показал, что медианные значения кратности увеличения в группе, получавшей по 4 мкг PS каждого серотипа, были выше, чем в дозовой группе, получавшей по 1 мкг PS каждого серотипа. Для серотипов O1A, O2, O6A и O25B медианные значения кратности увеличения EC_{50} при сравнении на 30 суток и на 1 сутки составили 4,6, 9,4, 4,9 и 5,9 соответственно. Величина и разброс кратности увеличения были выше в указанной дозовой группе, варьируя от 1 до 96 для серотипа O1A, от 1 до 165 для серотипа O2, от 0 до 61 для серотипа O6A и от 1 до 579 для серотипа O25B. Значения GMT на 30 суток составляли 9460, 27973, 4475 и 2164 для соответствующих 4 серотипов (табл. 8), что соответствовало приблизительно 4,9-9,8-кратному увеличению по сравнению со значениями GMT на 1 сутки.

Заключение.

Данные промежуточные результаты демонстрируют специфический иммунный ответ на вакцину у здоровых субъектов, которым вводили ExPEC4V в дозе 1 мкг PS каждого серотипа, и сравнительно более выраженное усиление иммунного ответа при введении ExPEC4V в дозе 4 мкг PS каждого серотипа в течение 30-дневного периода наблюдений. Отсутствие надлежащего изменения титров антител у 95 субъектов в группе плацебо в течение указанного периода свидетельствует о том, что гуморальный ответ у реципиентов ExPEC4V был опосредован вакциной и не был следствием внешнего воздействия бактерий ExPEC.

Эти результаты указывают на общее увеличение титров антител, связанное с более высокой дозой 4 мкг PS каждого серотипа по сравнению с дозой 1 мкг PS каждого серотипа. Хотя приведенные результаты свидетельствуют о более высоком разбросе титров в группе, получавшей более высокую дозу, по сравнению с группой, получавшей более низкую дозу, малое количество субъектов в группе, получавшей дозу 1 мкг, не позволяет дать интерпретацию наблюдавшихся различий. Кроме того, в каждой дозовой группе наблюдались различия в относительных титрах IgG к каждому из серотипов, при этом титры антител к антигену O25B были наиболее низкими (табл. 8).

Функциональный гуморальный ответ.

ОРК-тест использовали для оценки функционального гуморального ответа у женщин, принимающих участие в клиническом исследовании. У участников исследования брали сыворотку. Производили предварительную опсонизацию *E. coli* с использованием разведений сыворотки вакцинированных женщин, инкубировали с комплементом и фагоцитами (дифференцированные клетки HL60) и подсчитывали оставшиеся колониеобразующие единицы (CFU). Затем рассчитывали максимальный % уничтожения и

индекс опсонизации (ИО: разведение сыворотки, приводящее к гибели 50% *E. coli*). Для ОРК-теста выбирали *E. coli* ОС 24452 (серотип O1A), ОС 24453 (серотип O2), ОС 24454 (серотип O6A) и ОС 24176 (серотип O25B).

В сыворотке, полученной на 1 сутки и 30 суток, определяли функциональные антитела (выражали как индекс опсонизации (ИО), или концентрацию сыворотки, вызывающую 50% уменьшение числа колониеобразующих единиц *E. coli*) с помощью оптимизированного ОРК-теста с использованием выбранных штаммов ExPEC с серотипами O1A, O2, O6A или O25B, человеческого комплемента и фагоцитирующих клеток HL60. Титры функциональных антител к серотипу O25B включали в промежуточный анализ, основанный на предварительных оценках точности и воспроизводимости титров. Для всех серотипов титры функциональных антител определяли по показателям уничтожения *E. coli* в опсонофагоцитарном тесте с использованием программы NICE, разработанной Национальным институтом стандартов и технологии США, и программы Opsititer3, разработанной и лицензированной в университете Алабамы. Для промежуточного анализа опсонофагоцитарные титры определяли для 194 субъектов, включая 95 субъектов, получавших плацебо, 6 субъектов, получавших вакцину ExPEC4V 1 мкг PS (каждого серотипа), и 93 субъектов, получавших вакцину ExPEC4V 4 мкг PS (каждого серотипа).

Реципиенты плацебо (N = 95).

Как и в случае ELISA, опсонофагоцитарная реакция против серотипов ExPEC4V у реципиентов плацебо (95 субъектов) была сопоставима для сыворотки, взятой на 1 сутки и на 30 суток, при этом у большинства субъектов разница в значениях опсонофагоцитарных титров была незначительной или отсутствовала. Эти результаты указывают на стабильность титров функциональных антител в течение указанного периода времени у большинства или у всех субъектов, получавших плацебо.

1 мкг полисахарида каждого серотипа ExPEC4V (N = 6).

Шесть субъектов получали ExPEC4V в дозе 1 мкг PS каждого серотипа (суммарно 4 мкг PS). Анализ серотип-специфических иммунных ответов указанных субъектов на 30 суток показал, что доля субъектов с ≥ 2 -кратным увеличением общего количества антител к каждому серотипу составляла 33% (серотип O1A), 67% (серотип O2) и 0% (серотипы O6A и O25B). Для серотипов O1A и O2 доля субъектов с ≥ 4 -кратным увеличением титров антител снижалась до 17 и 50% соответственно.

Для серотипов O1A, O2, O6A и O25B медианные значения кратности увеличения титров антител при сравнении на 30 суток и на 1 сутки составили 1,0, 4,8, 0,9 и 1,0, соответственно. У отдельных субъектов кратность увеличения варьировала от 0,6 до 8,1 для серотипа O1, от 0,3 до 9,5 для серотипа O2, от 0,8 до 1,3 для серотипа O6A и от 0,5 до 1,5 для серотипа O25B. Средние геометрические значения титров (GMT) на 30 суток составляли 429, 1834, 1136 и 51 для соответствующих 4 серотипов, что соответствовало приблизительно 1,0-2,8-кратному увеличению по сравнению со значениями GMT на 1 сутки.

4 мкг полисахарида каждого серотипа ExPEC4V (N = 93).

Введение ExPEC4V в дозе 4 мкг PS каждого серотипа (суммарно 16 мкг PS) вызывало функциональный иммунный ответ на все серотипы ExPEC 4V. Анализ указанных субъектов на 30 суток показал, что доля субъектов с ≥ 2 -кратным увеличением значений ИО для каждого серотипа составляла 63% (серотип O1A), 90% (серотип O2), 33% (серотип O6A) и 55% (серотип O25B). Доля субъектов с ≥ 4 -кратным увеличением значений ИО варьировала от 20% (серотип O6A) до 82% (серотип O2); как и ожидалось, указанные доли были стабильно ниже, чем доли субъектов, у которых наблюдалось ≥ 2 -кратное увеличение.

Для серотипов O1A, O2, O6A и O25B медианные значения кратности увеличения ИО в ОРК-тесте при сравнении на 30 суток и на 1 сутки составили 3,5, 14,7, 1,4 и 2,5 соответственно. Кратность увеличения у субъектов в данной дозовой группе варьировала от 0,5 до более 292 для серотипов O1A и O2, от 0,3 до 26,4 для серотипа O6A и от 0,1 до 272,8 для серотипа O25B. Как показано на фиг. 5A-5Г, выраженный функциональный иммунный ответ на каждый из O1A, O2, O6A и O25B и существенное увеличение ИО после инъекции по сравнению с показателями до инъекции наблюдались только в вакцинированных группах, но не в группах плацебо.

Значения GMT на 30 суток составляли 950,5, 4132, 1542 и 414,7 для соответствующих 4 серотипов (табл. 9), что соответствовало приблизительно 2-14-кратному увеличению по сравнению со значениями GMT на 1 сутки. Эти результаты указывают, что для всех серотипов ExPEC 4V наблюдалось общее увеличение титров функциональных антител на 30 суток при дозе 4 мкг каждого серотипа PS.

Таблица 9

GMT и 95% доверительные интервалы титров функциональных антител с 1 суток (до вакцинации) до 30 суток по результатам ОРК-теста - исследование 1 фазы

		Индекс опсонизации ^a					
		Плацебо		ExPEC4V			
		N = 95		1 мкг полисахарида каждого серотипа ^b		4 мкг полисахарида каждого серотипа ^b	
				N = 6		N = 93	
Антитело		1 сутки	30 суток	1 сутки	30 суток	1 сутки	30 суток
O1A	GMT	156	161	288	429	192,5	950,5
	95% ДИ	126,4 –	131 –	94 – 881	203 – 910	158,9 –	692,8 –
		192,5	197,8			233,3	1304,1
O2	GMT	341,9	341,6	652	1834	301,3	4132
	95% ДИ	275,2 –	273,8 –	214 – 1980	425 – 7913	237,6 –	3034,9 –
		424,8	426,4			382,2	5625
O6A	GMT	692,6	715,1	1147	1136	790,6	1542
	95% ДИ	598,4 –	614,5 –	794 – 1657	749 – 1721	676,7 –	1263,7 –
		813,8	832,2			923,7	1181
O25B	GMT	86,6	97,3	52	51	114	414,7
	95% ДИ	58,4 –	64,3 –	27 – 103	28 – 92	74,6 –	273,5 – 629
		128,5	147,2			174,5	

Заключение.

Данные промежуточные результаты демонстрируют специфический функциональный иммунный ответ на вакцину в течение 30-дневного периода наблюдений у здоровых субъектов, которым вводили ExPEC4V в дозе по 4 мкг PS каждого серотипа. Отсутствие существенных изменений в титрах антител в течение указанного периода у 95 субъектов в группе плацебо (фиг. 5А-5Г и табл. 9) согласуются с результатами ELISA и подтверждают вывод о том, что вакцинация вызывала гуморальный ответ на все 4 серотипа ExPEC.

Промежуточные результаты по иммуногенности, полученные в исследовании 1 фазы в течение 30-дневного периода наблюдений при определении общего титра антител (ELISA) и титра функциональных антител (ОРК), демонстрируют специфический иммунный ответ на вакцину у здоровых субъектов, которым вводили ExPEC4V в дозе 1 мкг PS каждого серотипа, и сравнительно более выраженный иммунный ответ при введении ExPEC4V в дозе 4 мкг PS каждого серотипа. Сравнение кратности усиления специфического ответа на серотипы, наблюдавшегося в ELISA и в опсонофагоцитарном тесте, показало сопоставимый уровень ответов для серотипов O1A и O2 в обоих исследованиях, но несколько более низкие уровни опсонофагоцитарной реакции субъектов на серотипы O6A и O25B. Избирательное снижение опсонофагоцитарной реакции на серотипы O6A и O25B у некоторых субъектов изучается.

Следует отметить, что по результатам ОРК-теста GMT значения титра функциональных антител к антигену O25B ниже, чем к другим антигенам (O1A, O2 и O6A). ОРК-тест признан более предпочтительным суррогатным исследованием иммунной защиты, индуцированной вакциной на основе конъюгата PS против *Streptococcus pneumoniae* (Prevenar®), поскольку ELISA не позволяет дифференцировать низкоавидные антитела, не обладающие защитными свойствами, от высокоавидных защитных антител (Kim et al., Clin Diagn Lab Immunol. 2003 10(4):616-21).

Влияние на человека. Исследование фазы II.

На основании промежуточных результатов, полученных в исследовании фазы I, будет проведено исследование фазы II. Это рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое многоцентровое исследование планируется для оценки безопасности, переносимости и иммуногенности 5 различных доз у мужчин и женщин в стабильном состоянии здоровья, стратифицированных по возрасту: в возрасте от более или равно 18 до менее 50 лет (N=275) и в возрасте более или равно 50 лет (N=560). В исследовании фазы II будут применяться две композиции вакцины, т.е. препараты 1 и 2, приведенные в табл. 3-2, имеющие две различные концентрации полисахаридов, используемые действующие вещества будут такими же, как и в ExPEC4V. Более конкретно, композиция 1 содержит в своем составе 32, 32, 32, 32 мкг/мл О-антигенного полисахарида (PS) *E. coli* серотипов O1A, O2, O6A и O25B, соответственно, без адьюванта. Композиция 2 содержит в своем составе 16, 16, 16, 32 мкг/мл каждого О-антигена PS *E. coli* серотипов O1A, O2, O6A и O25B, соответственно, без адьюванта. В исследовании фазы II будут исследованы различные дозы и соотношения действующих веществ. Более конкретно, включенные в исследование субъекты будут рандомизированы на 6 групп: группы (i-v) для пяти различных доз экспериментальной вак-

цины и группа (vi) плацебо. Каждый субъект будет получать однократную дозу композиции 1, композиции 2 или плацебо в/м. Целевая доза О-антигенов *E. coli* O1A:O2:O6A:O25B на инъекцию композиции 1 или 2 составит 4:4:4:4 мкг (т.е. такая же, как наиболее высокая доза, использованная в исследовании фазы I, раскрытом выше), 4:4:4:8, 8:8:8:8, 8:8:8:16 и 16:16:16:16 мкг. Задачей исследования является оценка безопасности, иммуногенности и эффективности 5 различных доз четырехвалентной вакцины против *E. coli* на основе биоконъюгата.

Последовательности

Описание	Последовательность	SEQ ID NO.
Обезвреженный белок ЕРА, содержащий 4 оптимизированных последовательности N-гликозилирования	GSGGGDQNGATGSGGGKLAEEAFDLWNECAKAC VLDLKDGVSSRMSVDPADTNGQGVLYHSM VLEGGNDALKLAIDNALSITSDGLTIRLEGGVEP NKPVRYSYTRQARGSWSLNWLVPIGHEKPSNIK VFIHELNAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARD ATFFVRAHESNEMQPTLAISHAGVSVMQAQAP RREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNYLAQQR CNLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKNNNST PTVISHRLHFPEGGSLAALTAHQACHLPLEAFTR HRQPRGWEEQEQCGYPVQRLVALYLAARLSWN	1
	QVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLAL TLAAAESERFVRQGTGNDEAGAASADVSLTCP VAKDQNRKTEGECAGPADSGDALLERNYPTGAEF LGDGGDVSFSTRGTQNWTVRLLQAHQLEERG YVFVGYHGTFLAAQSIVFGGVRARSQDLDAIW RGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALL RVYVPRWSLPGFYRTGLTAAPEAAAGEVERLIG HPLPLRLDAITGPEEEGGRVTILGWPLAERTTVIP SAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQ PGKPPREDLKLGGGGDQNGAT	
Консенсусная последовательность N-гликозилирования	Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой, за исключением Pro	2
Консенсусная последовательность N-гликозилирования	Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой аминокислоты естественного происхождения, за исключением Pro	3

Раскрытые в настоящем описании воплощения приведены исключительно в качестве примеров, и специалисты в области техники смогут представить и, проводя рутинные эксперименты, осуществить различные варианты конкретных процедур, раскрытых в настоящем описании. Все эти эквиваленты входят в объем настоящего изобретения и охвачены приведенной ниже формулой изобретения.

Все цитируемые в настоящем описании источники (включая заявки на патенты, патенты и публикации) включены посредством ссылки во всей полноте, по всем назначениям и в том же объеме, как если бы для каждой отдельной публикации, патента или заявки на патент было непосредственно указано, что они включены посредством ссылки во всей полноте и по всем назначениям.

Список литературы

- (1) Johnson et al., *J Lab Clin Med.* 2002;139(3):155-162
- (2) Kohler et al., *Int J Med Microbiol.* 2011;301(8):642-647

- (3) Foxman, *Am J Med.* 2002;113 Suppl 1A:5S-13S;
- (4) Russo et al., *Microbes Infect.* 2003;5(5):449-456
- (5) Schito et al., 2009, *Int. J. Antimicrob. Agents* 34(5):407-413
- (6) Pitout et al., 2012, *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 10(10):1165-1176
- (7) Johnson et al., *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(1):546-550
- (8) Rogers et al., *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66(1):1-14
- (9) Banerjee et al., *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(9):4997-5004
- (10) Stenutz et al., *FEMS Microbial Rev.* 2006; 30: 382-403
- (11) Russo et al., *Vaccine.* 2007; 25: 3859-3870
- (12) Lipsitch, *Emerging Infectious Diseases*; 1999, 5:336-345
- (13) WO 2006/119987
- (14) WO 2009/104074
- (15) International Patent Application No. PCT/EP2015/053739 (published as WO 2015/124769)
- (16) Ihssen et al., 2010, *Microbial Cell Factories* 9, 61
- (17) Lukac et al., *Infect Immun*, 56: 3095-3098, 1988
- (18) Ho et al., *Hum Vaccin*, 2:89-98, 2006
- (19) Pawlowski et al., 2000, *Vaccine* 18:1873-1885
- (20) Robbins et al., 2009, *Proc Natl Acad Sci USA* 106:7974-7978
- (21) Saraswat et al., 2013, *Biomed. Res. Int.* ID#312709 (p. 1-18)
- (22) WO/2009/104074
- (23) Datsenko and Wanner (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6640-6645
- (24) WO 2014/057109
- (25) Laurentin and Edwards, 2003, *Anal Biochem* 315, 143-145
- (26) Kim et al., *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 10(4): 616-21

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для индуцирования иммунного ответа против внекишечной патогенной *E.coli* (ExPEC), содержащая полисахаридный антиген *E. coli* O25B в первой концентрации и каждый из антигенного полисахарида *E. coli* O1A, антигенного полисахарида *E. coli* O2 и антигенного полисахарида *E. coli* O6A во второй концентрации, где отношение первой концентрации к второй концентрации составляет 2:1, каждый из антигенных полисахаридов *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A независимо ковалентно связан с белком-носителем, представляющим собой обезвреженный экзотоксин A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA), и первая концентрация составляет от 10 до 36 мкг/мл.

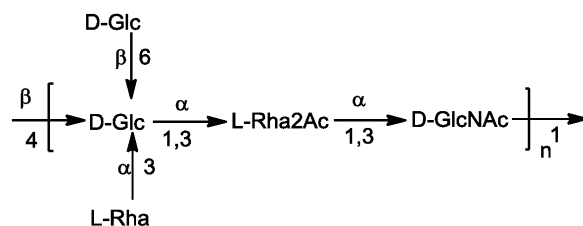
2. Композиция по п.1, содержащая антигенные полисахариды *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A в соотношении доз 2:1:1:1, где первая концентрация составляет 10, 16, 24, 32 или 36 мкг/мл.

3. Композиция по любому из пп.1 или 2, содержащая 16 мкг/мл антигенного полисахарида O25B.

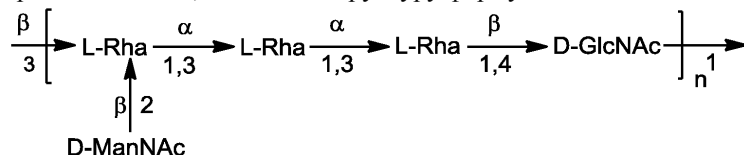
4. Композиция по любому из пп.1 или 2, содержащая 32 мкг/мл антигенного полисахарида O25B.

5. Мультивалентная иммунная композиция для индуцирования иммунного ответа против внекишечной патогенной *E. coli* (ExPEC), содержащая полисахаридный антиген *E. coli* O25B в первой дозе от 5 до 18 мкг и каждый из антигенного полисахарида *E. coli* O1A, антигенного полисахарида *E. coli* O2 и антигенного полисахарида *E. coli* O6A в дозе, которая независимо составляет 50% от первой дозы, где каждый из антигенных полисахаридов *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A независимо ковалентно связан с белком-носителем, представляющим собой обезвреженный экзотоксин A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA).

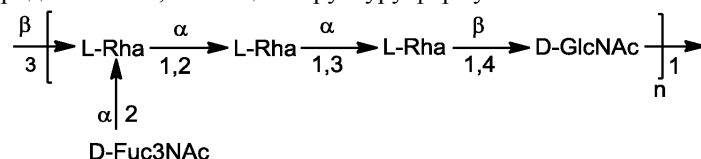
6. Мультивалентная иммунная композиция для индуцирования иммунного ответа против внекишечной патогенной *E.coli* (ExPEC), содержащая антигенный полисахарид *E. coli* O25B, имеющий структуру формулы O25B'



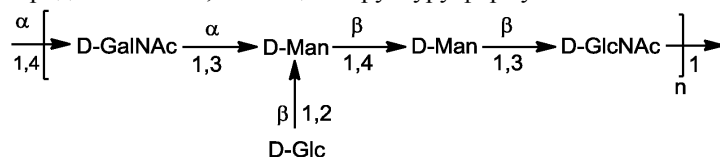
антигенный полисахарид *E. coli* O1A, имеющий структуру формулы O1A'



антигенный полисахарид *E. coli* O2, имеющий структуру формулы O2'



и антигенный полисахарид *E. coli* O6A, имеющий структуру формулы O6A'



где n независимо представляет собой целое число от 5 до 25 и каждый из антигенных полисахаридов *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A независимо ковалентно связан с белком-носителем, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и концентрации антигенных полисахаридов *E. coli* O25B, O1A, O2, O6A в композициях составляют, соответственно, 16:8:8:8 мкг/мл или 32:16:16:16 мкг/мл.

7. Способ индуцирования иммунного ответа против внекишечной патогенной *E. coli* (ExPEC) у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту композиции по любому из пп.1-6.

8. Способ индуцирования иммунного ответа на внекишечную патогенную *E. coli* (ExPEC) у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту антигенного полисахарида *E. coli* O25B в первом эффективном количестве и каждого из антигенного полисахарида *E. coli* O1A, антигенного полисахарида *E. coli* O2 и антигенного полисахарида *E. coli* O6A во втором эффективном количестве, где отношение первого эффективного количества к второму эффективному количеству составляет 2:1, каждый из антигенных полисахаридов *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A независимо ковалентно связан с белком-носителем, представляющим собой обезвреженный экзотоксин A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA), и первое эффективное количество составляет от 5 до 18 мкг на введение.

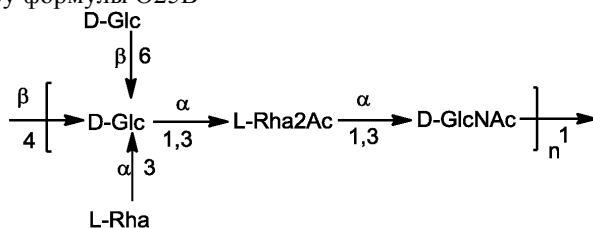
9. Способ по п.8, где антигенные полисахариды *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A вводят в соотношении доз 2:1:1:1, где первое эффективное количество составляет 6, 8, 10, 12, 14, 16 или 18 мкг на введение.

10. Способ по любому из пп.7-9, где вводят 8 мкг антигенного полисахарида *E. coli* O25B на введение.

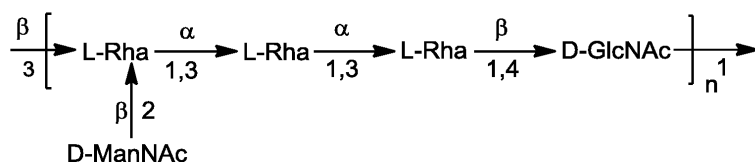
11. Способ по любому из пп.7-9, где вводят 16 мкг антигенного полисахарида *E. coli* O25B на введение.

12. Способ по любому из пп.7-11, где антигенные полисахариды *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A вводят вместе в составе одной композиции.

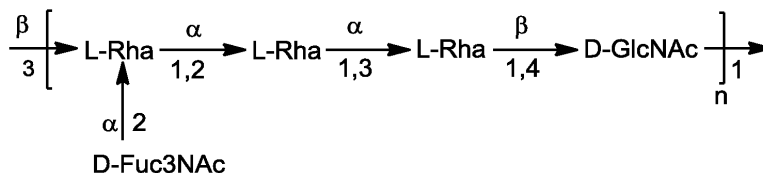
13. Способ индуцирования иммунного ответа против внекишечной патогенной *E. coli* (ExPEC) у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту антигенного полисахарида *E. coli* O25B, имеющего структуру формулы O25B'



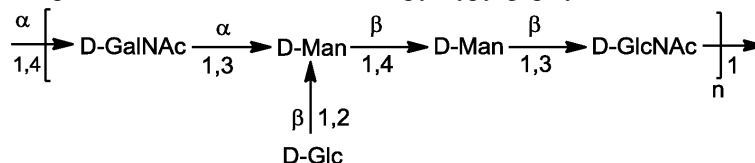
антигенного полисахарида *E. coli* O1A, имеющего структуру формулы O1A'



антигенного полисахарида-E. coli O2, имеющего структуру формулы O2'



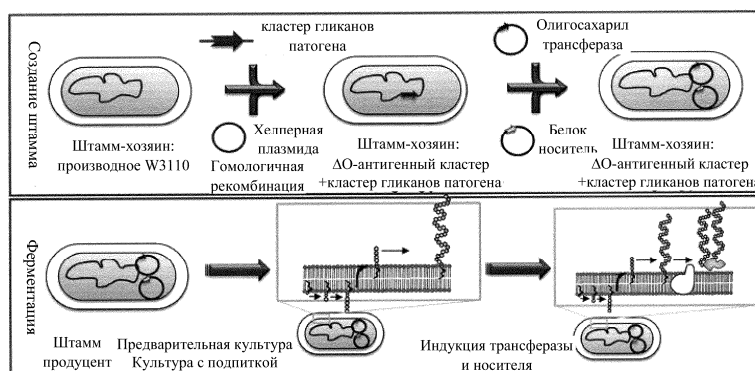
и антигенного полисахарида E. coli O6A, имеющего структуру формулы O6A'



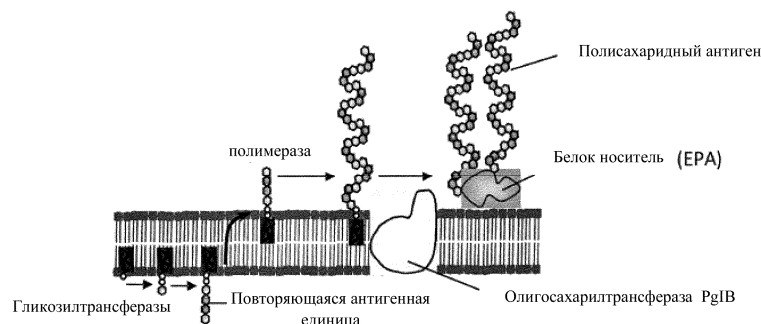
где n независимо представляет собой целое число от 5 до 25, каждый из антигенных полисахаридов E. coli O25B, O1A, O2 и O6A независимо ковалентно связан с белком-носителем, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и антигенные полисахариды E. coli O25B, O1A, O2 и O6A вводят в соотношении 8:4:4:4 мкг или 16:8:8:8 мкг на введение.

14. Способ по любому из пп.7-13, где иммунный ответ ограничивает тяжесть или предупреждает вызванное ExPEC серотипами O1A, O2, O6A и O25B инвазивное заболевание ExPEC у человека, подверженного риску, например, где взрослый человек имеет инвазивные заболевания ExPEC, выбранное из группы, состоящей из инфекции мочевыводящих путей, инфекции области хирургического вмешательства, инфекции брюшной полости или таза, пневмонии, нозокомиальной пневмонии, остеомиелита, паникулита, сепсиса, бактериемии, раневой инфекции, пиелонефрита, менингита, неонатального менингита, перитонита, холангита, инфекции мягких тканей, пиомиозита и септического артрита, или подвержен риску его возникновения.

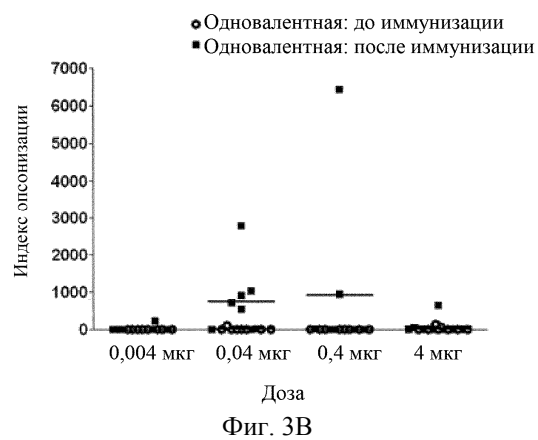
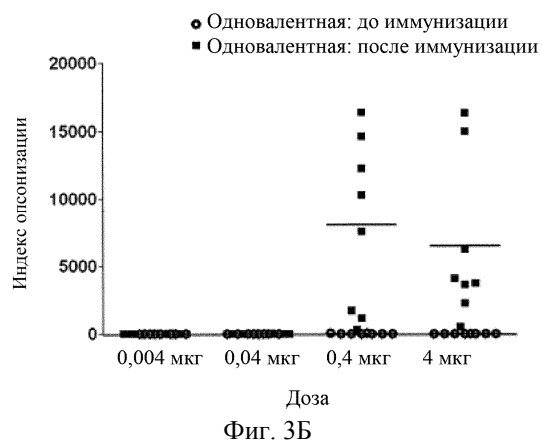
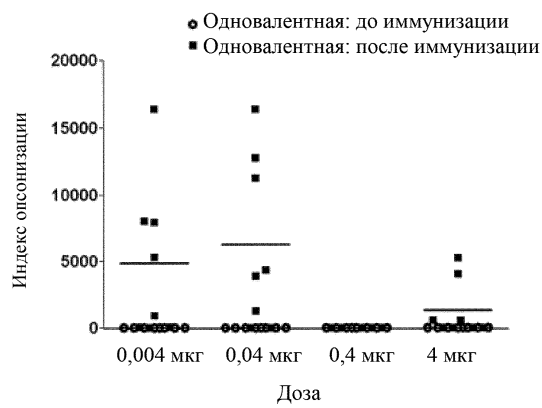
15. Способ получения композиции по любому из пп.1-6, включающий объединение антигенного полисахарида E. coli O25B, антигенного полисахарида E. coli O1A, антигенного полисахарида E. coli O2 и антигенного полисахарида E. coli O6A с получением таким образом композиции.

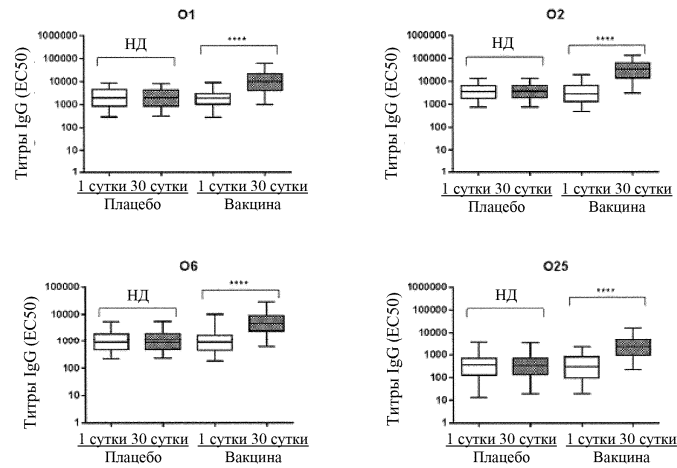


Фиг. 1



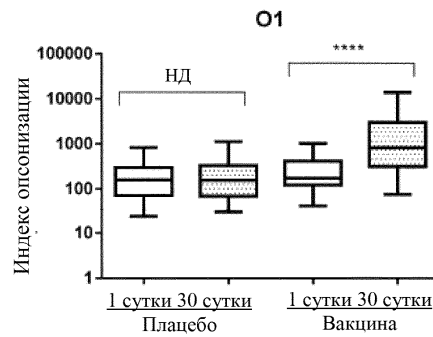
Фиг. 2





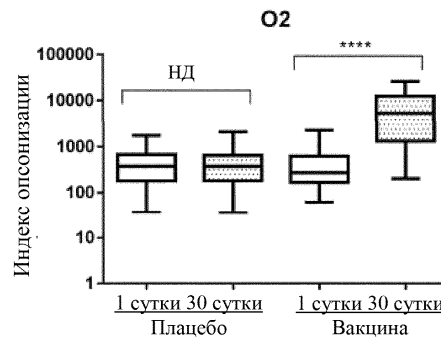
Парный t критерий; НД- не достоверно; **** P<0,0001; медиана, 5% и 95% проценти

Фиг. 4



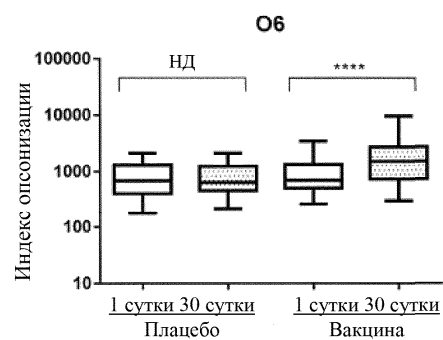
Парный t критерий log-трансформированных значений; НД- не достоверно; **** P<0,0001; медиана, 5% и 95% проценти

Фиг. 5А



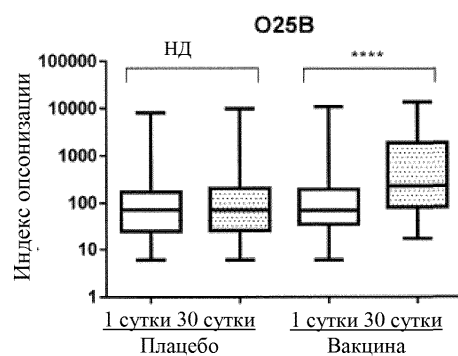
Парный t критерий log-трансформированных значений; НД- не достоверно; **** P<0,0001; медиана, 5% и 95% проценти

Фиг. 5Б



Парный t критерий log-трансформированных значений; НД- не достоверно;
**** P<0,0001; медиана, 5% и 95% проценти

Фиг. 5В



Парный t критерий log-трансформированных значений; НД- не достоверно;
**** P<0,0001; медиана, 5% и 95% проценти

Фиг. 5Г

