

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290804** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.08.18

(51) Int. Cl. *C07K 14/245* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.10.28

(54) **КОМПОЗИЦИИ ESCHERICHIA COLI И ИХ СПОСОБЫ**

(31) 62/929,505; 63/045,038; 63/081,629

(32) 2019.11.01; 2020.06.26; 2020.09.22

(33) US

(86) PCT/IB2020/060081

(87) WO 2021/084429 2021.05.06

(71) Заявитель:
ПФАЙЗЕР ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Андерсон Анналиеса Сибил (US),
Чэнь Вэй (CN), Чорро Лорен Оливер,
Чу Лин, Доналд Роберт Г.К., Гриффор
Мэттью Кёртис, Гу Цзяньсинь, Гуань
Цзецян, Ким Чжин-Хван, Кодала
Сринивас, Ломберк Скотт Эллис,
Лотвин Джейсон Арнольд, Мерчант
Нишитх, Моран Джастин Кейт, Пан
Розалинд, Прасад Аввари Кришна,
Раппен Марк Эдвард, Сингх Суддхам,
Стэд Девид Роберт, Такане Карен
Киёко, Че Йе (US)

(74) Представитель:

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) В одном аспекте изобретение относится к полипептиду, имеющему происхождение из E.coli, и его фрагменту, включая композиции и их способы. Также раскрыты композиции, включающие полипептид, имеющий происхождение из E.coli, и его фрагмент; и молекулы модифицированного O-полисахарида, имеющего происхождение из липополисахаридов E.coli, и их конъюгаты. В еще одном аспекте раскрыты клетки-хозяева млекопитающих, включающие последовательность(и), кодирующую(ие) полипептид, имеющий происхождение из E.coli, или его фрагменты.

A1

202290804

202290804

A1

КОМПОЗИЦИИ *ESCHERICHIA COLI* И ИХ СПОСОБЫ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

В данной заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент US 62/929505, поданной 1 ноября 2019, предварительной заявки на патент US 63/045038, поданной 26 июня 2020 и предварительной заявки на патент US 63/081629, поданной 22 сентября 2020. Содержание каждой из упомянутых заявок включено в данное описание во всей полноте путем ссылки.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Данная заявка подана в электронном виде через EFS-Web и включает поданный в электронном виде перечень последовательностей в формате .txt. Файл .txt содержит перечень последовательностей с названием «PC072517_03_SEQ_List_ST25.txt», созданный 18 сентября 2020 размером 152 кб. Перечень последовательностей, содержащийся в указанном файле .txt, является частью описания и включен в него во всей полноте путем ссылки.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение относится к композициям *Escherichia coli* и их способам.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Адгезины бактериальных фимбрий FimH и FmlH позволяют *Escherichia coli* использовать различное микроокружение мочевыводящих путей благодаря распознаванию специфических гликопротеинов клеток-хозяев. FimH связывается с рецепторами маннозилированного уроплакина в уроэпителии, тогда как FmlH связывается с галактозой или N-ацетилглюкозаминавыми O-гликанами на белках поверхности эпителия в почках и воспаленном мочевом пузыре. FimH фимбрий также играет роль в колонизации кишечника энтеротоксигенными *E.coli* (ETEC) и инвазивными *E.coli* с множественной лекарственной устойчивостью за счет связывания с высокоманнозилированными белками кишечного эпителия.

Полноразмерный FimH состоит из двух доменов: N-концевого лектинового домена и C-концевого пилинового домена, которые соединены коротким линкером. Лектиновый домен FimH содержит домен распознавания углеводов, который отвечает за связывание с маннозилированным уроплакином 1a на поверхности уротелиальных

клеток. Пилиновый домен прикреплен к ядру пилия через донорскую цепь последующей субъединицы FimG, этот процесс носит название комплементации донорской цепью.

Конформация и лиганд-связывающие свойства лектинового домена FimH находятся под аллостерическим контролем пилинового домена FimH. В статических условиях взаимодействие между двумя доменами полноразмерного FimH стабилизирует лектиновый домен в состоянии низкой аффинности к мономаннозе (например, K_d приблизительно 300 мкМ), которое отличается неглубоким связывающим карманом. Связывание с лигандом маннозой индуцирует конформационное изменение, приводящее к состоянию средней аффинности, в котором лектиновый и пилиновый домены остаются в тесном контакте. Однако при напряжении сдвига лектиновый и пилиновый домены разделяются, тем самым индуцируя высокоаффинное состояние (например, K_d менее 1,2 мкМ).

Из-за отсутствия отрицательной аллостерической регуляции, осуществляемой пилиновым доменом, изолированный лектиновый домен FimH закрепляется в высокоаффинном состоянии. Изолированный рекомбинантный лектиновый домен, закрепленный в высокоаффинном состоянии, демонстрирует высокую стабильность. При этом закрепление адгезина в конформации с низким связыванием индуцирует продуцирование ингибирующих адгезию антител. Следовательно, стабилизация лектинового домена в низкоаффинном состоянии представляет интерес.

Дополнительный интерес вызывают способы экспрессии FimH с высоким выходом, достаточным для того, чтобы создать продукт. Препятствием в разработке композиций, включающих FimH, является низкий выход, который достигается при экспрессии FimH в его нативном состоянии в периплазме *E. coli*. В лабораторном масштабе типичный выход составляет 3-5 мг/л для очищенного комплекса FimCH и 4-10 мг/л для FimH(LD), что ниже уровней, которые считаются подлежащими масштабированию для получения материала для клинических исследований. Конформация FimH *in vivo* отличается от конформации, приобретаемой рекомбинантным белком в очищенной форме. В целом, FimH обладает нативной конформацией, которая по меньшей мере отчасти определяется взаимодействием FimH *in vivo* с его периплазматическим белком шапероном под названием FimC.

Рекомбинантное продуцирование FimH остается непростой задачей. Экспрессия и очистка белка не являются рутинным процессом.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение, направленное на решение указанных и других задач, относится к композициям и способам их применения для получения рекомбинантных белков адгезинов и для выработки иммунных ответов против серотипов *E. coli*.

В одном аспекте изобретение относится к рекомбинантной клетке млекопитающего, включающей полинуклеотид, кодирующий полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент. В некоторых воплощениях полинуклеотид кодирует полипептид, имеющий происхождение из полипептида Н фимбрий (fimH) *E. coli*, или его фрагмент. В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из FimH *E. coli*, или его фрагмент включает остаток фенилаланина на N-конце полипептида.

В одном аспекте изобретение относится к способу получения полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента, в рекомбинантной клетке млекопитающего. Способ включает культивирование рекомбинантной клетки млекопитающего в подходящих условиях, тем самым экспрессируя полипептид или его фрагмент; и сбор полипептида или его фрагмента. В некоторых воплощениях способ дополнительно включает очистку полипептида или его фрагмента. В некоторых воплощениях выход полипептида составляет по меньшей мере 0,05 г/л. В некоторых воплощениях выход полипептида составляет по меньшей мере 0,10 г/л.

В одном аспекте изобретение относится к композиции, включающей полипептид, идентичный по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29 или любой их комбинации.

В другом аспекте изобретение относится к композиции, включающей полипептид, имеющий по меньшей мере n последовательных аминокислот из любой из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29, где n равно 7 или более (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 или более). В некоторых воплощениях композиция дополнительно включает сахарид, выбранный из любой из формул в **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, предпочтительно Формулы O1A, Формулы O1B, Формулы O2, Формулы O6 и Формулы O25B, где n представляет собой целое число

от 1 до 100, предпочтительно от 31 до 100.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **ФИГ. 1А-1Н** показаны аминокислотные последовательности, включающие аминокислотные последовательности приведенных в качестве примера полипептидов, имеющих происхождение из *E. coli*, или их фрагментов; и аминокислотные последовательности приведенных в качестве примера последовательностей wzzB.

На **ФИГ. 2А-2Т** показаны карты приведенных в качестве примера экспрессирующих векторов.

На **ФИГ. 3** показаны результаты экспрессии и очистки.

На **ФИГ. 4** показаны результаты экспрессии и очистки.

На **ФИГ. 5** показаны результаты экспрессии.

На **ФИГ. 6А-6С** показаны SEC (выделенные методом эксклюзионной и аффинной хроматографии) пулы pSB02083 и pSB02158; в том числе выход.

На **ФИГ. 7** показаны результаты экспрессии конструкции pSB2198 закрепленного мутанта FimH dscG.

На **ФИГ. 8** показаны результаты экспрессии pSB2307 FimH dscG дикого типа.

На **ФИГ. 9А-9С** показаны структуры О-антигенов, синтезированных в полимеразо-зависимом пути с четырьмя или менее остатками в остове.

ФИГ. 10А-10В: На **ФИГ. 10А** показаны структуры О-антигенов, синтезированных в полимеразо-зависимом пути с пятью или шестью остатками в остове; На **ФИГ. 10В** показаны О-антигены, предположительно синтезируемые в пути, зависимом от ABC-переносчика.

ФИГ. 11 показан смоделированный сканирующий мутагенез с заменой Phe1 другими аминокислотами, имеющими алифатические гидрофобные боковые цепи, например Ile, Leu и Val, которые способны стабилизировать белок FimH и обеспечивать связывание маннозы.

ФИГ. 12А-12В показаны плазмиды: репликон плазмиды pUC, 500-700х копий на клетку, регулятор длины цепи (**Фиг. 12А**); и репликон плазмиды P15a, 10-12х копий на клетку, оперон О-антигена (**Фиг. 12В**).

ФИГ. 13А-13В показано изменение длины цепи О-антигена в штаммах серотипов O25a и O25b в результате экспрессии в плаزمидях гетерологичных регуляторов длины цепи wzzB и *fepE*. Показана генетическая комплементация экспрессии LPS (липополисахарид) в трансформированных плазмидями штаммах O25K5H1 (O25a) и

GAR2401 (O25b) с нокаутом *wzzB*. В левой части **Фиг. 13А** показаны профили LPS трансформированных плазмидами O25a O25K5H1Δ*wzzB*; а в правой части - аналогичные профили трансформантов O25b GAR 2401Δ*wzzB*. Результаты иммуноблоттинга, где вторую копию геля инкубировали с O25-специфической сывороткой (Statens Serum Institut), показаны на **Фиг. 13В**. Дорожки 1-7 относятся фоновому генотипу O25a Δ*wxxB* (нокаут); дорожки 8-15 относятся к фоновому генотипу O25b 2401 Δ*wzzB* (нокаут).

На **ФИГ. 14** показана экспрессия длинноцепочечного O-антигена в хозяине O25K5H1Δ*wzzB*, обеспечиваемая плазмидами с *ferE* из *E. coli* и *Salmonella*.

На **ФИГ. 15** показано, что экспрессия *ferE Salmonella* создает LPS с длинным O-антигеном у различных клинических изолятов.

На **ФИГ. 16А-16В** показана опосредованная плазмидами индуцируемая арабинозой экспрессия LPS с длинным O-антигеном O25b в штамме-хозяине с нокаутом O-антигена O25b. Результаты SPS PAGE (электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия) показаны на **Фиг. 16А**, а результаты иммуноблота O25 показаны на **Фиг. 16В**, где дорожка 1 соответствует Клону 1 в отсутствие арабинозы; дорожка 2 соответствует Клону 1 с 0,2% арабинозы; дорожка 3 соответствует Клону 9 в отсутствие арабинозы; дорожка 4 соответствует Клону 9 с 0,2% арабинозы; дорожка 5 соответствует стандарту LPS *E. coli* O55, а дорожка 6 соответствует стандарту LPS *E. coli* O111, как на **Фиг. 16А**, так и на **Фиг. 16В**.

На **ФИГ. 17** показана опосредованная плазмидами индуцируемая арабинозой экспрессия LPS с длинным O-антигеном в общем штамме-хозяине.

На **ФИГ. 18** показана экспрессия LPS с O-антигеном O25 в экспериментальных биотехнологических штаммах.

На **ФИГ. 19А-19В** показаны профили SEC и свойства коротких (**Фиг. 19А**, штамм 1 O25b wt 2831) и длинных O-антигенов O25b (**Фиг. 19В**, штамм 2 O25b 2401Δ*wzzB* / LT2 *FerE*), выделенных из штаммов GAR2831 и '2401Δ*wzzB* / *ferE*.

На **ФИГ. 20А-20В** показана схема вакцинации у кроликов: (**FIG.20А**) Информация, касающаяся схемы вакцинации кроликов в исследовании 1 VAC-2017-PRL-EC-0723; (**Фиг. 20В**) схема вакцинации кроликов в исследовании 2 VAC-2018-PRL-EC-077.

На **ФИГ. 21А-21С** показаны ответы IgG (имуноглобулин G) на гликоконъюгат O25b, где —●— означает результаты до иммунизации; —■— 1 забор крови (6 неделя); —▲—

2 забор крови (8 неделя); –◆– 3 забор крови (12 неделя). На **ФИГ. 21А** показаны результаты у кролика 1-3 (средняя активация); На **ФИГ. 21В** показаны результаты у кролика 2-3 (низкая активация); На **ФИГ. 21С** показаны результаты у кролика 3-1 (высокая активация).

На **ФИГ. 22А-22F** – показаны ответы IgG на гликоконъюгат длинного O-антигена O25b, т.е. конъюгат O25b-CRM₁₉₇ с низкой активацией (**Фиг. 22D-22F**, где –●– представляет результаты у кролика 2-1 до иммунизации, –■– антисыворотка кролика 2-1 на 12 неделе) в сравнении с неконъюгированным полисахаридом, т.е. свободным полисахаридом O25b (**Фиг. 22А-22С**, где –●– представляет результаты у кролика А-1 до иммунизации, –■– антисыворотка кролика А-1 на 6 неделе, –▲– антисыворотка кролика А-1 на 8 неделе). Следует отметить, что значения MFI (средняя интенсивность флуоресценции) нанесены на логарифмическую шкалу, чтобы подчеркнуть различия между уровнем антител до и после иммунизации в диапазоне менее 1000 MFI. На **ФИГ. 22А** показаны результаты у кролика А-1 (неконъюгированный полисахарид); На **ФИГ. 22В** показаны результаты у кролика А-3 (неконъюгированный полисахарид); На **ФИГ. 22С** показаны результаты у кролика А-4 (неконъюгированный полисахарид); На **ФИГ. 22D** показаны результаты у кролика 2-1 (низкая активация); На **ФИГ. 22Е** показаны результаты у кролика 2-2 (низкая активация); На **ФИГ. 22F** показаны результаты у кролика 2-3 (низкая активация).

На **ФИГ. 23А-23С** показана поверхностная экспрессия нативного и длинного O-антигена O25b, которую детектировали с помощью антисыворотки к O25b. На **ФИГ. 23А** показаны результаты, где –●– представляет результаты с O25b 2831 и антисывороткой PD3; –■– представляет результаты с O25b 2831 wt и сывороткой до иммунизации; –▲– представляет результаты с O25b 2831 / ferE и антисывороткой PD3a; –▼– представляет результаты с O25b 2831 / ferE и сывороткой до иммунизации. На **ФИГ. 23В** отражены результаты, где –●– представляет результаты с O25b 2401 и антисывороткой PD3; –■– представляет результаты O25b 2401 и сывороткой до иммунизации; –▲– представляет результаты с O25b 2401 / ferE и антисывороткой PD3; –▼– представляет результаты O25b 2401 / ferE и сывороткой до иммунизации. На **ФИГ. 23С** показаны результаты, где –●– представляет результаты с *E. coli* K12 и антисывороткой PD3; а –■– представляет результаты с *E. coli* K12 и сывороткой до иммунизации.

На **ФИГ. 24** показан общий вид структур углеводного остова олигосахаридов

внешней коровой части у пяти известных хемотипов. Все гликозы находятся в α -аномерной конфигурации, если не указано иное. Гены, чьи продукты катализируют образование каждой связи, обозначены пунктирными стрелками. Звездочкой отмечен остаток корового олигосахарида, к которому присоединяется O-антиген.

На **ФИГ. 25** показано, что неконъюгированный свободный полисахарид O25b не является иммуногенным (dLIA), где \bullet — представляет результаты 18 недели (1 неделя = PD4) с антисывороткой 4-1; \blacksquare — представляет результаты 18 недели (1 неделя = PD4) с антисывороткой 4-2; \blacktriangle — представляет результаты 18 недели (1 неделя = PD4) с антисывороткой 5-1; \blacktriangledown — представляет результаты 18 недели (1 неделя = PD4) с антисывороткой 5-2; $*$ — представляет результаты 18 недели (1 неделя = PD4) с антисывороткой 6-1; \blacktriangleleft — представляет результаты 18 недели (1 неделя = PD4) с антисывороткой 6-2.

На **ФИГ. 26А-26С** показаны графики, иллюстрирующие специфичность сыворотки кролика, иммунизированного конъюгатом O25b RAC, при определении ОРА (опсонофагоцитарных) титров с комплементом крольчонка (BRC). На **ФИГ. 26А** показаны ОРА титры сыворотки кролика 2-3 до иммунизации (\bullet —) и сыворотки после иммунизации на 13 неделе (\blacksquare —). На **ФИГ. 26В** показаны ОРА титры сыворотки кролика 1-2 до иммунизации (\bullet —) и сыворотки после иммунизации на 19 неделе (\blacksquare —). На **ФИГ. 26С** показана специфичность опсонофагоцитарных титров у кролика 1-2 на 19 неделе, где ОРА активность сыворотки иммунизированного кролика 1-2 блокируется предварительной инкубацией с 100 μ г/мл очищенного неконъюгированного полисахарида длинного O-антигена O25b, где \blacksquare —представляет результаты в сыворотке иммунизированного кролика 1-2 на 19 неделе; \blacktriangledown — представляет результаты кролика 1-2 на 19 неделе с длинным O-антигеном R1.

ФИГ. 27А-27С: На **ФИГ. 27А** проиллюстрирована приведенная в качестве примера схема введения. На **ФИГ. 27В** и **ФИГ. 27С** показан график, отражающий уровни IgG к O-антигену O25b, индуцированные неконъюгированным полисахаридом длинного O-антигена O25b (**ФИГ. 27В**, свободный полисахарид O25b (2 мкг)) и производный гликоконъюгат длинного O-антигена O25b RAC/DMSO (**ФИГ. 27С**, O25b-CRM₁₉₇ RAC длинный (2 мкг)), где \dots — (пунктирная линия) представляет уровень IgG к O25b у наивных CD-1.

На **ФИГ. 28А-28В** показаны графики, демонстрирующие ОРА иммуногенность

гликоконъюгатов RAC, eTEC длинного O25b и конъюгированных одним концом гликоконъюгатов после введения 2 (ФИГ. 28А) и после введения 3 (ФИГ. 28В), где –○– представляет результаты с 2 мкг конъюгированного одним концом короткого; –●– 2 мкг конъюгированного одним концом длинного; –▲– 2 мкг конъюгированного с применением RAC/DMSO длинного; –▼– 2 мкг конъюгированного с применением eTEC длинного; * фоновый контроль (n=20). Частота ответа на лечение представляет собой % мышей с титрами, более чем в 2 раза превышающими исходный уровень до вакцинации.

На ФИГ. 29 показан график, демонстрирующий ОРА иммуногенность при использовании eTEC и измененные уровни активации полисахарида. Частота ответа на лечение представляет собой % мышей с титрами, более чем в 2 раза превышающими исходный уровень до вакцинации.

На ФИГ. 30А-30В проиллюстрирована приведенная в качестве примера схема введения (ФИГ. 30А); и график, отображающий защиту мышей, иммунизированных дозами eTEC конъюгатов от летального заражения изолятом *E. coli* O25b (ФИГ. 30В), где –◇– представляет конъюгат eTEC с длинной цепью и 17% активацию; –△– представляет конъюгат eTEC с длинной цепью и 10% активацию; –▽– представляет конъюгат eTEC с длинной цепью и 4% активацию; –□– представляет полисахарид O25b; –○– представляет невакцинированные контроли.

На ФИГ. 31 показана схема, иллюстрирующая пример получения присоединенных одним концом конъюгатов, где процесс конъюгирования включает избирательную активацию 2-кето-3-дезоксооктановой кислоты (KDO) дисульфид аминным линкером после демаскировки тиоловой функциональной группы. Затем KDO конъюгируют с активированным бромом белком CRM₁₉₇, как показано на ФИГ. 31 (получение присоединенных одним концом конъюгатов).

На ФИГ. 32А-32В изображены блок-схемы приведенных в качестве примеров процессов активации (ФИГ. 32А) и конъюгирования (ФИГ. 32В), использованных в получении гликоконъюгата *E. coli* с CRM₁₉₇.

ИДЕНТИФИКАТОРЫ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

В SEQ ID NO: 1 приведена аминокислотная последовательность специфического к D-маннозе адгезина фимбрий типа 1 дикого типа [*Escherichia coli* FimH J96].

В SEQ ID NO: 2 Приведена аминокислотная последовательность фрагмента FimH, соответствующего аминокислотным остаткам 22-300 SEQ ID NO: 1 (зрелого белка

FimH).

В SEQ ID NO: 3 Приведена аминокислотная последовательность лектинового домена FimH.

В SEQ ID NO: 4 Приведена аминокислотная последовательность пилинового домена FimH.

В SEQ ID NO: 5 приведена аминокислотная последовательность полипептида, имеющего происхождение из FimH *E. coli* (pSB02198 - FimH сигнальный пептид mIgK / F22..Q300 J96 FimH N28S V48C L55C N91S N249Q / 7 АК линкер / FimG A1..K14 / GGHis8 в pcDNA3.1(+))

В SEQ ID NO: 6 приведена аминокислотная последовательность полипептида, имеющего происхождение из FimH *E. coli* (pSB02307 - FimH сигнальный пептид mIgK / F22..Q300 J96 FimH N28S N91S N249Q / His8 в pcDNA3.1(+))

В SEQ ID NO: 7 приведена аминокислотная последовательность фрагмента полипептида, имеющего происхождение из FimH *E. coli* (конструкция pSB02083 лектинового домена FimH дикого типа)

В SEQ ID NO: 8 приведена аминокислотная последовательность фрагмента полипептида, имеющего происхождение из FimH *E. coli* (pSB02158 закрепленный мутант лектинового домена FimH)

В SEQ ID NO: 9 приведена аминокислотная последовательность фрагмента полипептида, имеющего происхождение из FimG *E. coli* (FimG A1..K14)

В SEQ ID NO: 10 приведена аминокислотная последовательность фрагмента полипептида, имеющего происхождение из FimC *E. coli*.

В SEQ ID NO: 11 приведена аминокислотная последовательность линкера из 4 аминокислот.

В SEQ ID NO: 12 приведена аминокислотная последовательность линкера из 5 аминокислот.

В SEQ ID NO: 13 приведена аминокислотная последовательность линкера из 6 аминокислот.

В SEQ ID NO: 14 приведена аминокислотная последовательность линкера из 7 аминокислот.

В SEQ ID NO: 15 приведена аминокислотная последовательность линкера из 8 аминокислот.

В SEQ ID NO: 16 приведена аминокислотная последовательность линкера из 9

аминокислот.

В SEQ ID NO: 17 приведена аминокислотная последовательность линкера из 10 аминокислот.

В SEQ ID NO: 18 приведена аминокислотная последовательность сигнальной последовательности FimH J96.

В SEQ ID NO: 19 приведена аминокислотная последовательность сигнального пептида SEQ ID NO: 5 (pSB02198 - FimH сигнальный пептид mIgK / F22..Q300 J96 FimH N28S V48C L55C N91S N249Q / 7 АК линкер / FimG A1..K14 / GGHis8 в pcDNA3.1(+)).

В SEQ ID NO: 20 приведена аминокислотная последовательность полипептида, имеющего происхождение из FimH *E. coli*, согласно SEQ ID NO: 5 (зрелый белок pSB02198 - FimH сигнальный пептид mIgK / F22..Q300 J96 FimH N28S V48C L55C N91S N249Q / 7 АК линкер / FimG A1..K14 / GGHis8 в pcDNA3.1(+)).

В SEQ ID NO: 21 приведена аминокислотная последовательность полипептида, имеющего происхождение из FimG *E. coli*.

В SEQ ID NO: 22 приведена аминокислотная последовательность сигнального пептида SEQ ID NO: 6 (pSB02307 - FimH сигнальный пептид mIgK / F22..Q300 J96 FimH N28S N91S N249Q / His8 в pcDNA3.1(+)).

В SEQ ID NO: 23 приведена аминокислотная последовательность полипептида, имеющего происхождение из FimH *E. coli*, согласно SEQ ID NO: 6 (зрелый белок FimH сигнальный пептид mIgK / F22..Q300 J96 FimH N28S N91S N249Q / His8 в pcDNA3.1(+)).

В SEQ ID NO: 24 приведена аминокислотная последовательность полипептида, имеющего происхождение из FimH *E. coli*, согласно SEQ ID NO: 7 (зрелый белок конструкции pSB02083 лектинового домена FimH дикого типа).

В SEQ ID NO: 25 приведена аминокислотная последовательность His-метки.

В SEQ ID NO: 26 приведена аминокислотная последовательность полипептида, имеющего происхождение из FimH *E. coli*, согласно SEQ ID NO: 8 (зрелый белок pSB02158 закрепленного мутанта лектинового домена FimH).

В SEQ ID NO: 27 приведена аминокислотная последовательность полипептида, имеющего происхождение из FimH *E. coli* (pSB01878).

В SEQ ID NO: 28 приведена аминокислотная последовательность полипептида, имеющего происхождение из FimH *E. coli* (K12).

В SEQ ID NO: 29 приведена аминокислотная последовательность полипептида, имеющего происхождение из FimH *E. coli* (UTI89).

В SEQ ID NO: 30 приведена аминокислотная последовательность WzzB O25b 2401.

В SEQ ID NO: 31 приведена аминокислотная последовательность WzzB O25a:K5:H1.

В SEQ ID NO: 32 приведена аминокислотная последовательность WzzB O25a ETEC ATCC.

В SEQ ID NO: 33 приведена аминокислотная последовательность WzzB K12 W3110.

В SEQ ID NO: 34 приведена аминокислотная последовательность WzzB *Salmonella* LT2.

В SEQ ID NO: 35 приведена аминокислотная последовательность FepE O25b 2401.

В SEQ ID NO: 36 приведена аминокислотная последовательность FepE O25a:K5:H1.

В SEQ ID NO: 37 приведена аминокислотная последовательность FepE O25a ETEC ATCC.

В SEQ ID NO: 38 приведена аминокислотная последовательность FepE O157.

В SEQ ID NO: 39 приведена аминокислотная последовательность FepE *Salmonella* LT2.

В SEQ ID NO: 40 приведена последовательность праймера LT2wzzB_S.

В SEQ ID NO: 41 приведена последовательность праймера LT2wzzB_AS.

В SEQ ID NO: 42 приведена последовательность праймера O25bFepE_S.

В SEQ ID NO: 43 приведена последовательность праймера O25bFepE_A.

В SEQ ID NO: 44 приведена последовательность праймера wzzB P1_S.

В SEQ ID NO: 45 приведена последовательность праймера wzzB P2_AS.

В SEQ ID NO: 46 приведена последовательность праймера wzzB P3_S.

В SEQ ID NO: 47 приведена последовательность праймера wzzB P4_AS.

В SEQ ID NO: 48 приведена последовательность праймера O157 FepE_S.

В SEQ ID NO: 49 приведена последовательность праймера O157 FepE_AS.

В SEQ ID NO: 50 приведена последовательность праймера pBAD33_adaptor_S.

В SEQ ID NO: 51 приведена последовательность праймера pBAD33_adaptor_AS.

В SEQ ID NO: 52 приведена последовательность праймера JUMPSTART_r.

В SEQ ID NO: 53 приведена последовательность праймера gnd_f.

В SEQ ID NO: 54 приведена аминокислотная последовательность сигнальной

последовательности IgK мыши.

В SEQ ID NO: 55 приведена аминокислотная последовательность сигнального пептида большой субъединицы p51 рецептора FcRn IgG человека.

В SEQ ID NO: 56 приведена аминокислотная последовательность сигнального пептида человеческого белка IL10.

В SEQ ID NO: 57 приведена аминокислотная последовательность сигнального пептида слитого гликопротеина F0 респираторного синцитиального вируса А человека (штамм А2).

В SEQ ID NO: 58 приведена аминокислотная последовательность сигнального пептида гемагглютинаина вируса гриппа А.

В SEQ ID NO: 59-101 приведены аминокислотные последовательности и нуклеотидные последовательности связанного с наноструктурой полипептида или его фрагмента.

В SEQ ID NO: 102-109 приведены последовательности из различных биологических видов, использованные для предсказания сигнального пептида с применением программы SignalP 4.1 (DTU Bioinformatics).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторам изобретения удалось преодолеть трудности, связанные с получением полипептидов, имеющих происхождение из белков адгезинов *E. coli*, используя для экспрессии клетки млекопитающих. Как продемонстрировано в данном описании и в разделе Примеры, обнаружили, что экспрессия рекомбинантных полипептидов в клетках млекопитающих стабильно обеспечивала высокий выход по сравнению с экспрессией полипептидов в *E. coli*. Кроме того, авторы изобретения неожиданно нашли мутации и экспрессионные конструкции для стабилизации рекомбинантных полипептидов и их фрагментов в желаемой конформации.

Блокирование первых стадий инфицирования, а именно присоединения бактерий к рецепторам клеток-хозяев и колонизации поверхности слизистой важно для предупреждения, лечения и/или уменьшения вероятности бактериальных инфекций. Присоединение бактерий может включать взаимодействие между белком бактериальной поверхности под названием адгезин и рецептором клетки-хозяина. Предшествующие доклинические исследования с адгезином FimH (имеющим происхождение из уропатогенной *E. coli*) подтвердили, что против адгезина вырабатываются антитела. Чтобы попытаться предупредить инфекции, от воспаления среднего уха и кариеса зубов

до пневмонии и сепсиса, необходимо продвинуться в обнаружении, характеристике и выделении адгезинов.

Для получения белков адгезинов, таких как FimH и его фрагменты в коммерческом масштабе необходимо найти подходящие конструкции и подходящих хозяев, чтобы полипептиды и их фрагменты можно было экспрессировать в достаточном количестве в течение продолжительного времени и в предпочтительной конформации. Например, в некоторых воплощениях предпочтительная конформация рекомбинантного полипептида демонстрирует низкую аффинность к мономаннозе (например, K_d приблизительно 300 мкмоль). В некоторых воплощениях предпочтительная конформация демонстрирует высокую аффинность к мономаннозе (например, K_d менее 1,2 мкмоль).

Белки адгезины, имеющие происхождение из *E. coli*, рекомбинантно экспрессировали в клетках *E. coli*. Однако выход составлял менее 10 мг/л. Очистка ассоциированного с пиллями адгезина в больших количествах может быть проблематичной, когда его получают в *E. coli*. Не ограничиваясь конкретной теорией или механизмом, предположили, что продукт, экспрессированный в *E. coli*, может демонстрировать конформацию, которая не является оптимальной для индуцирования эффективного иммунного ответа у млекопитающих.

В одном аспекте изобретение включает рекомбинантную клетку млекопитающего, включающую последовательность полинуклеотида, кодирующего полипептид, имеющий происхождение из бактериального белка адгезина, или его фрагмент.

В другом аспекте изобретение включает способ получения полипептида или его фрагмента в клетке млекопитающего, включающий: (i) культивирование клетки млекопитающего в подходящих условиях, тем самым экспрессируя указанный полипептид или его фрагмент; и (ii) сбор указанного полипептида или его фрагмента из культуры. Способ может дополнительно включать очистку полипептида или его фрагмента. Также в данном документе раскрыт полипептид или его фрагмент, получаемый указанным способом.

В другом аспекте изобретение включает композицию, включающую полипептид или его фрагмент, описанные в данном документе. Композиция может включать полипептид или его фрагмент, подходящий для введения *in vivo*. Например, полипептид или его фрагмент в такой композиции могут иметь чистоту по меньшей мере 85%, по

меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% по массе. Композиция может дополнительно содержать адъювант.

В следующем аспекте изобретение включает композицию для применения в индуцировании иммунного ответа против *E. coli*. Также раскрыто применение композиции, описанной в данном документе, для индуцирования иммунного ответа против *E. coli* и применение композиции, описанной в данном документе, в изготовлении лекарственного средства для индуцирования иммунного ответа против *E. coli*.

I. Полипептиды, имеющие происхождение из *E. coli*, и их фрагменты

В одном аспекте раскрыта клетка млекопитающего, включающая полинуклеотид, кодирующий полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент. Термин «имеющий происхождение из», используемый в данном документе, относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность полипептида FimH или комплекса полипептида FimCH или его фрагмента, описанному в данном документе, который был изменен посредством введения замены, делеции или добавления аминокислотного остатка. Предпочтительно, полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент включает последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% последовательности соответствующего полипептида FimH *E. coli* дикого типа или его фрагмента. В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент имеет аминокислоты, идентичные по всей длине соответствующему полипептиду FimH дикого типа или комплексу полипептида FimCH или его фрагменту.

Фрагменты должны включать по меньшей мере n последовательных аминокислот из последовательностей i , в зависимости от конкретной последовательности, n равно 7 или более (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 или более). Предпочтительно, фрагменты включают эпитоп из последовательности. В некоторых воплощениях фрагмент включает аминокислотную последовательность из по меньшей мере 50 последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 100 последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 125 последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 150 последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 175

последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 200 последовательных аминокислотных остатков или по меньшей мере 250 последовательных аминокислотных остатков аминокислотной последовательности полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*.

В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент включает одну или более аминокислот, не являющихся классическими, по сравнению с соответствующим полипептидом FimH *E. coli* дикого типа или фрагментом.

В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент обладает схожей или идентичной функцией с соответствующим полипептидом FimH дикого типа его фрагментом.

В предпочтительном воплощении полипептиды или комплексы полипептидов или их фрагменты по изобретению выделяют или очищают.

В некоторых воплощениях полинуклеотид, кодирующий полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент интегрирован в геномную ДНК клетки млекопитающего и при культивировании в подходящих условиях указанный полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент экспрессируются клеткой млекопитающего.

В предпочтительном воплощении полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент является растворимым.

В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент секретируется из клетки-хозяина млекопитающего.

В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент может включать дополнительные аминокислотные остатки, такие как N-концевые или C-концевые удлинения. Такие удлинения могут включать одну или более меток, которые могут облегчать детектирование (например, эпитопную метку для детектирования моноклональными антителами) и/или очистку (например, полигистидиновую метку, позволяющую осуществлять очистку на хелатообразующей смоле с ионами никеля) полипептида или его фрагмента. В некоторых воплощениях метка включает аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 25. Такие метки для аффинной очистки известны в области техники. Примеры меток для аффинной очистки включают, например, His-метку (гексагистидиновая, которая может, например, связываться с ионом металла), связывающий мальтозу белок (MBP), который может, например, связываться с

амилозой), глутатион-S-трансферазу (GST), которая может, например, связываться с глутатионом, FLAG-метку, которая может, например, связываться с анти-flag антителом), Strep-метку, которая может, например, связываться со стрептавидином или его производным). В предпочтительных воплощениях полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент не включают дополнительные аминокислотные остатки, такие как N-концевые или C-концевые удлинения. В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент, описанный в данном документе, не включает последовательность экзогенной метки.

Тогда как в данном документе могут упоминаться определенные штаммы *E. coli*, следует понимать, что полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент не ограничиваются определенными штаммами, если не указано иное.

В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из FimH *E. coli*, или его фрагмент включает остаток фенилаланина на N-конце полипептида. В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из FimH, или его фрагмент включает остаток фенилаланина в пределах первых 20 положений остатков с N-конца. Предпочтительно, остаток фенилаланина находится в положении 1 полипептида. Например, в некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из FimH *E. coli*, или его фрагмент не включает дополнительный остаток глицина на N-конце полипептида, имеющего происхождение из FimH *E. coli*, или его фрагмента.

В некоторых воплощениях остаток фенилаланина в положении 1 зрелого FimH *E. coli* дикого типа замещен алифатической гидрофобной аминокислотой, например любым остатком из Ile, Leu и Val.

В некоторых воплощениях для экспрессии полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента может применяться сигнальный пептид. Сигнальные последовательности и экспрессионные кассеты для получения белков известны в области техники. Как правило, лидерные последовательности имеют длину 5-30 аминокислот и обычно находятся на N-конце только что синтезированного полипептида. Сигнальный пептид обычно содержит длинный участок из гидрофобных аминокислот, которые склонны образовывать одну альфа-спираль. Кроме того, многие сигнальные пептиды начинаются коротким положительно заряженным участком аминокислот, которые могут способствовать обеспечению надлежащей топологии полипептида в ходе транслокации. В конце сигнального пептида обычно находится

участок аминокислот, который распознается и отщепляется сигнальной пептидазой. Сигнальная пептидаза может осуществлять отщепление во время транслокации или после ее завершения с образованием свободного сигнального пептида и зрелого белка. В некоторых воплощениях сигнальный пептид включает аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9% или 100% любой из SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 22.

В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент, описанный в данном документе, может включать отщепляемый линкер. Такие линкеры позволяют эпитопу отделяться от очищенного комплекса, например, при добавлении агента, способного отщеплять линкер. Отщепляемые линкеры известны в области техники. Такие линкеры могут отщепляться, например, в результате облучения светочувствительной связи или катализируемого кислотами гидролиза. Другой пример отщепляемого линкера включает полипептидный линкер, который включает сайт распознавания протеазой и может отщепляться при добавлении подходящего фермента протеазы.

В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент включает модификацию относительно соответствующего полипептида FimH *E. coli* дикого типа или фрагмента. Модификация может включать ковалентное присоединение молекулы к полипептиду. Например, указанные модификации могут включать гликозилирование, ацетилирование, пегилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию известными защитными/блокирующими группами, протеолитическое расщепление, связывание с клеточным лигандом или другим белком и так далее. В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент может включать модификацию относительно соответствующего полипептида FimH *E. coli* дикого типа или фрагмента, такую как химические модификации с применением способов, известных в области техники, включая специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и так далее, без ограничения. В другом воплощении модификация может включать ковалентное присоединение молекулы липида к полипептиду. В некоторых воплощениях полипептид не включает ковалентного присоединения молекулы к полипептиду относительно соответствующего

полипептида FimH *E. coli* дикого типа или его фрагмента.

Например, белки и полипептиды, получаемые в культуре клеток, могут представлять собой гликопротеины, содержащие присоединенные ковалентной связью углеводные структуры, включая олигосахаридные цепи. Такие олигосахаридные цепи присоединены к белку через N-связи или O-связи. На олигосахаридные цепи может приходиться значительная часть массы гликопротеина. Как правило, N-связанный олигосахарид добавляется к аминогруппе боковой цепи остатка аспарагина в составе целевой консенсусной последовательности Asn-X-Ser/Thr, где X может быть любой аминокислотой за исключением пролина. В некоторых воплощениях сайт гликозилирования включает аминокислотную последовательность, выбранную из любой из следующих: аспарагин-глицин-треонин (NGT), аспарагин-изолейцин-треонин (NIT), аспарагин-глицин-серин (NGS), аспарагин-серин-треонин (NST) и аспарагин-треонин-серин (NTS). Полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент, полученные в клетках млекопитающих, могут быть гликозилированы. Гликозилирование может осуществляться в N-связанном сигнале гликозилирования Asn-Xaa-Ser/Thr в последовательности полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента. «N-связанное гликозилирование» относится к присоединению углеводной группировки через GlcNAc к остатку аспарагина в полипептидной цепи. N-связанный углевод содержит общую коровую структуру Man 1-6(Man1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -R, где R представляет остаток аспарагина полученного полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента.

В некоторых воплощениях сайт гликозилирования, в полипептиде, имеющем происхождение из *E. coli*, или его фрагменте удаляется в результате мутации в последовательности полипептида, имеющего происхождение из FimH *E. coli*, или его фрагмента. Например, в некоторых воплощениях остаток Asn мотива гликозилирования (Asn-Xaa-Ser/Thr) может быть мутирован, предпочтительно путем замены. В некоторых воплощениях замена остатка выбрана из любого из Ser, Asp, Thr и Gln.

В некоторых воплощениях остаток Ser мотива гликозилирования может быть мутирован, предпочтительно путем замены. В некоторых воплощениях замена остатка выбрана из любого из Asp, Thr и Gln.

В некоторых воплощениях остаток Thr мотива гликозилирования может быть мутирован, предпочтительно путем замены. В некоторых воплощениях замена остатка выбрана из любого из Ser, Asp и Gln.

В некоторых воплощениях сайт гликозилирования (такой как Asn-Xaa-Ser/Thr) в составе полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента не удаляют или не модифицируют. В некоторых воплощениях соединение для подавления или ингибирования гликозилирования можно добавлять в среду для культивирования клеток. В таких воплощениях полипептид или белок включает по меньшей мере один или более негликозилированных (т.е. агликозилированных) сайтов, что означает полностью незанятый сайт гликана без присоединенной к нему углеводной группировки или содержит по меньшей мере на одну углеводную группировку меньше в том же потенциальном сайте гликозилирования по сравнению с идентичным во всем остальном полипептидом или белком, который продуцируется клеткой при прочих равных условиях, но в отсутствие соединения, ингибирующего гликозилирование. Такие соединения известны в области техники и могут включать туникамицин, гомологи туникамицина, стрептовирудин, микоспозидин, амфомицин, цушимицин, антибиотик 24010, антибиотик ММ 19290, бацитрацин, коринетоксин, шоудомицин, дуимицин, 1-дезоксиманножиримицин, дезоксиножиримицин, N-метил-1-дезоксиманножиримицин, брефелдин А, аналоги глюкозы и маннозы, 2-дезоксид-глюкозу, 2-дезоксиглюкозу, D-(+)-маннозу, D-(+) галактозу, 2-дезоксид-2-фтор-D-глюкозу, 1,4-дидезокси-1,4-имино-D-маннитол (DIM), фторглюкозу, фторманнозу, UDP(уридиндифосфат)-2-дезоксиглюкозу, GDP(гуанозиндифосфат)-2-дезоксиглюкозу, ингибиторы гидроксиметилглутарил-CoA(коэнзим А) редуктазы, 25-гидроксистерин, гидроксистерин, свайнсонин, циклогексимид, пурамицин, актиномицин D, моненсин, м-хлоркарбонил-цианид фенилгидразон (СССР), компактин, долихил-фосфорил-дезоксиглюкозу, N-ацети-D-глюкозамин, гикоксантин, тимидин, холестерин, глюкозамин, маннозамин, кастаноспермин, глутамин, бромкондуритол, кондуритол эпоксид и производные кондуритола, гликозилметил-р-нитрофенилтриазены, β-гидроксинорвалин, трео-β-фтораспарагин, δ-лактон D-(+)-глюконовой кислоты, ди(2-этилгексил)фосфат, трибутилфосфат, додецилфосфат, 2-диметиламиноэтиловый эфир (дифенилметил)-фосфорной кислоты, [2-(дифенилфосинилокси)этил]триметил аммония иодид, иодоацетат и/или фторацетат. Специалист в области техники может легко распознать или сможет легко установить вещества, подавляющие гликозилирование, которые можно применять в соответствии со способами и композициями по данному изобретению без лишнего экспериментирования. В таких воплощениях гликозилирование полипептида или его

фрагмента можно контролировать без введения аминокислотной мутации в полипептид или его фрагмент.

В некоторых воплощениях уровень гликозилирования (например, число занятых сайтов гликозилирования на полипептиде или его фрагменте, размер и/или сложность гликоформ в сайте и тому подобное) полипептида или его фрагмента, продуцируемых клеткой млекопитающего, ниже, чем уровни гликозилирования полипептида или его фрагмента, продуцируемых при прочих равных условиях в идентичной во всем остальном среде, в отсутствие такого ингибирующего гликолиз соединения и/или мутации.

В некоторых воплощениях последовательность полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента не включает сайт N-связанного гликозилирования белков. В некоторых воплощениях последовательность полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента не включает по меньшей мере один сайт N-связанного гликозилирования белков. В некоторых воплощениях последовательность полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента не включает какой-либо сайт N-связанного гликозилирования белков. В некоторых воплощениях последовательность полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента включает сайт для N-связанного гликозилирования белков. В некоторых воплощениях последовательность полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента включает самое большее 1 сайт N-связанного гликозилирования белков. В некоторых воплощениях последовательность полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента включает самое большее 2 сайта N-связанного гликозилирования белков.

У полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента, экспрессируемых другими клеточными линиями или в трансгенных животных, могут быть заняты другие сайты, они могут иметь другие гликоформы и/или паттерны гликозилирования по сравнению друг с другом. В некоторых воплощениях изобретение охватывает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент независимо от гликозилирования, загруженности гликанами или паттерна гликоформ полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента, полученного в клетке млекопитающего.

В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент может иметь происхождение из полипептида FimH *E. coli*, где

аминокислотный остаток в положении 1 полипептида представляет собой фенилаланин, не метионин, например, полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Предпочтительно, полипептид, имеющий происхождение из FimH *E. coli* содержит фенилаланин в положении 1 аминокислотной последовательности полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*. В другом предпочтительном воплощении полипептид, имеющий происхождение из FimH *E. coli*, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, предпочтительно где остаток в положении 1 аминокислотной последовательности полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, представляет собой фенилаланин. В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент могут включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, которая может иметь происхождение из полипептида FimH *E. coli*.

В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент включает аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9%, или 100% любой из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29. В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент могут иметь происхождение из полипептида FimH *E. coli*, например имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент могут иметь происхождение из полипептида FimC *E. coli*, например имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

А. Полипептиды, имеющие происхождение из FimH *E. coli*, и их фрагменты

В предпочтительном воплощении полипептид или его фрагмент имеют происхождение из FimH *E. coli*. В некоторых воплощениях полипептид или его фрагмент включает полноразмерный FimH *E. coli*. Полноразмерный FimH включает два домена: N-концевой лектиновый домен и C-концевой пилиновый домен, которые соединены коротким линкером. В некоторых воплощениях полноразмерный FimH *E. coli* включает 279 аминокислот, что включает полноразмерный зрелый белок FimH *E. coli*. В некоторых

воплощениях полноразмерный FimH *E. coli* включает 300 аминокислот, что включает полноразмерный зрелый белок FimH *E. coli* и последовательность сигнального пептида длиной в 21 аминокислоту. Первичная структура FimH дикого типа длиной 300 аминокислот в высокой степени консервативна среди штаммов *E. coli*.

Примером последовательности полноразмерного FimH *E. coli* является SEQ ID NO: 1. Последовательность полноразмерного FimH включает последовательность лектинового домена и последовательность пилинового домена. Лектиновый домен FimH содержит домен распознавания углеводов, который отвечает за связывание с маннозилированным уроплакином 1a на поверхности уротелиальных клеток. Пилиновый домен прикреплен к ядру пилия через донорскую цепь последующей субъединицы FimG, этот процесс носит название комплементации донорской цепью.

Названия и приведенные в качестве примера аминокислотные последовательности каждого домена полноразмерного FimH, указанные в скобках, являются следующими, начиная с N-конца: лектиновый домен FimH (SEQ ID NO: 2) и пилиновый домен FimH (SEQ ID NO: 3).

Другие подходящие полипептиды и их фрагменты, имеющие происхождение из FimH *E. coli*, включают варианты, которые имеют различную степень идентичности с любой из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29, например по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% идентичности с любой из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29. В некоторых воплощениях варианты белков FimH: (i) являются частью FimH-FimC; (ii) содержат по меньшей мере один эпитоп SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29; и/или (iii) могут индуцировать антитела *in vivo*, иммунологически перекрестно реагирующие с FimH *E. coli*.

В некоторых воплощениях композиция включает полипептид, имеющий по меньшей мере n последовательных аминокислот из любой из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29, где n равно 7 или более (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 или более). Предпочтительно, фрагменты включают эпитоп из

последовательности. В некоторых воплощениях композиция включает полипептид, имеющий по меньшей мере 50 последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 100 последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 125 последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 150 последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 175 последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 200 последовательных аминокислотных остатков или по меньшей мере 250 последовательных аминокислотных остатков аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29.

В некоторых воплощениях композиция включает полипептид, идентичный по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% SEQ ID NO: 1. В некоторых воплощениях композиция включает полипептид, идентичный по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% SEQ ID NO: 2. В некоторых воплощениях композиция включает полипептид, идентичный по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% SEQ ID NO: 3. В некоторых воплощениях композиция включает полипептид, идентичный по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% SEQ ID NO: 4. В некоторых воплощениях композиция включает полипептид, идентичный по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% SEQ ID NO: 20. В некоторых воплощениях композиция включает полипептид, идентичный по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% SEQ ID NO: 23. В некоторых воплощениях композиция включает полипептид, идентичный по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% SEQ ID

NO: 24. В некоторых воплощениях композиция включает полипептид, идентичный по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% SEQ ID NO: 26. В некоторых воплощениях композиция включает полипептид, идентичный по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% SEQ ID NO: 28. В некоторых воплощениях композиция включает полипептид, идентичный по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% SEQ ID NO: 30.

Другой пример подходящего полипептида и его фрагментов, имеющих происхождение из FimH *E. coli*, описанных в данном документе, показан как SEQ ID NO: 2, не имеющая N-концевой сигнальной последовательности дикого типа и соответствующая аминокислотным остаткам 22-300 SEQ ID NO: 1. Другой пример фрагмента FimH включает всю N-концевую сигнальную последовательность и зрелый белок, как показано в SEQ ID NO: 1.

В некоторых воплощениях сайт гликозилирования в полипептиде, имеющем происхождение из *E. coli*, или его фрагменте удаляется в результате мутации в последовательности полипептида, имеющего происхождение из FimH *E. coli*, или его фрагмента. Например, в некоторых воплощениях остаток Asn в положении 7 зрелого полипептида FimH *E. coli* (например, согласно нумерации SEQ ID NO: 2) может быть мутирован, предпочтительно путем замены. В некоторых воплощениях остаток Asn в положении 7 лектинового домена полипептида FimH *E. coli* (например, согласно нумерации SEQ ID NO: 3) может быть мутирован, предпочтительно путем замены. В некоторых воплощениях замена остатка выбрана из любого из Ser, Asp, Thr и Gln.

В некоторых воплощениях остаток Thr в положении 10 зрелого полипептида FimH *E. coli* (например, согласно нумерации SEQ ID NO: 2) может быть мутирован, предпочтительно путем замены. В некоторых воплощениях остаток Thr в положении 7 лектинового домена полипептида FimH *E. coli* (например, согласно нумерации SEQ ID NO: 3) может быть мутирован, предпочтительно путем замены. В некоторых воплощениях замена остатка выбрана из любого из Ser, Asp и Gln.

В некоторых воплощениях остаток Asn в положении N235 зрелого полипептида FimH *E. coli* (например, согласно нумерации SEQ ID NO: 2) может быть мутирован,

предпочтительно путем замены. В некоторых воплощениях остаток Asn в положении N228 зрелого полипептида FimH *E. coli* (например, согласно нумерации SEQ ID NO: 2) может быть мутирован, предпочтительно путем замены. В некоторых воплощениях замена остатка выбрана из любого из Ser, Asp, Thr и Gln.

В некоторых воплощениях остаток Asn в положении 70 зрелого полипептида FimH *E. coli* (например, согласно нумерации SEQ ID NO: 2) может быть мутирован, предпочтительно путем замены. В некоторых воплощениях остаток Asn в положении 70 лектинового домена полипептида FimH *E. coli* (например, согласно нумерации SEQ ID NO: 3) может быть мутирован, предпочтительно путем замены. В некоторых воплощениях замена остатка выбрана из любого из Ser, Asp, Thr и Gln.

В некоторых воплощениях остаток Ser в положении 72 зрелого полипептида FimH *E. coli* (например, согласно нумерации SEQ ID NO: 2) может быть мутирован, предпочтительно путем замены. В некоторых воплощениях остаток Asn в положении 72 лектинового домена полипептида FimH *E. coli* (например, согласно нумерации SEQ ID NO: 3) может быть мутирован, предпочтительно путем замены. В некоторых воплощениях замена остатка выбрана из любого из Asp, Thr и Gln.

Термин «фрагмент», используемый в данном документе, относится к полипептиду и определяется как любая отдельная часть заданного полипептида, которая является уникальной или характерной для указанного полипептида. Термин, используемый в данном документе, также относится к любой отдельной части заданного полипептида, которая сохраняет по меньшей мере часть активности полноразмерного полипептида. В некоторых воплощениях часть сохраняемой активности составляет по меньшей мере 10% от активности полноразмерного полипептида. В некоторых воплощениях часть сохраняемой активности составляет по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% от активности полноразмерного полипептида. В некоторых воплощениях часть сохраняемой активности составляет по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% от активности полноразмерного полипептида. В некоторых воплощениях часть сохраняемой активности составляет по меньшей мере 100% или более от активности полноразмерного полипептида. В некоторых воплощениях фрагмент включает по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более последовательных аминокислот полноразмерного полипептида.

В. Комплекс FimH, FimC и его фрагменты

В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из FimH *E. coli*, или его фрагмент находится в комплексе с полипептидом, имеющим происхождение из FimC *E. coli*, или его фрагментом. В предпочтительном воплощении полипептид, имеющий происхождение из FimH *E. coli*, или его фрагмент и полипептид, имеющий происхождение из FimC *E. coli*, или его фрагмент, присутствуют в комплексе, предпочтительно в комплексе в соотношении 1:1. Не ограничиваясь какой-либо теорией или механизмом, полагают, что полноразмерный FimH может быть стабилизирован в активной конформации периплазматическим шапероном FimC, тем самым делая возможной очистку полноразмерного белка FimH. В некоторых воплощениях полипептид или его фрагмент включает полноразмерный FimH и полноразмерный FimC.

В некоторых воплощениях полипептид или его фрагмент включает фрагмент FimH и фрагмент FimC. В некоторых воплощениях полипептид или его фрагмент включает полноразмерный FimH и фрагмент FimC. Пример последовательности FimC *E. coli* приведен в SEQ ID NO: 10. В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент, включает комплексообразующие фрагменты FimH.

Комплексообразующие фрагменты FimH могут быть любой(ым) частью или участком белка FimH, сохраняющей(им) способность образовывать комплекс с FimC или его фрагментом. Подходящий комплексообразующий фрагмент FimH может также быть получен или определен стандартными способами, известными в области техники, такими как исследование совместной иммунопреципитации, перекрестное связывание или колокализация с применением флуоресцентного окрашивания и так далее. Также можно применять SDS-PAGE или анализ методом вестерн-блот (например, демонстрируя, что фрагмент FimH и FimC или его фрагмент находятся в комплексе, о чем свидетельствует гель-электрофорез). В некоторых воплощениях комплексообразующий фрагмент FimH (i) является частью комплекса FimH-FimC; (ii) содержит по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29; и/или (iii) может индуцировать антитела *in vivo*, иммунологически перекрестно реагирующие с FimH *E. coli*.

В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент, включает полноразмерный FimH, причем FimH не находится в комплексе с FimC. В некоторых воплощениях полипептид или его фрагмент включает фрагмент

FimH, где фрагмент не находится в комплексе с FimC. В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент FimC включает SEQ ID NO: 10. В некоторых воплощениях комплекс может экспрессироваться с той же плазмиды, предпочтительно под контролем отдельных промоторов для каждого полипептида или его фрагмента.

В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из FimH *E. coli*, или его фрагмент связывается с полипептидом, имеющим происхождение из FimC *E. coli* или его фрагмента, который может быть конструирован в структуру полипептида, имеющего происхождение из FimH *E. coli*, или его фрагмента. Часть молекулы FimC, которая связывается в комплекс с FimH, называется «донорской цепью», а механизм образования нативной структуры FimH с использованием цепи FimC, связывающейся с FimH в комплекс FimCH, известен как «комплементация донорской цепью».

В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из FimH *E. coli*, или его фрагмент, может экспрессироваться соответствующей версией FimH, комплементированной донорской цепью, где аминокислотная последовательность FimC, взаимодействующая с FimH в комплексе FimCH, сама конструирована на С-конце FimH, обеспечивая нативную конформацию без необходимости наличия остальной части молекулы FimC. В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из FimH *E. coli* или его фрагмент, может экспрессироваться в форме комплекса, включающего его отдельные домены, такие как лектиновый связывающийся домен и пилиновый домен, и такие домены могут быть соединены друг с другом ковалентно или нековалентно. Например, в некоторых воплощениях связывающий сегмент может включать аминокислотные последовательности или другие олигомерные структуры, включающие простые полимерные структуры.

Способы и композиции по изобретению могут включать комплексы, описанные в данном документе, в которых указанные полипептиды и их фрагменты, имеющие происхождение из *E. coli*, совместно экспрессируются или образуются в объединенном состоянии.

С. Лектиновый домен, пилиновый домен и их варианты

Конформация и лиганд-связывающие свойства лектинового домена FimH могут находиться под аллостерическим контролем пилинового домена FimH. В статических условиях взаимодействие между двумя доменами полноразмерного FimH стабилизирует лектиновый домен в состоянии низкой аффинности к мономаннозе (например, K_d

приблизительно 300 мкМ), которое отличается неглубоким связывающим карманом. Связывание с лигандом маннозой может индуцировать конформационное изменение, приводящее к состоянию средней аффинности, в котором лектиновый и пилиновый домены остаются в тесном контакте. Однако при напряжении сдвига лектиновый и пилиновый домены могут разделяться и индуцировать высокоаффинное состояние (например, K_d менее 1,2 мкМ).

Из-за отсутствия отрицательной аллостерической регуляции, осуществляемой пилиновым доменом, изолированный лектиновый домен FimH закрепляется в высокоаффинном состоянии (например, K_d менее 1,2 мкМ). Изолированный рекомбинантный лектиновый домен, закрепленный в высокоаффинном состоянии. При этом закрепление адгезина в низкоаффинной конформации (например, K_d приблизительно 300 мкМ) индуцирует продуцирование ингибирующих адгезию антител. Следовательно, стабилизация лектинового домена в низкоаффинном состоянии представляет интерес.

В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент, включает лектиновый домен FimH *E. coli*. Примеры последовательностей лектинового домена могут включать любую из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 26. В некоторых воплощениях лектиновый домен FimH *E. coli* включает замены цистеином. В предпочтительном воплощении лектиновый домен FimH *E. coli* включает замены цистеином в составе первых 50 аминокислотных остатков лектинового домена. В некоторых воплощениях лектиновый домен может включать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 замен цистеином. Предпочтительно, лектиновый домен включает 2 замены цистеином. См, например, pSB02158 и pSB02198.

Другие подходящие полипептиды и их фрагменты, имеющие происхождение из FimH *E. coli*, включают варианты лектинового домена, которые имеют различную степень идентичности с любой из SEQ ID NO: 3, например по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% идентичности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 3. В некоторых воплощениях композиция включает полипептид, идентичный по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% SEQ ID NO: 3. В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его

фрагмент, включает пилиновый домен FimH *E. coli*. Другие подходящие полипептиды и их фрагменты, имеющие происхождение из FimH *E. coli*, включают варианты пилинового домена, которые имеют различную степень идентичности с любой из SEQ ID NO: 7, например по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% идентичности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 7. В некоторых воплощениях композиция включает полипептид, идентичный по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% SEQ ID NO: 4. Другие подходящие полипептиды и их фрагменты, имеющие происхождение из FimH *E. coli*, включают варианты лектинового домена, которые имеют различную степень идентичности с любой из SEQ ID NO: 8, например по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% идентичности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 8. В некоторых воплощениях композиция включает полипептид, идентичный по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% SEQ ID NO: 8. В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент, включает пилиновый домен FimH *E. coli*. Другие подходящие полипептиды и их фрагменты, имеющие происхождение из FimH *E. coli*, включают варианты пилинового домена, которые имеют различную степень идентичности с любой из SEQ ID NO: 24, например по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% идентичности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 24. В некоторых воплощениях композиция включает полипептид, идентичный по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% SEQ ID NO: 24. Другие подходящие полипептиды и их фрагменты, имеющие происхождение из FimH *E. coli*, включают варианты лектинового домена, которые имеют различную степень идентичности с любой из SEQ ID NO: 26, например по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%,

89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% идентичности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 26. В некоторых воплощениях композиция включает полипептид, идентичный по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% SEQ ID NO: 26.

В некоторых воплощениях композиция включает полипептид, имеющий по меньшей мере n последовательных аминокислот из любой из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 26, где n равно 7 или более (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 или более). Предпочтительно, фрагменты включают эпитоп из последовательности. В некоторых воплощениях композиция включает полипептид, имеющий по меньшей мере 50 последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 100 последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 125 последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 150 последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 175 последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 200 последовательных аминокислотных остатков или по меньшей мере 250 последовательных аминокислотных остатков аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 26.

Расположение и длина лектинового домена FimH *E. coli* или его гомолога или варианта можно предсказать на основании попарного выравнивания его последовательности с любой из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 26, например путем выравнивания аминокислотной последовательности FimH с SEQ ID NO: 1 и идентификации последовательности, которая выравнивается с остатками 22-179 SEQ ID NO: 1.

D. N-концевая сигнальная последовательность дикого типа

В некоторых воплощениях N-концевая сигнальная последовательность дикого типа полноразмерного FimH расщепляется в клетке-хозяине с получением зрелого полипептида FimH. Таким образом, FimH, экспрессированный в клетке-хозяине, может не иметь N-концевой сигнальной последовательности. В предпочтительном воплощении полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент могут кодироваться нуклеотидной последовательностью, в которой отсутствует кодирующая последовательность N-концевой сигнальной последовательности дикого типа.

В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или

его фрагмент включает фрагменты FimH, образующие комплекс FimH-FimC, N-концевую сигнальную последовательность (такую как остатки 1-21 SEQ ID NO: 1) или их комбинацию. Образующий комплекс фрагмент FimH может быть любой(ым) частью или участком белка FimH, сохраняющей(им) способность образовывать комплекс с FimC.

В некоторых воплощениях у полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента могут отсутствовать от 1 до 21 аминокислотных остатков (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 аминокислотный остаток, или отсутствовать 1-21 остатков, 1-20 остатков, 1-15 остатков, 1-10 остатков, 2-20 остатков, 2-15 остатков, 2-10 остатков, 5-20 остатков, 5-15 остатков или 5-10 остатков) на N-конце и/или C-конце полноразмерного полипептида FimH, который может включать сигнальную последовательность, лектиновый домен и пилиновый домен.

II. Нуклеиновые кислоты

В одном аспекте раскрыты нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент. Одну или более нуклеиновокислотных конструкций, кодирующих полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент, можно применять для интеграции в геном и последующей экспрессии полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента. Например, единая нуклеиновокислотная конструкция, кодирующая полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент, может быть внедрена в клетку-хозяина. В альтернативном варианте кодирующие последовательности полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента, могут находиться в двух или более нуклеиновокислотных конструкциях, которые затем внедряют в клетку-хозяина одновременно или последовательно.

Например, в одном приведенном в качестве примера воплощении единая нуклеиновокислотная конструкция кодирует лектиновый домен и пилиновый домен FimH *E. coli*. В другом приведенном в качестве примера воплощении первая нуклеиновокислотная конструкция кодирует лектиновый домен, а вторая нуклеиновокислотная конструкция кодирует пилиновый домен FimH *E. coli*. В некоторых воплощениях достигается интеграция в геном.

Нуклеиновокислотная конструкция может содержать геномную ДНК, содержащую один или более интронов, или кДНК. Некоторые гены экспрессируются более эффективно в присутствии интронов. В некоторых воплощениях нуклеотидная

последовательность подходит для экспрессии экзогенных полипептидов в указанной клетке млекопитающего.

В некоторых воплощениях кодонный состав нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид или его фрагмент, оптимизирован для повышения уровня экспрессии в любой конкретной клетке.

В некоторых воплощениях нуклеиновокислотная конструкция включает сигнальную последовательность, кодирующую пептид, направляющий секрецию полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота включает нативную сигнальную последовательность полипептида, имеющего происхождение из FimH *E. coli*. В некоторых воплощениях, когда полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент включает эндогенную сигнальную последовательность, кодонный состав нуклеиновокислотной последовательности, кодирующей сигнальную последовательность, может быть оптимизирован для увеличения уровня экспрессии белка в клетке-хозяине.

В некоторых воплощениях сигнальная последовательность имеет любую длину из указанных ниже: 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30 аминокислот. В некоторых воплощениях сигнальная последовательность имеет длину 20 аминокислот. В некоторых воплощениях сигнальная последовательность имеет длину 21 аминокислот.

В некоторых воплощениях, когда полипептид или его фрагмент включает сигнальную последовательность, эндогенная сигнальная последовательность, естественным образом связанная с полипептидом, может быть заменена сигнальной последовательностью, не связанной с полипептидом дикого типа, для улучшения уровня экспрессии полипептида или его фрагмента в культивируемых клетках. Соответственно, в некоторых воплощениях нуклеиновая кислота не включает нативную сигнальную последовательность полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота не включает нативную сигнальную последовательность полипептида, имеющего происхождение из FimH *E. coli*. В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент могут экспрессироваться с гетерологичным пептидом, который предпочтительно представляет собой сигнальную последовательность или другой пептид, имеющий специфический сайт расщепления, на N-конце зрелого белка или полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента. Например, полипептид, имеющий происхождение из FimH *E. coli*, или его фрагмент могут

экспрессироваться с гетерологичным пептидом (например, сигнальной последовательностью IgK), который предпочтительно представляет собой сигнальную последовательность или другой пептид, имеющий специфический сайт расщепления на N-конце зрелого белка FimH *E. coli*. В предпочтительных воплощениях специфический сайт расщепления на N-конце зрелого белка FimH *E. coli* располагается непосредственно перед первоначальным остатком фенилаланина зрелого белка FimH *E. coli*. Выбранная гетерологичная последовательность предпочтительно распознается и подвергается процессингу (то есть расщепляется сигнальной пептидазой) в клетке-хозяине.

В предпочтительных воплощениях сигнальная последовательность представляет собой сигнальную последовательность IgK. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. В предпочтительных воплощениях сигнальная последовательность представляет собой сигнальную последовательность IgK мыши.

Подходящие векторы для экспрессии в клетках млекопитающих для получения полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагментов известны в области техники и могут быть доступны для приобретения, например экспрессирующий вектор pSecTag2 от Invitrogen™. Приведенная в качестве примера последовательность сигнального пептида Ig каппа мыши включает последовательность ETDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO: 54). В некоторых воплощениях вектор включает вектор для экспрессии в клетках млекопитающих pBudCE4.1 от Thermo Fisher. Дополнительные приведенные в качестве примера и подходящие векторы включают вектор для экспрессии в клетках млекопитающих pcDNA™3.1 (Thermo Fisher).

В некоторых воплощениях сигнальная последовательность не включает сигнальную последовательность гемагглютинина.

В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота включает нативную сигнальную последовательность полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента. В некоторых воплощениях сигнальная последовательность не представляет собой сигнальную последовательность IgK. В некоторых воплощениях сигнальная последовательность включает сигнальную последовательность гемагглютинина.

В одном аспекте раскрытые в данном документе векторы включают кодирующие последовательности полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его

фрагмента. Приведенные в качестве примера векторы включают плазмиды, которые способны реплицироваться автономно или реплицироваться в клетке млекопитающего. Типичные векторы экспрессии содержат подходящие промоторы, энхансеры и терминаторы, которые нужны для регуляции экспрессии кодирующей(их) последовательности(ей) в экспрессионной конструкции. Векторы могут также включать селективные маркеры для отбора трансформированных клеток-хозяев по фенотипическому признаку (такие как придание устойчивости к антибиотикам, таким как ампициллин или неомизин).

Подходящие промоторы известны в области техники. Приведенные в качестве примера промоторы включают, например, промотор цитомегаловируса (CMV), аденовируса, EF1 а, промотор металлотioneина GAPDH, ранний промотор SV-40, поздний промотор SV-40, промотор вируса опухоли молочной железы мыши, промотор вируса саркомы Рауса, промотор полиэдрина и так далее. Промоторы могут быть конститутивными или индуцибельными. Можно использовать один или более векторов (например, один вектор, кодирующий все субъединицы или домены или их фрагменты или множество векторов вместе, кодирующих субъединицы или домены или их фрагменты).

Также можно использовать последовательности участка внутренней посадки рибосомы (IRES) и пептида 2A. IRES и пептид 2A обеспечивают альтернативные подходы для совместной экспрессии множества последовательностей. IRES представляет собой нуклеотидную последовательность, обеспечивающую инициацию трансляции в середине последовательности матричной РНК (мРНК) как часть более масштабного процесса синтеза белка. Обычно у эукариот трансляция может быть иницирована только на 5' конце молекулы мРНК. Элементы IRES обеспечивают экспрессию множества генов в одном транскрипте. Полицистронные векторы на основе IRES, экспрессирующие множество белков с одного транскрипта, могут уменьшать ускользание неэкспрессирующих клонов от отбора. Пептид 2A обеспечивает трансляцию множества белков в единой рамке считывания в полипротеин, который затем расщепляется на отдельные белки благодаря механизму проскока рибосомы. Пептид 2A может обеспечивать более сбалансированную экспрессию множества белковых продуктов. Примеры последовательностей IRES включают, например, EV71 IRES, EMCV IRES, HCV IRES. Что касается интеграции в геном, интеграция может быть сайт-специфической или случайной. Сайт-специфической рекомбинации можно

достигнуть благодаря внедрению гомологичной(ых) последовательности(ей) в нуклеиновокислотные конструкции, описанные в данном документе. Такая гомологичная последовательность по существу совпадает с эндогенной последовательностью в специфическом сайте-мишени в геноме хозяина. В альтернативном варианте можно использовать случайную интеграцию. Иногда уровень экспрессии белка может варьировать в зависимости от сайта интеграции. Таким образом, может быть желательно отобрать ряд клонов в зависимости от уровня экспрессии рекомбинантного белка для выявления клона, у которого достигается желаемый уровень экспрессии.

Примеры нуклеиновокислотных конструкций дополнительно описаны в графических материалах, таких как любая из Фиг. 2А-2Т.

В одном аспекте нуклеотидная последовательность кодирует аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9% или 100% любой из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29.

III. Клетки-хозяева

В одном аспекте изобретение относится к клеткам, в которых последовательности, кодирующие полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент, экспрессируются в клетке-хозяине млекопитающего. В одном воплощении полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент транзиторно экспрессируется в клетке-хозяине. В другом воплощении полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент стабильно интегрирован в геном клеток-хозяев и при культивировании в подходящих условиях экспрессирует полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент. В предпочтительном воплощении полинуклеотидная последовательность экспрессируется с высокой эффективностью и геномной стабильностью.

Подходящие клетки-хозяева млекопитающих известны в области техники. Предпочтительно, клетка-хозяин подходит для продуцирования белка в промышленном масштабе. Примеры клеток-хозяев млекопитающих включают любую из следующих и их производные: Клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки COS (линия клеток,

имеющих происхождение из почки обезьяны (африканской зеленой мартышки)), клетки Vero, клетки Hela, клетки почки новорожденного хомяка (ВНК), человеческие эмбриональные клетки почки (НЕК), клетки NSO (линия клеток миеломы мыши) и клетки C127 (линия неопухолеобразующих клеток мыши). Другие примеры клеточных хозяев млекопитающих включают мышинные клетки Сертоли (ТМ4), клетки печени крысы линии Буффало (BRL 3А), клетки опухоли молочной железы мыши (ММТ), клетки гепатомы крысы (НТС), клетки миеломы мыши (NSO), клетки гибридомы мыши (Sp2/0), клетки тимомы мыши (EL4), клетки яичника китайского хомячка (СНО) и производные клеток СНО, мышинные эмбриональные клетки (NIH/3Т3, 3Т3 Li), клетки миокарда крысы (H9c2), миобласты мыши (C2C12) и клетки почки мыши (miMCD-3). Другие примеры линий клеток млекопитающих включают NS0/1, Sp2/0, Hep G2, PER.C6, COS-7, ТМ4, CV1, VERO-76, MDCK, BRL 3А, W138, ММТ 060562, TR1, MRC5 и FS4.

Любые клетки, подходящие для выращивания в культуре, можно применять в соответствии с данным изобретением. В некоторых воплощениях клетка представляет собой клетку млекопитающего. Неисчерпывающие примеры клеток млекопитающих, которые можно применять в соответствии с данным изобретением, включают линию клеток миеломы мыши BALB/c (NSO/1, ECACC No: 85110503); человеческие ретинобласты (PER.C6, CruCell, Лейден, Нидерланды); линию клеток почки обезьяны, трансформированных SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линию человеческих эмбриональных клеток почки (например, клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре; Graham et al., J. Gen Virol., 36:59,1977); клетки почки новорожденного хомяка (ВНК, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомячка +/- DHFR (СНО, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216, 1980); мышинные клетки Сертоли (ТМ4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1 587); клетки карциномы шейки матки человека (HeLa, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крысы линии Буффало (BRL 3А, ATCC CRL 1442); клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); клетки опухоли молочной железы мыши (ММТ 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68, 1982); клетки MRC 5; клетки FS4 и линию клеток гепатомы человека (Hep G2). В некоторых предпочтительных воплощениях клетки представляют собой клетки СНО. В некоторых предпочтительных воплощениях клетки представляют собой клетки GS.

Кроме того, в соответствии с данным изобретением можно применять любое количество линий гибридных клеток, доступных на коммерческой и некоммерческой основе. Термин «гибридома», используемый в данном документе, относится к клетке или потомству клетки, являющимся результатом слияния immortalized клетки и продуцирующей антитело клетки. Такая полученная в результате гибридома представляет собой immortalized клетку, продуцирующую антитела. Отдельные клетки, использованные для создания гибридомы, могут иметь в качестве источника своего происхождения любое млекопитающее, включая, без ограничения, крыс, свиней, кроликов, овец, свиней, коз и человека. В некоторых воплощениях гибридома представляет собой линию клеток триомы, являющихся результатом слияния плазматических клеток с потомками гетерогибридных слитых миелом, являющихся продуктом слияния между человеческими клетками и линией клеток миеломы мыши. В некоторых воплощениях гибридома представляет собой любую линию immortalized гибридных клеток, продуцирующих антитела, например такую как квадромы (см., например, Milstein et al., Nature, 537:3053, 1983). Специалист в области техники поймет, что линии клеток гибридомы могут иметь различные потребности в питательных веществах и/или могут нуждаться в различных условиях культивирования для оптимального роста, и будет способен модифицировать условия при необходимости.

В некоторых воплощениях клетка содержит первый ген, представляющий интерес, где первый ген, представляющий интерес, интегрирован в хромосому. В некоторых воплощениях первый ген, представляющий интерес, содержит репортерный ген, ген, обеспечивающий отбор, ген, представляющий интерес (например, кодирующий полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент), вспомогательный ген или их комбинацию. В некоторых воплощениях ген, представляющий терапевтический интерес, содержит ген, кодирующий трудно экспрессируемый белок (DtE).

В некоторых воплощениях первый ген, представляющий интерес, расположен между двумя различными сайтами рекомбинации (RTS), обеспечивающими сайт-специфическую интеграцию (SSI) в клетке млекопитающего, где два RTS интегрированы в хромосому в локусе NL1 или локусе NL2. См., например, описание локуса NL1, локуса NL2, локуса NL3, локуса NL4, локуса NL5 и локуса NL6 в опубликованной заявке на патент США № 20200002727. В некоторых воплощениях первый ген, представляющий интерес, расположен в локусе NL1. В некоторых воплощениях клетка содержит второй

ген, представляющий интерес, где второй ген, представляющий интерес, интегрирован в хромосому. В некоторых воплощениях второй ген, представляющий интерес, содержит репортерный ген, ген, обеспечивающий отбор, ген, представляющий терапевтический интерес (такой как полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент), вспомогательный ген или их комбинацию. В некоторых воплощениях ген, представляющий терапевтический интерес, содержит ген, кодирующий белок DtE. В некоторых воплощениях второй ген, представляющий интерес, расположен между двумя RTS. В некоторых воплощениях второй ген, представляющий интерес, расположен в локусе NL1 или локусе NL2. В некоторых воплощениях первый ген, представляющий интерес, расположен в локусе NL1, а второй ген, представляющий интерес, расположен в NL2. В некоторых воплощениях клетка содержит третий ген, представляющий интерес, где третий ген, представляющий интерес, интегрирован в хромосому. В некоторых воплощениях третий ген, представляющий интерес, содержит репортерный ген, ген, обеспечивающий отбор, ген, представляющий терапевтический интерес (такой как полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент), вспомогательный ген или их комбинацию. В некоторых воплощениях ген, представляющий терапевтический интерес, содержит ген, кодирующий белок DtE. В некоторых воплощениях третий ген, представляющий интерес, расположен между двумя RTS. В некоторых воплощениях третий ген, представляющий интерес, расположен в локусе NL1 или локусе NL2. В некоторых воплощениях третий ген, представляющий интерес, расположен в локусе, отличном от локуса NL1 или локуса NL2. В некоторых воплощениях первый ген, представляющий интерес, второй ген, представляющий интерес, и третий ген, представляющий интерес, расположены в трех отдельных локусах. В некоторых воплощениях по меньшей мере один из первого гена, представляющего интерес, второго гена, представляющего интерес, и третьего гена, представляющего интерес, расположен в локусе NL1, и по меньшей мере один из первого гена, представляющего интерес, второго гена, представляющего интерес, и третьего гена, представляющего интерес, расположен в локусе NL2. В некоторых воплощениях клетка содержит ген сайт-специфической рекомбиназы. В некоторых воплощениях ген сайт-специфической рекомбиназы интегрирован в хромосому.

В некоторых воплощениях данного описания предложена клетка млекопитающего, содержащая по меньшей мере четыре отдельных RTS, где клетка содержит (а) по меньшей мере два отдельных RTS, которые интегрированы в хромосому

в локусе NL1 или локусе NL2; (б) первый ген, представляющий интерес, интегрирован между по меньшей мере двумя RTS из (а), где первый ген, представляющий интерес, содержит репортерный ген, ген, кодирующий белок DtE, вспомогательный ген или их комбинацию; (в) и второй ген, представляющий интерес, интегрирован во второй хромосомный локус, отличный от локуса из (а), где второй ген, представляющий интерес, содержит репортерный ген, ген, кодирующий белок DtE (такой как полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент), вспомогательный ген или их комбинацию. В некоторых воплощениях данного описания предложена клетка млекопитающего, содержащая по меньшей мере четыре отдельных RTS, где клетка содержит (а) по меньшей мере два отдельных RTS, которые интегрированы в хромосому в локусе Fer1L4; (б) по меньшей мере два отдельных RTS, которые интегрированы в хромосому в локусе NL1 или локусе NL2; (в) первый ген, представляющий интерес, интегрирован в хромосому в локусе Fer1L4, где первый ген, представляющий интерес, содержит репортерный ген, ген, кодирующий белок DtE, вспомогательный ген или их комбинацию; и (г) второй ген, представляющий интерес, интегрирован в хромосому в локусе NL1 или локусе NL2 из (б), где второй ген, представляющий интерес, содержит репортерный ген, ген, кодирующий белок DtE (такой как полипептид, имеющий происхождение из *E. coli* или его фрагмент), вспомогательный ген или их комбинацию.

В некоторых воплощениях данного описания предложена клетка млекопитающего, содержащая по меньшей мере шесть отдельных RTS, где клетка содержит (а) по меньшей мере два отдельных RTS и первый ген, представляющий интерес, которые интегрированы в хромосому в локусе Fer1L4; (б) по меньшей мере два отдельных RTS и второй ген, представляющий интерес, которые интегрированы в хромосому в локусе NL1; и (в) по меньшей мере два отдельных RTS и третий ген, представляющий интерес, которые интегрированы в хромосому в локусе NL2.

В данном описании термины «в функциональной комбинации», «в функциональном порядке» и «функционально связанный» относятся к такой связи последовательностей нуклеиновых кислот, чтобы получалась молекула нуклеиновой кислоты, способная регулировать транскрипцию заданного гена и/или синтез молекулы нужного белка. Данный термин также относится к такой связи аминокислотных последовательностей, чтобы образовался функциональный белок. В некоторых воплощениях ген, представляющий интерес, функционально связан с промотором, где ген, представляющий интерес, интегрирован в хромосому клетки-хозяина. В некоторых

воплощениях ген, представляющий интерес, функционально связан с гетерологичным промотором, где ген, представляющий интерес, интегрирован в хромосому клетки-хозяина. В некоторых воплощениях вспомогательный ген функционально связан с промотором, где вспомогательный ген интегрирован в хромосому в геноме клетки-хозяина. В некоторых воплощениях вспомогательный ген функционально связан с гетерологичным промотором, где вспомогательный ген интегрирован в хромосому в геноме клетки-хозяина. В некоторых воплощениях ген, кодирующий белок DtE, функционально связан с промотором, где ген, кодирующий белок DtE, интегрирован в хромосому в геноме клетки-хозяина. В некоторых воплощениях ген, кодирующий белок DtE, функционально связан с гетерологичным промотором, где ген, кодирующий белок DtE, интегрирован в хромосому в геноме клетки-хозяина. В некоторых воплощениях ген рекомбиназы функционально связан с промотором, где ген рекомбиназы интегрирован в хромосому клетки-хозяина. В некоторых воплощениях ген рекомбиназы функционально связан с промотором, где ген рекомбиназы не интегрирован в геном клетки-хозяина. В некоторых воплощениях ген рекомбиназы функционально связан с гетерологичным промотором, где ген рекомбиназы не интегрирован в хромосому в геноме клетки-хозяина. В некоторых воплощениях ген рекомбиназы функционально связан с гетерологичным промотором, где ген рекомбиназы не интегрирован в хромосому в геноме клетки-хозяина.

В данном документе термин «интегрирован в хромосому» или «интеграция в хромосому» относится к стабильному встраиванию последовательности нуклеиновой кислоты в хромосому клетки-хозяина, например клетки млекопитающего, то есть последовательность нуклеиновой кислоты интегрирована в хромосому геномной ДНК (гДНК) клетки-хозяина, например клетки млекопитающего. В некоторых воплощениях нуклеотидная последовательность, которая интегрирована в хромосому, является стабильной. В некоторых воплощениях нуклеотидная последовательность, которая интегрирована в хромосому, не расположена на плазмиде или векторе. В некоторых воплощениях нуклеотидная последовательность, которая интегрирована в хромосому, не вырезается. В некоторых воплощениях интеграция в хромосому опосредована системой редактирования генома CRISPR/CAS (коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), и CRISPR-ассоциированного белка (Cas)).

В некоторых воплощениях клетки-хозяева являются подходящими для выращивания в суспензионных культурах. Компетентные для суспензии клетки-хозяева

обычно являются моодисперсными или растут в виде рыхлых агрегатов без существенной агрегации. Компетентные для суспензии клетки-хозяева включают клетки, подходящие для суспензионной культуры без адаптации или манипуляций (например, гемопозитические клетки, лимфоидные клетки) и клетки, которые преобразовали в компетентные для суспензии посредством модификации или адаптации клеток, зависимых от прикрепления (например, эпителиальных клеток, фибробластов).

В некоторых воплощениях уровень экспрессии или активности полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента повышен по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 60 раз, по меньшей мере в 70 раз, по меньшей мере в 75 раз, по меньшей мере в 80 раз, по меньшей мере в 90 раз, по меньшей мере в 100 раз по сравнению с экспрессией полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента в бактериальной клетке, например такой как клетка-хозяин *E. coli*.

Клетки-хозяева, описанные в данном документе, являются подходящими для крупномасштабных культур. Например, культуры клеток могут быть 10 л, 30 л, 50 л, 100 л, 150 л, 200 л, 300 л, 500 л, 1000 л, 2000 л, 3000 л, 4000 л, 5000 л, 10000 л или более. В некоторых воплощениях размер культуры клеток может варьировать от 10 л до 5000 л, от 10 л до 10000 л, от 10 л до 20000 л, от 10 л до 50000 л, от 40 л до 50000 л, от 100 л до 50000 л, от 500 л до 50000 л, от 1000 л до 50000 л, от 2000 л до 50000 л, от 3000 л до 50000 л, от 4000 л до 50000 л, от 4500 л до 50000 л, от 1000 л до 10000 л, от 1000 л до 20000 л, от 1000 л до 25000 л, от 1000 л до 30000 л, от 15 л до 2000 л, от 40 л до 1000 л, от 100 л до 500 л, от 200 л до 400 л или любого целого значения в указанных диапазонах. Компоненты сред для культуры клеток известны в области техники и могут включать, например, буфер, аминокислоты, витамины, соли, минералы, сыворотку, источник углерода, липиды, нуклеиновые кислоты, гормоны, микроэлементы, аммоний, кофакторы, индикаторы, низкомолекулярные вещества, гидролизат и модуляторы ферментов.

Термины «среда», «среда для культуры клеток» и «культуральная среда», используемые в данном документе, относятся к раствору, содержащему питательные вещества, которые питают растущие клетки млекопитающих. Обычно такие растворы обеспечивают незаменимые и заменимые аминокислоты, витамины, источники энергии, липиды и микроэлементы, необходимые клетке для минимального роста и/или

выживания. Такой раствор обычно может содержать дополнительные компоненты, которые усиливают рост и/или выживание выше минимального уровня, включая, без ограничения, гормоны и/или другие факторы роста, определенные ионы (такие как натрий, хлорид, кальций, магний и фосфат), буферы, витамины, нуклеозиды или нуклеотиды, микроэлементы (неорганические соединения, обычно присутствующие в очень низких конечных концентрациях), неорганические соединения, присутствующие в высоких конечных концентрациях (например, железо), аминокислоты, липиды и/или глюкозу или другой источник энергии. В некоторых воплощениях среда предпочтительно составлена таким образом, что рН и концентрация солей оптимальна для выживания и пролиферации клеток. В некоторых воплощениях среда представляет собой питательную среду, которую добавляют после начала культивирования клеток.

В некоторых воплощениях клетки можно выращивать в одной из разнообразных сред с известным химическим составом, где компоненты среды известны и контролируются. В некоторых воплощениях клетки можно выращивать в сложной среде, в которой не все компоненты известны и/или контролируются. Среды с известным химическим составом для выращивания клеток млекопитающих интенсивно разрабатывали и публиковали в последние несколько десятилетий. Все компоненты сред с известным составом хорошо охарактеризованы, и поэтому среды с известным составом не содержат сложных добавок, таких как сыворотка или гидролизаты. Первые составы сред разрабатывали для обеспечения роста клеток и поддержания жизнеспособности, не заботясь или почти не заботясь о продуцировании белка. Позднее разработали составы сред с конкретной целью обеспечить высокопродуктивные культуры клеток, продуцирующие рекомбинантные белки. Такие среды предпочтительны для применения в способе по изобретению. Такие среды обычно содержат большое количество питательных веществ и, в частности, аминокислот для поддержания роста и/или поддержания клеток в высокой плотности. При необходимости такие среды могут быть модифицированы специалистом в области техники для применения в способе по изобретению. Например, специалист в области техники может уменьшить количество фенилаланина, тирозина, триптофана и/или метионина в этих средах для их применения в качестве базовой среды или подпитывающей среды в способе, описанном в данном документе.

Не все компоненты сложной среды хорошо охарактеризованы, и так называемая сложная среда может содержать, среди прочего, такие добавки, как простые и/или

сложные источники углерода, простые и/или сложные источники азота, а также сыворотку. В некоторых воплощениях сложная среда, подходящая для данного изобретения, содержит такие добавки как гидролизаты в дополнение к другим компонентам среды с известным составом, описанной в данном документе. В некоторых воплощениях среда с известным составом обычно включает около пятидесяти химических соединений в известных концентрациях в воде. Большинство из них также содержит один или более хорошо охарактеризованных белков, таких как инсулин, IGF-1 (инсулиноподобный фактор роста 1), трансферрин или BSA (бычий сывороточный альбумин), но другим необходимо отсутствие белковых компонентов, и они обозначаются безбелковыми средами с известным составом. Типичные химические компоненты среды подразделяются на пять больших категорий: аминокислоты, витамины, неорганические соли, микроэлементы и сборная категория, не поддающаяся точному определению.

В среду для культивирования клеток могут возможно быть добавлены дополнительные компоненты. Термин «дополнительные компоненты», используемый в данном документе, относится к компонентам, которые усиливают рост и/или выживание выше минимального уровня, включая, без ограничения, гормоны и/или другие факторы роста, определенные ионы (такие как натрий, хлорид, кальций, магний и фосфат), буферы, витамины, нуклеозиды или нуклеотиды, микроэлементы (неорганические соединения, обычно присутствующие в очень низких конечных концентрациях), аминокислоты, липиды и/или глюкозу или другой источник энергии. В некоторых воплощениях дополнительные компоненты можно добавлять в первичную клеточную культуру. В некоторых воплощениях дополнительные компоненты можно добавлять после начала культивирования клеток. Обычно микроэлементы относятся к разнообразным неорганическим солям, включенным в микромолярном или более низком количестве. Например, обычно включаемыми микроэлементами являются цинк, селен, медь и другие. В некоторых воплощениях железо (соли двухвалентного или трехвалентного железа) могут быть включены в качестве микроэлемента в первичную клеточную культуру в микромолярных концентрациях. Среди микроэлементов марганец также часто включают в качестве двухвалентного катиона ($MnCl_2$ или $MnSO_4$) в диапазоне от наномолярных до микромолярных концентраций. Многочисленные менее распространенные микроэлементы обычно добавляют в наномолярных концентрациях.

В некоторых воплощениях среда, используемая в способе по изобретению,

представляет собой среду, подходящую для поддержания высокой плотности клеток в культуре, например такой как 1×10^6 клеток/мл, 5×10^6 клеток/мл, 1×10^7 клеток/мл, 5×10^7 клеток/мл, 1×10^8 клеток/мл или 5×10^8 клеток/мл. В некоторых воплощениях культура клеток представляет собой подпитываемую культуру клеток млекопитающего, предпочтительно подпитываемую культуру клеток СНО.

В некоторых воплощениях среда для культивирования клеток содержит фенилаланин в концентрации менее 2 мМ, менее 1 мМ, от 0,1 до 2 мМ, от 0,1 до 1 мМ, от 0,5 до 1,5 мМ или от 0,5 до 1 мМ. В некоторых воплощениях среда для культивирования клеток содержит тирозин в концентрации менее 2 мМ, менее 1 мМ, от 0,1 до 2 мМ, от 0,1 до 1 мМ, от 0,5 до 1,5 мМ или от 0,5 до 1 мМ. В некоторых воплощениях среда для культивирования клеток содержит триптофан в концентрации менее 2 мМ, менее 1 мМ, от 0,1 до 2 мМ, от 0,1 до 1 мМ, от 0,5 до 1,5 мМ или от 0,5 до 1 мМ. В некоторых воплощениях среда для культивирования клеток содержит метионин в концентрации менее 2 мМ, менее 1 мМ, от 0,1 до 2 мМ, от 0,1 до 1 мМ, от 0,5 до 1,5 мМ или от 0,5 до 1 мМ. В некоторых воплощениях среда для культивирования клеток содержит лейцин в концентрации менее 2 мМ, менее 1 мМ, от 0,1 до 2 мМ, от 0,1 до 1 мМ, от 0,5 до 1,5 мМ или от 0,5 до 1 мМ. В некоторых воплощениях среда для культивирования клеток содержит серин в концентрации менее 2 мМ, менее 1 мМ, от 0,1 до 2 мМ, от 0,1 до 1 мМ, от 0,5 до 1,5 мМ или от 0,5 до 1 мМ. В некоторых воплощениях среда для культивирования клеток содержит треонин в концентрации менее 2 мМ, менее 1 мМ, от 0,1 до 2 мМ, от 0,1 до 1 мМ, от 0,5 до 1,5 мМ или от 0,5 до 1 мМ. В некоторых воплощениях среда для культивирования клеток содержит глицин в концентрации менее 2 мМ, менее 1 мМ, от 0,1 до 2 мМ, от 0,1 до 1 мМ, от 0,5 до 1,5 мМ или от 0,5 до 1 мМ. В некоторых воплощениях среда для культивирования клеток содержит два из фенилаланина, тирозина, триптофана, метионина, лейцина, серина, треонина и глицина в концентрации менее 2 мМ, менее 1 мМ, от 0,1 до 2 мМ, от 0,1 до 1 мМ, от 0,5 до 1,5 мМ или от 0,5 до 1 мМ. В некоторых воплощениях среда для культивирования клеток содержит фенилаланин и тирозин в концентрации менее 2 мМ, менее 1 мМ, от 0,1 до 2 мМ, от 0,1 до 1 мМ, от 0,5 до 1,5 мМ или от 0,5 до 1 мМ. В некоторых воплощениях среда для культивирования клеток содержит фенилаланин и триптофан в концентрации менее 2 мМ, менее 1 мМ, от 0,1 до 2 мМ, от 0,1 до 1 мМ, от 0,5 до 1,5 мМ или от 0,5 до 1 мМ. В некоторых воплощениях среда для культивирования клеток содержит фенилаланин и метионин в концентрации менее 2 мМ, менее 1 мМ, от 0,1 до 2 мМ, от 0,1 до 1 мМ, от 0,5

мМ или от 0,5 до 1 мМ. В некоторых воплощениях среда для культивирования клеток содержит семь из фенилаланина, тирозина, триптофана, метионина, лейцина, серина, треонина и глицина в концентрации менее 2 мМ, менее 1 мМ, от 0,1 до 2 мМ, от 0,1 до 1 мМ, от 0,5 до 1,5 мМ или от 0,5 до 1 мМ. В некоторых воплощениях среда для культивирования клеток содержит фенилаланин, тирозин, триптофан, метионин, лейцин, серин, треонин и глицин в концентрации менее 2 мМ, менее 1 мМ, от 0,1 до 2 мМ, от 0,1 до 1 мМ, от 0,5 до 1,5 мМ или от 0,5 до 1 мМ. В некоторых воплощениях среда для культивирования клеток содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 из глицина, валина, лейцина, изолейцина, пролина, серина, треонина, лизина, аргинина, гистидина, аспартата, глутамата и аспарагина в концентрации выше 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 10 мМ, 15 мМ, предпочтительно 2 мМ. В некоторых воплощениях среда для культивирования клеток дополнительно содержит по меньшей мере 5 из глицина, валина, лейцина, изолейцина, пролина, серина, треонина, лизина, аргинина, гистидина, аспартата, глутамата и аспарагина в концентрации выше 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 10 мМ, 15 мМ, предпочтительно 2 мМ. В некоторых воплощениях среда для культивирования клеток дополнительно содержит глицин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, серин, треонин, лизин, аргинин, гистидин, аспартат, глутамат и аспарагин в концентрации выше 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 10 мМ, 15 мМ, предпочтительно 2 мМ. В некоторых воплощениях среда для культивирования клеток дополнительно содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 из валина, изолейцина, пролина, лизина, аргинина, гистидина, аспартата, глутамата и аспарагина в концентрации выше 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 10 мМ, 15 мМ, предпочтительно 2 мМ. В некоторых воплощениях среда для культивирования клеток дополнительно содержит по меньшей мере 5 из валина, изолейцина, пролина, лизина, аргинина, гистидина, аспартата, глутамата и аспарагина в концентрации выше 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 10 мМ, 15 мМ, предпочтительно 2 мМ. В некоторых воплощениях среда для культивирования клеток дополнительно содержит валин, изолейцин, пролин, лизин, аргинин, гистидин, аспартат, глутамат и аспарагин в концентрации выше 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 10 мМ, 15 мМ, предпочтительно 2 мМ. В некоторых воплощениях среда для культивирования клеток содержит серин в концентрации выше 3 мМ, 5 мМ, 7 мМ, 10 мМ, 15 мМ или 20 мМ, предпочтительно 10 мМ. В некоторых воплощениях среда для культивирования клеток содержит валин в концентрации выше 3 мМ, 5 мМ, 7 мМ, 10 мМ, 15 мМ или 20 мМ, предпочтительно 10 мМ. В некоторых воплощениях среда для культивирования клеток содержит цистеин в

концентрации выше 3 мМ, 5 мМ, 7 мМ, 10 мМ, 15 мМ или 20 мМ, предпочтительно 10 мМ. В некоторых воплощениях среда для культивирования клеток содержит изолейцин в концентрации выше 3 мМ, 5 мМ, 7 мМ, 10 мМ, 15 мМ или 20 мМ, предпочтительно 10 мМ. В некоторых воплощениях среда для культивирования клеток содержит лейцин в концентрации выше 3 мМ, 5 мМ, 7 мМ, 10 мМ, 15 мМ или 20 мМ, предпочтительно 10 мМ. В некоторых воплощениях вышеупомянутая среда для культивирования клеток предназначена для применения в способе, описанном в данном документе. В некоторых воплощениях вышеупомянутую среду для культивирования клеток применяют в способе, описанном в данном документе, в качестве базовой среды. В некоторых воплощениях вышеупомянутую среду для культивирования клеток применяют в способе, описанном в данном документе, в качестве подпитывающей среды.

IV. Способы получения

В одном аспекте изобретение включает способ получения полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента. Способ включает культивирование клетки млекопитающего в подходящих условиях, в результате чего экспрессируется полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент. Способ может дополнительно включать сбор полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента из культуры. Способ может дополнительно включать очистку полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента.

В некоторых воплощениях способ обеспечивает получение полипептида или его фрагмента с выходом от 0,1 г/л до 0,5 г/л.

В некоторых воплощениях клетки можно выращивать в периодических культурах или периодических культурах с подпиткой, где культуру останавливают после достижения достаточной экспрессии полипептида, после чего экспрессированный полипептид собирают и возможно очищают. В некоторых воплощениях клетки можно выращивать в перфузионных культурах, когда культуру не останавливают, а периодически или непрерывно добавляют в культуру новые питательные вещества и другие компоненты, при этом периодически или непрерывно собирая экспрессированный полипептид.

В некоторых воплощениях клетки можно выращивать в реакционных сосудах малого масштаба, объем которых варьирует от нескольких миллилитров до нескольких литров. В некоторых воплощениях клетки можно выращивать в крупномасштабных коммерческих биореакторах, объем которых варьирует от приблизительно по меньшей

мере 1 литра до 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10000, 12000 литров или более, или объем может принимать любое значение в указанном диапазоне.

Температуру клеточной культуры выбирают преимущественно на основании диапазона температур, при которых клеточная культура остается жизнеспособной, когда продукция полипептида находится на высоком уровне, температуры, при которой минимизированы продукция или накопление продуктов метаболизма и/или любой комбинации этих или других факторов, которые практикующий специалист считает важными. В качестве примера, не являющегося исчерпывающим, клетки СНО хорошо растут и продуцируют белок или полипептид на высоком уровне при приблизительно 37°C. Как правило, большинство клеток млекопитающих хорошо растут и/или способны продуцировать белок или полипептид на высоком уровне в диапазоне приблизительно от 25°C до 42°C, хотя способы, раскрытые в данном описании, не ограничены указанными температурами. Некоторые клетки млекопитающих хорошо растут и/или способны продуцировать белок или полипептид на высоком уровне в диапазоне приблизительно от 35°C до 40°C. В некоторых воплощениях культуру клеток выращивают при температуре 20°C, 21°C, 22°C, 23°C, 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C или 45°C один или более раз в ходе процесса культивирования клеток.

Термины «культура» и «клеточная культура» в данном описании относятся к популяции клеток, суспендированных в среде в условиях, подходящих для выживания и/или роста клеточной популяции. Специалисту в области техники очевидно, что в некоторых воплощениях указанные термины относятся к комбинации, содержащей популяцию клеток и среду, в которой суспендирована популяция. В некоторых воплощениях клетки в клеточной культуре включают клетки млекопитающего.

Данное изобретение можно применять с любым способом культивирования клеток, который пригоден для желаемого процесса (например, продуцирования рекомбинантного белка (например, антитела)). В качестве примера, не являющегося исчерпывающим, клетки можно выращивать в периодических культурах или периодических культурах с подпиткой, где культуру останавливают после достижения достаточной экспрессии рекомбинантного белка (например, антитела), после чего экспрессированный белок (например, антитело) собирают. В альтернативном варианте, в качестве другого примера, не являющегося исчерпывающим, клетки можно

выращивать непрерывным способом, когда культуру не останавливают, а в культуру периодически или постоянно добавляют новые питательные вещества и другие компоненты, при этом периодически или постоянно собирая экспрессированный рекомбинантный белок (например, антитело). В области техники известны другие подходящие способы, которые можно применять для осуществления данного изобретения (например, культуры в центрифужных пробирках).

В некоторых воплощениях клеточная культура, подходящая для данного изобретения, представляет собой периодическую культуру с подпиткой. Термин «периодическая культура с подпиткой», используемый в данном документе, относится к способу культивирования клеток, в котором в культуру добавляют дополнительные компоненты в момент или моменты времени после начала процесса культивирования. Такие добавляемые компоненты обычно содержат питательные компоненты для клеток, которые истощились в ходе процесса культивирования. Периодическую культуру с подпиткой обычно останавливают в определенный момент, и клетки и/или компоненты среды собирают и возможно очищают. В некоторых воплощениях периодическая культура с подпиткой содержит базовую среду с добавлением подпитывающей среды.

Клетки можно выращивать в любом удобном объеме, выбранном практикующим специалистом. Например, клетки можно выращивать в реакционных сосудах малого масштаба, объем которых варьирует от нескольких миллилитров до нескольких литров. В альтернативном варианте клетки можно выращивать в крупномасштабных коммерческих биореакторах, объем которых варьирует от приблизительно по меньшей мере 1 литра до 10, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10000, 12000, 15000, 20000 или 25000 литров или более, или в любом объеме из указанного диапазона.

Температуру клеточной культуры выбирают преимущественно на основании диапазона температур, при которых клеточная культура остается жизнеспособной, и диапазона, в котором продукция желаемого продукта (например, рекомбинантного белка) находится на высоком уровне. Как правило, большинство клеток млекопитающих хорошо растут и способны продуцировать желаемые продукты (например, рекомбинантные белки) в диапазоне приблизительно от 25°C до 42°C, хотя способы, раскрытые в данном описании, не ограничены указанными температурами. Некоторые клетки млекопитающих хорошо растут и могут продуцировать желаемые продукты (например, рекомбинантные белки или антитела) в диапазоне приблизительно от 35°C до 40°C. В некоторых воплощениях клеточную культуру выращивают при температуре

20°C, 21°C, 22°C, 23°C, 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C или 45°C один или более раз в ходе процесса культивирования клеток. Специалист в области техники сможет выбрать соответствующую температуру или температуры, при которых выращивать клетки, в зависимости от конкретных потребностей клеток и конкретных требований практикующего специалиста к продукции. Клетки можно выращивать в течение любого времени, в зависимости от требований практикующего специалиста и потребностей самих клеток. В некоторых воплощениях клетки выращивают при 37°C. В некоторых воплощениях клетки выращивают при 36,5°C.

В некоторых воплощениях клетки можно выращивать в течение начальной фазы роста (или фазы роста) в течение большего или меньшего времени, в зависимости от требований практикующего специалиста и потребностей самих клеток. В некоторых воплощениях клетки выращивают в течение периода времени, достаточного для достижения предварительно установленной плотности клеток. В некоторых воплощениях клетки выращивают в течение периода времени, достаточного для достижения плотности клеток, которая представляет собой заданный процент от максимальной плотности клеток, которую клетки очевидно достигнут, если не мешать их росту. Например, клетки можно выращивать в течение периода времени, достаточного для достижения желаемой плотности жизнеспособных клеток, составляющей 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 99 процентов от максимальной плотности клеток. В некоторых воплощениях клетки выращивают до тех пор, пока плотность клеток не увеличится более, чем на 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% за сутки культивирования. В некоторых воплощениях клетки выращивают до тех пор, пока плотность клеток не увеличится более, чем на 5% за сутки культивирования.

В некоторых воплощениях клеткам позволяют расти в течение определенного периода времени. Например, в зависимости от начальной концентрации клеточной культуры, температуры, при которой выращивают клетки, и присущей клеткам скорости роста, клетки можно выращивать в течение 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более суток, предпочтительно в течение от 4 до 10 суток. В некоторых случаях клеткам можно позволять расти в течение месяца или более. Специалист, осуществляющий данное изобретение, сможет выбрать продолжительность

начальной фазы роста, в зависимости от требований к продуцированию белка и потребностей самих клеток.

Культуру клеток можно перемешивать или встряхивать во время начальной фазы культивирования для увеличения оксигенации и распределения питательных веществ к клеткам. В соответствии с данным изобретением специалист в области техники поймет, что может быть полезным контролировать или регулировать некоторые условия внутри биореактора в ходе начальной фазы роста, включая, без ограничения, рН, температуру, оксигенацию и так далее.

В конце начальной фазы роста по меньшей мере одно из условий культивирования можно сдвинуть таким образом, чтобы реализовалась вторая комбинация условий культивирования, и в культуре произошел метаболический сдвиг. Метаболический сдвиг может достигаться, например, за счет изменения температуры, рН, осмоляльности или уровня химического индуктора в клеточной культуре. В воплощении, не являющемся ограничивающим, условия культивирования сдвигаются в результате сдвига температуры культуры. Однако, как известно в области техники, сдвиг температуры не является единственным механизмом, обеспечивающим соответствующий метаболический сдвиг. Например, такой метаболический сдвиг может также достигаться в результате сдвига других условий культивирования, включая рН, осмоляльность и уровень бутирата натрия, но не ограничиваясь перечисленным. Время изменения культивирования будет определяться специалистом, осуществляющим данное изобретение, в зависимости от требований к продуцированию белка и потребностей самих клеток.

При сдвиге температуры культуры сдвиг температуры может быть относительно постепенным. Например, может потребоваться несколько часов или суток для завершения изменения температуры. В альтернативном варианте сдвиг температуры культуры может быть относительно резким. Например, изменение температуры может завершиться менее чем за несколько часов. При наличии соответствующего оборудования для продуцирования и контроля, такого которое является стандартным для коммерческой крупномасштабной продукции полипептидов или белков, изменение температуры может завершиться даже менее чем за час.

В некоторых воплощениях, как только произойдет сдвиг условий культивирования клеток, как обсуждалось выше, культуру клеток поддерживают на следующей фазе продуцирования при второй комбинации условий культивирования,

обеспечивающих выживание и жизнеспособность культуры клеток и необходимых для экспрессии желаемого полипептида или белка на достаточных с коммерческой точки зрения уровнях.

Как обсуждалось выше, сдвиг в культуре может осуществляться в результате сдвига одного или более из нескольких условий культивирования, включая температуру, pH, осмоляльность и уровень бутирата натрия, но не ограничиваясь перечисленным. В некоторых воплощениях происходит сдвиг температуры культуры. Согласно данному воплощению в ходе последующей фазы продуцирования культуру поддерживают при температуре или диапазоне температур, которые ниже, чем температура или диапазон температур в начальной фазе роста. Как обсуждалось выше, можно производить несколько отдельных сдвигов температуры для увеличения плотности клеток или жизнеспособности или для увеличения экспрессии рекомбинантного белка.

В некоторых воплощениях клетки можно поддерживать на следующей фазе продуцирования до достижения желаемой плотности клеток или титра продукта. В другом воплощении данного изобретения клеткам позволяют расти в течение определенного периода времени в ходе последующей фазы продуцирования. Например, в зависимости от концентрации клеточной культуры на старте последующей фазы роста, температуры, при которой выращивают клетки, и присущей клеткам скорости роста, клетки можно выращивать в течение 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более суток. В некоторых случаях клеткам можно позволять расти в течение месяца или более. Специалист, осуществляющий данное изобретение, сможет выбрать продолжительность последующей фазы продуцирования в зависимости от требований к продуцированию белка и потребностей самих клеток.

Культуру клеток можно перемешивать или встряхивать во время последующей фазы продуцирования для увеличения оксигенации и распределения питательных веществ к клеткам. В соответствии с данным изобретением специалист в области техники поймет, что может быть полезным контролировать или регулировать некоторые условия внутри биореактора в ходе последующей фазы продуцирования, включая, без ограничения, pH, температуру, оксигенацию и так далее.

В некоторых воплощениях клетки экспрессируют рекомбинантный белок, и способ культивирования клеток по данному изобретению включает фазу роста и фазу продуцирования.

В некоторых воплощениях стадию (ii) любого из описанных здесь способов

осуществляют на протяжении всего способа культивирования клеток. В некоторых воплощениях стадию (ii) любого из описанных здесь способов осуществляют на протяжении части способа культивирования клеток. В некоторых воплощениях стадию (ii) осуществляют до тех пор, пока не будет достигнута предварительно установленная плотность жизнеспособных клеток.

В некоторых воплощениях способ культивирования клеток по изобретению включает фазу роста и фазу продуцирования, и стадию (ii) осуществляют в ходе фазы роста. В некоторых воплощениях способ культивирования клеток по изобретению включает фазу роста и фазу продуцирования, а стадию (ii) осуществляют в ходе части фазы роста. В некоторых воплощениях способ культивирования клеток по изобретению включает фазу роста и фазу продуцирования, а стадию (ii) осуществляют в ходе фазы роста и фазы продуцирования.

На стадии (ii) любого из раскрытых здесь способов термин «поддержание» может относиться к поддержанию концентрации аминокислот или метаболитов ниже C1 или C2 в течение всего процесса культивирования (до сбора) или в течение части процесса культивирования, например в ходе фазы роста, части фазы роста или до достижения предварительного установленной плотности клеток.

В некоторых воплощениях любого из указанных выше способов рост клеток и/или продуктивность повышены по сравнению с контрольной культурой, указанная контрольная культура может быть идентичной, за исключением того, что она не включает стадию (ii).

В некоторых воплощениях любого из указанных способов способ по изобретению представляет собой способ для улучшения клеточного роста. В некоторых воплощениях любого из указанных способов способ по изобретению представляет собой способ для улучшения клеточного роста в культуре клеток с высокой плотностью при высокой плотности клеток.

Высокая плотность клеток здесь обозначает плотность клеток выше 1×10^6 клеток/мл, 5×10^6 клеток/мл, 1×10^7 клеток/мл, 5×10^7 клеток/мл, 1×10^8 клеток/мл или 5×10^8 клеток/мл, предпочтительно выше 1×10^7 клеток/мл, более предпочтительно 5×10^7 клеток/мл.

В некоторых воплощениях способ по изобретению представляет собой способ улучшения клеточного роста в культуре клеток, где плотность клеток превышает 1×10^6 клеток/мл, 5×10^6 клеток/мл, 1×10^7 клеток/мл, 5×10^7 клеток/мл, 1×10^8 клеток/мл или

5×10^8 клеток/мл. В некоторых воплощениях способ по изобретению представляет собой способ улучшения клеточного роста в культуре клеток, где максимальная плотность клеток превышает 1×10^6 клеток/мл, 5×10^6 клеток/мл, 1×10^7 клеток/мл, 5×10^7 клеток/мл, 1×10^8 клеток/мл или 5×10^8 клеток/мл.

В некоторых воплощениях рост клеток определяется плотностью жизнеспособных клеток (VCD), максимальной плотностью жизнеспособных клеток или интегральным количеством жизнеспособных клеток (IVCC). В некоторых воплощениях рост клеток определяется максимальной плотностью жизнеспособных клеток.

Термин «плотность жизнеспособных клеток» в данном документе относится к количеству клеток, присутствующих в заданном объеме среды. Плотность жизнеспособных клеток можно измерять любым способом, известным специалисту в области техники. Предпочтительно, плотность жизнеспособных клеток измеряют с применением автоматического счетчика клеток, такого как Bioprofile Flex®. Термин «максимальная плотность клеток», используемый в данном документе, относится к максимальной плотности клеток, достигаемой в клеточной культуре. Термин «жизнеспособность клеток», используемый в данном документе, относится к способности клеток в культуре выживать при заданной комбинации условий культивирования или вариациях эксперимента. Специалист в области техники поймет, что данное изобретение охватывает один из многочисленных способов определения жизнеспособности клеток. Например, для определения жизнеспособности клеток можно использовать краситель (например, трипановый синий), который не проникает через мембрану живой клетки, но может проникать через разрушенную мембрану умирающей клетки.

Термин «интегральное количество жизнеспособных клеток (IVCC)», используемый в данном документе, относится к площади под кривой плотности жизнеспособных клеток (VCD). IVCC можно рассчитывать согласно следующей формуле: $IVCC_{t+1} = IVCC_t + (VCD_t + VCD_{t+1}) * (\Delta t) / 2$, где Δt представляет собой разницу между моментами времени t и $t+1$. $IVCC_{t=0}$ можно пренебречь. VCD_t и VCD_{t+1} представляют собой плотности жизнеспособных клеток в моменты времени t и $t+1$.

Термин «титр» в данном документе относится, например, к общему количеству рекомбинантно экспрессируемого белка, продуцируемого культурой клеток в заданном объеме среды. Обычно титр выражается в единицах, представляющих собой грамм белка на литр среды.

В некоторых воплощениях рост клеток увеличивается по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20% или 25% по сравнению с контрольной культурой. В некоторых воплощениях рост клеток увеличивается по меньшей мере на 10% по сравнению с контрольной культурой. В некоторых воплощениях рост клеток увеличивается по меньшей мере на 20% по сравнению с контрольной культурой.

В некоторых воплощениях продуктивность определяется титром и/или объемной продуктивностью.

Термин «титр» в данном документе относится, например, к общему количеству рекомбинантно экспрессируемого белка, продуцируемого культурой клеток в заданном объеме среды. Обычно титр выражается в единицах, представляющих собой грамм белка на литр среды.

В некоторых воплощениях продуктивность определяется по титру. В некоторых воплощениях продуктивность увеличивается по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20% или 25% по сравнению с контрольной культурой. В некоторых воплощениях продуктивность увеличивается по меньшей мере на 10% по сравнению с контрольной культурой. В некоторых воплощениях продуктивность увеличивается по меньшей мере на 20% по сравнению с контрольной культурой.

В некоторых воплощениях максимальная плотность клеток в клеточной культуре превышает 1×10^6 клеток/мл, 5×10^6 клеток/мл, 1×10^7 клеток/мл, 5×10^7 клеток/мл, 1×10^8 клеток/мл или 5×10^8 клеток/мл. В некоторых воплощениях максимальная плотность клеток в клеточной культуре превышает 5×10^6 клеток/мл. В некоторых воплощениях максимальная плотность клеток в клеточной культуре превышает 1×10^8 клеток/мл.

V. Очистка

В некоторых воплощениях способ продуцирования полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента, включает выделение и/или очистку полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента. В некоторых воплощениях экспрессированный полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент секретируется в среду и, следовательно, клетки и другие твердые вещества можно удалять путем центрифугирования и/или фильтрования.

Полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент, полученные описанными здесь способами, могут быть собраны из клеток-хозяев и очищены с применением любого подходящего способа. Подходящие способы для очистки полипептида или его фрагмента включают преципитацию и различные виды

хроматографии, такие как хроматография гидрофобных взаимодействий, ионообменная, аффинная, комплексообразовательная и эксклюзионная хроматография, все из которых известны в области техники. Подходящие схемы очистки могут включать два или более из указанных или других подходящих способов. В некоторых воплощениях один или более полипептидов или их фрагментов, имеющие происхождение из *E. coli*, могут включать «метку», облегчающую очистку, такую как эпитопная метка или HIS-метка, Strep-метка. Такие несущие метки полипептиды можно удобно очищать, например, из кондиционированной среды, посредством комплексообразовательной хроматографии или аффинной хроматографии. Возможно, последовательность метки можно отщеплять после очистки.

В некоторых воплощениях полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент могут включать метку для аффинной очистки. Метки для аффинной очистки известны в области техники. Примеры включают, например, His-метку (связывается с ионом металла), антитело, связывающий мальтозу белок (MBP) (связывается с амилозой), глутатион-S-трансферазу (GST) (связывается с глутатионом), FLAG-метку, Strep-метку (связывается со стрептавидином или его производным).

В предпочтительном воплощении полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент не включают метку для очистки.

В некоторых воплощениях выход полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента составляет по меньшей мере приблизительно 1 мг/л, по меньшей мере приблизительно 2 мг/л, по меньшей мере приблизительно 3 мг/л, по меньшей мере приблизительно 4 мг/л, по меньшей мере приблизительно 5 мг/л, по меньшей мере приблизительно 6 мг/л, по меньшей мере приблизительно 7 мг/л, по меньшей мере приблизительно 8 мг/л, по меньшей мере приблизительно 9 мг/л, по меньшей мере приблизительно 10 мг/л, по меньшей мере приблизительно 11 мг/л, по меньшей мере приблизительно 12 мг/л, по меньшей мере приблизительно 13 мг/л, по меньшей мере приблизительно 14 мг/л, по меньшей мере приблизительно 15 мг/л, по меньшей мере приблизительно 16 мг/л, по меньшей мере приблизительно 17 мг/л, по меньшей мере приблизительно 18 мг/л, по меньшей мере приблизительно 19 мг/л, по меньшей мере приблизительно 20 мг/л, по меньшей мере приблизительно 25 мг/л, по меньшей мере приблизительно 30 мг/л, по меньшей мере приблизительно 35 мг/л, по меньшей мере приблизительно 40 мг/л, по меньшей мере приблизительно 45 мг/л, по меньшей мере приблизительно 50 мг/л, по меньшей мере приблизительно 55 мг/л, по меньшей мере

приблизительно 60 мг/л, по меньшей мере приблизительно 65 мг/л, по меньшей мере приблизительно 70 мг/л, по меньшей мере приблизительно 75 мг/л, по меньшей мере приблизительно 80 мг/л, по меньшей мере приблизительно 85 мг/л, по меньшей мере приблизительно 90 мг/л, по меньшей мере приблизительно 95 мг/л или по меньшей мере приблизительно 100 мг/л.

В некоторых воплощениях размеры культуры составляют по меньшей мере приблизительно 10 л, например, объем составляет по меньшей мере приблизительно 10 л, по меньшей мере приблизительно 20 л, по меньшей мере приблизительно 30 л, по меньшей мере приблизительно 40 л, по меньшей мере приблизительно 50 л, по меньшей мере приблизительно 60 л, по меньшей мере приблизительно 70 л, по меньшей мере приблизительно 80 л, по меньшей мере приблизительно 90 л, по меньшей мере приблизительно 100 л, по меньшей мере приблизительно 150 л, по меньшей мере приблизительно 200 л, по меньшей мере приблизительно 250 л, по меньшей мере приблизительно 300 л, по меньшей мере приблизительно 400 л, по меньшей мере приблизительно 500 л, по меньшей мере приблизительно 600 л, по меньшей мере приблизительно 700 л, по меньшей мере приблизительно 800 л, по меньшей мере приблизительно 900 л, по меньшей мере приблизительно 1000 л, по меньшей мере приблизительно 2000 л, по меньшей мере приблизительно 3000 л, по меньшей мере приблизительно 4000 л, по меньшей мере приблизительно 5000 л, по меньшей мере приблизительно 6000 л, по меньшей мере приблизительно 10000 л, по меньшей мере приблизительно 15000 л, по меньшей мере приблизительно 20000 л, по меньшей мере приблизительно 25000 л, по меньшей мере приблизительно 30000 л, по меньшей мере приблизительно 35000 л, по меньшей мере приблизительно 40000 л, по меньшей мере приблизительно 45000 л, по меньшей мере приблизительно 50000 л, по меньшей мере приблизительно 55000 л, по меньшей мере приблизительно 60000 л, по меньшей мере приблизительно 65000 л, по меньшей мере приблизительно 70000 л, по меньшей мере приблизительно 75000 л, по меньшей мере приблизительно 80000 л, по меньшей мере приблизительно 85000 л, по меньшей мере приблизительно 90000 л, по меньшей мере приблизительно 95000 л, по меньшей мере приблизительно 100000 л и так далее.

VI. Композиции и составы

В одном аспекте изобретение включает композицию, включающую полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент. В некоторых воплощениях композиция вызывает иммунный ответ, включающий антитела, который может

обеспечивать иммунитет к патогенным видам *E. coli*.

В некоторых воплощениях композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент в качестве единственного антигена. В некоторых воплощениях композиция не включает конъюгат.

В некоторых воплощениях композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент и дополнительный антиген. В некоторых воплощениях композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент и дополнительный антиген *E. coli*. В некоторых воплощениях композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент и гликоконъюгат из *E. coli*.

В некоторых воплощениях полипептид или его фрагмент имеют происхождение из FimH *E. coli*.

В некоторых воплощениях композиция включает полипептид, имеющий происхождение из FimC *E. coli*, или его фрагмент.

В некоторых воплощениях композиция включает полипептид, имеющий происхождение из FimH *E. coli*, или его фрагмент; полипептид, имеющий происхождение из FimC *E. coli*, или его фрагмент.

В одном аспекте изобретение включает композицию, содержащую полипептид, имеющий происхождение из FimH или его фрагмента, и сахарид, содержащий структуру, выбранную из любой из Формулы O1 (например, Формулы O1A, Формулы O1B и Формулы O1C), Формулы O2, Формулы O3, Формулы O4 (например, Формулы O4:K52 и Формулы O4:K6), Формулы O5 (например, Формулы O5ab и Формулы O5ac (штамм 180/C3)), Формулы O6 (например, Формулы O6:K2; K13; K15 и Формулы O6:K54), Формулы O7, Формулы O8, Формулы O9, Формулы O10, Формулы O11, Формулы O12, Формулы O13, Формулы O14, Формулы O15, Формулы O16, Формулы O17, Формулы O18 (например, Формулы O18A, Формулы O18ac, Формулы O18A1, Формулы O18B и Формулы O18B1), Формулы O19, Формулы O20, Формулы O21, Формулы O22, Формулы O23 (например, Формулы O23A), Формулы O24, Формулы O25 (например, Формулы O25a и Формулы O25b), Формулы O26, Формулы O27, Формулы O28, Формулы O29, Формулы O30, Формулы O32, Формулы O33, Формулы O34, Формулы O35, Формулы O36, Формулы O37, Формулы O38, Формулы O39, Формулы O40, Формулы O41, Формулы O42, Формулы O43, Формулы O44, Формулы O45 (например, Формулы O45 и Формулы O45rel), Формулы O46, Формулы O48, Формулы O49, Формулы O50, Формулы

O51, Формулы O52, Формулы O53, Формулы O54, Формулы O55, Формулы O56, Формулы O57, Формулы O58, Формулы O59, Формулы O60, Формулы O61, Формулы O62, Формулы 62D₁, Формулы O63, Формулы O64, Формулы O65, Формулы O66, Формулы O68, Формулы O69, Формулы O70, Формулы O71, Формулы O73 (например, Формулы O73 (штамм 73-1)), Формулы O74, Формулы O75, Формулы O76, Формулы O77, Формулы O78, Формулы O79, Формулы O80, Формулы O81, Формулы O82, Формулы O83, Формулы O84, Формулы O85, Формулы O86, Формулы O87, Формулы O88, Формулы O89, Формулы O90, Формулы O91, Формулы O92, Формулы O93, Формулы O95, Формулы O96, Формулы O97, Формулы O98, Формулы O99, Формулы O100, Формулы O101, Формулы O102, Формулы O103, Формулы O104, Формулы O105, Формулы O106, Формулы O107, Формулы O108, Формулы O109, Формулы O110, Формулы O111, Формулы O112, Формулы O113, Формулы O114, Формулы O115, Формулы O116, Формулы O117, Формулы O118, Формулы O119, Формулы O120, Формулы O121, Формулы O123, Формулы O124, Формулы O125, Формулы O126, Формулы O127, Формулы O128, Формулы O129, Формулы O130, Формулы O131, Формулы O132, Формулы O133, Формулы O134, Формулы O135, Формулы O136, Формулы O137, Формулы O138, Формулы O139, Формулы O140, Формулы O141, Формулы O142, Формулы O143, Формулы O144, Формулы O145, Формулы O146, Формулы O147, Формулы O148, Формулы O149, Формулы O150, Формулы O151, Формулы O152, Формулы O153, Формулы O154, Формулы O155, Формулы O156, Формулы O157, Формулы O158, Формулы O159, Формулы O160, Формулы O161, Формулы O162, Формулы O163, Формулы O164, Формулы O165, Формулы O166, Формулы O167, Формулы O168, Формулы O169, Формулы O170, Формулы O171, Формулы O172, Формулы O173, Формулы O174, Формулы O175, Формулы O176, Формулы O177, Формулы O178, Формулы O179, Формулы O180, Формулы O181, Формулы O182, Формулы O183, Формулы O184, Формулы O185, Формулы O186 и Формулы O187, где n представляет собой целое число от 1 до 100.

В некоторых воплощениях композиция включает любой из раскрытых здесь сахаридов. В предпочтительных воплощениях композиция включает любой из раскрытых здесь конъюгатов.

В некоторых воплощениях композиция включает по меньшей мере один гликоконъюгат из *E. coli* серотипа O25, предпочтительно серотипа O25b. В одном воплощении композиция включает по меньшей мере один гликоконъюгат из *E. coli*

серотипа O1, предпочтительно серотипа O1a. В одном воплощении композиция включает по меньшей мере один гликоконъюгат из *E. coli* серотипа O2. В одном воплощении композиция включает по меньшей мере один гликоконъюгат из *E. coli* серотипа O6.

В одном воплощении композиция включает по меньшей мере один гликоконъюгат, выбранный из любого из следующих серотипов *E. coli*: O25, O1, O2 и O6, предпочтительно O25b, O1a, O2 и O6. В одном воплощении композиция включает по меньшей мере два гликоконъюгата, выбранных из любого из следующих серотипов *E. coli*: O25, O1, O2 и O6, предпочтительно O25b, O1a, O2 и O6. В одном воплощении композиция включает по меньшей мере три гликоконъюгата, выбранных из любого из следующих серотипов *E. coli*: O25, O1, O2 и O6, предпочтительно O25b, O1a, O2 и O6. В одном воплощении композиция включает гликоконъюгат каждого из следующих серотипов *E. coli*: O25, O1, O2 и O6, предпочтительно O25b, O1a, O2 и O6.

В предпочтительном воплощении гликоконъюгат любой из указанных выше композиций индивидуально конъюгирован с CRM₁₉₇.

Соответственно, в некоторых воплощениях композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и O-антиген из по меньшей мере одного серотипа *E. coli*. В предпочтительном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и O-антиген из более чем одного серотипа *E. coli*. Например, композиция может включать O-антиген из двух различных серотипов (или "v", валентностей) *E. coli* до 12 различных серотипов (12v). В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и O-антиген из 3 различных серотипов. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и O-антиген из 4 различных серотипов. В одном воплощении композиция включает O-антиген из 5 различных серотипов *E. coli*. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и O-антиген из 6 различных серотипов *E. coli*. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и O-антиген из 7 различных серотипов *E. coli*. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и O-антиген из 8 различных серотипов *E. coli*. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и O-антиген из 9 различных серотипов *E.*

coli. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и О-антиген из 10 различных серотипов *E. coli*. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и О-антиген из 11 различных серотипов *E. coli*. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и О-антиген из 12 различных серотипов. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и О-антиген из 13 различных серотипов. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и О-антиген из 14 различных серотипов. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и О-антиген из 15 различных серотипов. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и О-антиген из 16 различных серотипов. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и О-антиген из 17 различных серотипов. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и О-антиген из 18 различных серотипов. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и О-антиген из 19 различных серотипов. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и О-антиген из 20 различных серотипов.

Предпочтительно, количество сахаридов *E. coli* может варьировать от 1 серотипа (или "v", валентности) до 26 различных серотипов (26v). В одном воплощении присутствует один серотип. В одном воплощении присутствует 2 различных серотипа. В одном воплощении присутствует 3 различных серотипа. В одном воплощении присутствует 4 различных серотипа. В одном воплощении присутствует 5 различных серотипов. В одном воплощении присутствует 6 различных серотипов. В одном воплощении присутствует 7 различных серотипов. В одном воплощении присутствует 8 различных серотипов. В одном воплощении присутствует 9 различных серотипов. В одном воплощении присутствует 10 различных серотипов. В одном воплощении присутствует 11 различных серотипов. В одном воплощении присутствует 12 различных серотипов. В одном воплощении присутствует 13 различных серотипов. В одном воплощении присутствует 14 различных серотипов. В одном воплощении присутствует

15 различных серотипов. В одном воплощении присутствует 16 различных серотипов. В одном воплощении присутствует 17 различных серотипов. В одном воплощении присутствует 18 различных серотипов. В одном воплощении присутствует 19 различных серотипов. В одном воплощении присутствует 20 различных серотипов. В одном воплощении присутствует 21 различных серотипов. В одном воплощении присутствует 22 различных серотипов. В одном воплощении присутствует 23 различных серотипов. В одном воплощении присутствует 24 различных серотипов. В одном воплощении присутствует 25 различных серотипов. В одном воплощении присутствует 26 различных серотипов. Сахариды конъюгированы с белком-носителем с образованием гликоконъюгатов, как описано в данном документе.

В одном аспекте композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и гликоконъюгат, который включает О-антиген из по меньшей мере одной серогруппы *E. coli*, где О-антиген конъюгирован с белком-носителем. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и О-антиген из более чем 1 серотипа *E. coli*, где каждый О-антиген конъюгирован с белком-носителем. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и О-антиген из 2 различных серотипов *E. coli*, где каждый О-антиген конъюгирован с белком-носителем. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и О-антиген из 3 различных серотипов *E. coli*, где каждый О-антиген конъюгирован с белком-носителем. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и О-антиген из 4 различных серотипов *E. coli*, где каждый О-антиген конъюгирован с белком-носителем. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и О-антиген из 5 различных серотипов *E. coli*, где каждый О-антиген конъюгирован с белком-носителем. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и О-антиген из 6 различных серотипов *E. coli*, где каждый О-антиген конъюгирован с белком-носителем. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и О-антиген из 7 различных серотипов *E. coli*, где каждый О-антиген конъюгирован с белком-носителем. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и О-антиген из 8 различных серотипов *E. coli*, где каждый О-антиген конъюгирован с белком-носителем.

каждый О-полисахарид конъюгирован с белком-носителем и где О-полисахарид включает О-антиген и коровый сахарид. В одном воплощении композиция включает О-полисахарид из 15 различных серотипов, где каждый О-полисахарид конъюгирован с белком-носителем и где О-полисахарид включает О-антиген и коровый сахарид. В одном воплощении композиция включает О-полисахарид из 16 различных серотипов, где каждый О-полисахарид конъюгирован с белком-носителем и где О-полисахарид включает О-антиген и коровый сахарид. В одном воплощении композиция включает О-полисахарид из 17 различных серотипов, где каждый О-полисахарид конъюгирован с белком-носителем и где О-полисахарид включает О-антиген и коровый сахарид. В одном воплощении композиция включает О-полисахарид из 18 различных серотипов, где каждый О-полисахарид конъюгирован с белком-носителем и где О-полисахарид включает О-антиген и коровый сахарид. В одном воплощении композиция включает О-полисахарид из 19 различных серотипов, где каждый О-полисахарид конъюгирован с белком-носителем и где О-полисахарид включает О-антиген и коровый сахарид. В одном воплощении композиция включает О-полисахарид из 20 различных серотипов, где каждый О-полисахарид конъюгирован с белком-носителем и где О-полисахарид включает О-антиген и коровый сахарид. В предпочтительном воплощении белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇.

В другом предпочтительном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и О-полисахарид, конъюгированный с CRM₁₉₇, где О-полисахарид включает Формулу O25a, где *n* составляет по меньшей мере 40, и коровый сахарид. В предпочтительном воплощении композиция дополнительно включает О-полисахарид, конъюгированный с CRM₁₉₇, где О-полисахарид включает Формулу O25b, где *n* составляет по меньшей мере 40, и коровый сахарид. В другом воплощении композиция дополнительно включает О-полисахарид, конъюгированный с CRM₁₉₇, где О-полисахарид включает Формулу O1a, где *n* составляет по меньшей мере 40, и коровый сахарид. В другом воплощении композиция дополнительно включает О-полисахарид, конъюгированный с CRM₁₉₇, где О-полисахарид включает Формулу O2, где *n* составляет по меньшей мере 40, и коровый сахарид. В другом воплощении композиция дополнительно включает О-полисахарид, конъюгированный с CRM₁₉₇, где О-полисахарид включает Формулу O6, где *n* составляет по меньшей мере 40, и коровый сахарид.

В другом воплощении композиция дополнительно включает О-полисахарид,

конъюгированный с CRM₁₉₇, где О-полисахарид включает Формулу O17, где *n* составляет по меньшей мере 40, и коровый сахарид. В другом воплощении композиция дополнительно включает О-полисахарид, конъюгированный с CRM₁₉₇, где О-полисахарид включает Формулу O15, где *n* составляет по меньшей мере 40, и коровый сахарид. В другом воплощении композиция дополнительно включает О-полисахарид, конъюгированный с CRM₁₉₇, где О-полисахарид включает Формулу O18A, где *n* составляет по меньшей мере 40, и коровый сахарид. В другом воплощении композиция дополнительно включает О-полисахарид, конъюгированный с CRM₁₉₇, где О-полисахарид включает Формулу O75, где *n* составляет по меньшей мере 40, и коровый сахарид. В другом воплощении композиция дополнительно включает О-полисахарид, конъюгированный с CRM₁₉₇, где О-полисахарид включает Формулу O4, где *n* составляет по меньшей мере 40, и коровый сахарид. В другом воплощении композиция дополнительно включает О-полисахарид, конъюгированный с CRM₁₉₇, где О-полисахарид включает Формулу O16, где *n* составляет по меньшей мере 40, и коровый сахарид. В другом воплощении композиция дополнительно включает О-полисахарид, конъюгированный с CRM₁₉₇, где О-полисахарид включает Формулу O13, где *n* составляет по меньшей мере 40, и коровый сахарид. В другом воплощении композиция дополнительно включает О-полисахарид, конъюгированный с CRM₁₉₇, где О-полисахарид включает Формулу O7, где *n* составляет по меньшей мере 40, и коровый сахарид.

В другом воплощении композиция дополнительно включает О-полисахарид, конъюгированный с CRM₁₉₇, где О-полисахарид включает Формулу O8, где *n* составляет по меньшей мере 40, и коровый сахарид. В другом воплощении О-полисахарид включает Формулу O8, где *n* составляет 1-20, предпочтительно 2-5, более предпочтительно 3. Формула O8 показана, например, на Фиг. 10B. В другом воплощении композиция дополнительно включает О-полисахарид, конъюгированный с CRM₁₉₇, где О-полисахарид включает Формулу O9, где *n* составляет по меньшей мере 40, и коровый сахарид. В другом воплощении О-полисахарид включает Формулу O9, где *n* составляет 1-20, предпочтительно 4-8, более предпочтительно 5. Формула O9 показана, например, на Фиг. 10B. В другом воплощении О-полисахарид включает Формулу O9a, где *n* составляет 1-20, предпочтительно 4-8, более предпочтительно 5. Формула O9 показана, например, на Фиг. 10B.

В некоторых воплощениях О-полисахарид включает любую выбранную из

Формулы O20ab, Формулы O20ac, Формулы O52, Формулы O97 и Формулы O101, где n составляет 1-20, предпочтительно 4-8, более предпочтительно 5. См., например, Фиг. 10B.

Как описано выше, композиция может включать полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и любую комбинацию конъюгированных O-полисахаридов (антигенов). В одном приведенном в качестве примера воплощении композиция включает полисахарид, включающий Формулу O25b, полисахарид, включающий Формулу O1A, полисахарид, включающий Формулу O2, и полисахарид, включающий Формулу O6. Более конкретно, такая композиция включает: (i) O-полисахарид, конъюгированный с CRM₁₉₇, где O-полисахарид включает Формулу O25b, где n составляет по меньшей мере 40, и коровый сахарид; (ii) O-полисахарид, конъюгированный с CRM₁₉₇, где O-полисахарид включает Формулу O1a, где n составляет по меньшей мере 40, и коровый сахарид; (iii) O-полисахарид, конъюгированный с CRM₁₉₇, где O-полисахарид включает Формулу O2, где n составляет по меньшей мере 40, и коровый сахарид; и (iv) O-полисахарид, конъюгированный с CRM₁₉₇, где O-полисахарид включает Формулу O6, где n составляет по меньшей мере 40, и коровый сахарид.

В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и по меньшей мере один O-полисахарид, имеющий происхождение из *E. coli* любого серотипа, где серотип не представляет собой O25a. Например, в одном воплощении композиция не включает сахарид, включающий Формулу O25a. Такая композиция может включать, например, O-полисахарид, включающий Формулу O25b, O-полисахарид, включающий Формулу O1A, O-полисахарид, включающий Формулу O2, и O-полисахарид, включающий Формулу O6.

В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и O-полисахарид из 2 различных серотипов *E. coli*, где каждый O-полисахарид конъюгирован с CRM₁₉₇, и где O-полисахарид включает O-антиген и коровый сахарид. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и O-полисахарид из 3 различных серотипов *E. coli*, где каждый O-полисахарид конъюгирован с CRM₁₉₇, и где O-полисахарид включает O-антиген и коровый сахарид. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и O-полисахарид из 4 различных серотипов *E. coli*, где каждый O-полисахарид

включает О-антиген и коровый сахарид. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и О-полисахарид из 15 различных серотипов, где каждый О-полисахарид конъюгирован с CRM₁₉₇, и где О-полисахарид включает О-антиген и коровый сахарид. В другом воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и О-полисахарид из 16 различных серотипов, где каждый О-полисахарид конъюгирован с CRM₁₉₇, и где О-полисахарид включает О-антиген и коровый сахарид. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и О-полисахарид из 17 различных серотипов, где каждый О-полисахарид конъюгирован с CRM₁₉₇, и где О-полисахарид включает О-антиген и коровый сахарид. В другом воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и О-полисахарид из 18 различных серотипов, где каждый О-полисахарид конъюгирован с CRM₁₉₇, и где О-полисахарид включает О-антиген и коровый сахарид. В одном воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и О-полисахарид из 19 различных серотипов, где каждый О-полисахарид конъюгирован с CRM₁₉₇, и где О-полисахарид включает О-антиген и коровый сахарид. В другом воплощении композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и О-полисахарид из 20 различных серотипов, где каждый О-полисахарид конъюгирован с CRM₁₉₇, и где О-полисахарид включает О-антиген и коровый сахарид.

В одном аспекте изобретение относится к композиции, включающей полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и конъюгат, включающий сахарид, ковалентно связанный с белком-носителем, где сахарид включает Формулу O25b, где n составляет 15 ± 2 . В другом аспекте изобретение относится к композиции, включающей полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и конъюгат, включающий сахарид, ковалентно связанный с белком-носителем, где сахарид включает Формулу O25b, где n составляет 17 ± 2 . В другом аспекте изобретение относится к композиции, включающей полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и конъюгат, включающий сахарид, ковалентно связанный с белком-носителем, где сахарид включает Формулу O25b, где n составляет 55 ± 2 . В другом аспекте изобретение относится к композиции, включающей полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и конъюгат, включающий сахарид, ковалентно связанный с белком-носителем, где сахарид включает Формулу O25b, где n

составляет 51 ± 2 . В одном воплощении сахарид дополнительно включает группировку R1 корового сахара *E. coli*. В другом воплощении сахарид дополнительно включает группировку K12 корового сахара *E. coli*. В другом воплощении сахарид дополнительно включает группировку KDO. Более предпочтительно, белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇. В одном воплощении конъюгат получают посредством конъюгирования с присоединением одним концом. В другом воплощении конъюгат получают посредством реакции восстановительного аминирования, предпочтительно в буфере DMSO (диметилсульфоксид). В одном воплощении сахарид конъюгирован с белком-носителем через спейсер (2-((2-оксоэтил)тио)этил)карбамат (eTEC). Предпочтительно, композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый разбавитель.

В одном воплощении иммуногенная композиция вызывает у человека продуцирование IgG антител, указанные антитела способны связываться с полисахаридом *E. coli* серотипа O25B в концентрации по меньшей мере 0,2 пг/мл, 0,3 пг/мл, 0,35 пг/мл, 0,4 пг/мл или 0,5 пг/мл при определении методом ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ). Таким образом, для оценки потенциального увеличения субъектов с объективным ответом можно проводить сравнение ОРА активности в сыворотке до и после иммунизации иммуногенной композицией по изобретению и сравнивать их ответ на серотип O25B. В одном воплощении иммуногенная композиция вызывает у человека продуцирование IgG антител, указанные антитела способны уничтожать *E. coli* серотипа O25B, что определяют по опсонофагоцитарной активности *in vitro*. В другом воплощении иммуногенная композиция вызывает у человека продуцирование функциональных антител, указанные антитела способны уничтожать *E. coli* серотипа O25B, что определяют по опсонофагоцитарной активности *in vitro*. В одном воплощении иммуногенная композиция по изобретению увеличивает долю субъектов с объективным ответом против *E. coli* серотипа O25B (то есть индивидуумов с сывороточным титром по меньшей мере 1:8 при определении ОРА *in vitro*) по сравнению с популяцией до иммунизации. В другом воплощении иммуногенная композиция вызывает титр по меньшей мере 1:8 против *E. coli* серотипа O25B по меньшей мере у 50% субъектов при определении опсонофагоцитарной активности в тесте *in vitro*. В одном воплощении иммуногенная композиция по изобретению вызывает титр по меньшей мере 1:8 против *E. coli* серотипа O25B по меньшей мере у 60%, 70%, 80% или по меньшей мере 90%

субъектов при определении опсонофагоцитарной активности в тесте *in vitro*. В одном воплощении иммуногенная композиция по изобретению существенно увеличивает долю субъектов с объективным ответом против *E. coli* серотипа O25B (то есть индивидуумов с сывороточным титром по меньшей мере 1:8 при определении ОРА *in vitro*) по сравнению с популяцией до иммунизации. В одном воплощении иммуногенная композиция по изобретению существенно увеличивает ОРА титры у субъектов-людей против *E. coli* серотипа O25B по сравнению с популяцией до иммунизации.

В одном аспекте изобретение относится к композиции, включающей полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и конъюгат, включающий сахарид, ковалентно связанный с белком-носителем, где сахарид включает Формулу O1a, где n составляет 39 ± 2 . В другом аспекте изобретение относится к композиции, включающей полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и конъюгат, включающий сахарид, ковалентно связанный с белком-носителем, где сахарид включает Формулу O1a, где n составляет 13 ± 2 . В одном воплощении сахарид дополнительно включает группировку R1 корового сахара *E. coli*. В одном воплощении сахарид дополнительно включает группировку KDO. Более предпочтительно, белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇. В одном воплощении конъюгат получают посредством конъюгирования с присоединением одним концом. В одном воплощении конъюгат получают посредством реакции восстановительного аминирования, предпочтительно в буфере DMSO. В одном воплощении сахарид конъюгирован с белком-носителем через спейсер (2-((2-оксоэтил)тио)этил)карбамат (eTEC). Предпочтительно, композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый разбавитель.

В одном воплощении иммуногенная композиция вызывает у человека продуцирование IgG антител, указанные антитела способны связываться с полисахаридом *E. coli* серотипа O1A в концентрации по меньшей мере 0,2 пг/мл, 0,3 пг/мл, 0,35 пг/мл, 0,4 пг/мл или 0,5 пг/мл при определении методом ELISA. Таким образом, для оценки потенциального увеличения субъектов с объективным ответом можно проводить сравнение ОРА активности в сыворотке до и после иммунизации иммуногенной композицией по изобретению и сравнивать их ответ на серотип O1A. В одном воплощении иммуногенная композиция вызывает у человека продуцирование IgG антител, указанные антитела способны уничтожать *E. coli* серотипа O1A, что определяют по опсонофагоцитарной активности *in vitro*. В одном воплощении иммуногенная

композиция вызывает у человека продуцирование функциональных антител, указанные антитела способны уничтожать *E. coli* серотипа O1A при определении опсонофагоцитарной активности *in vitro*. В одном воплощении иммуногенная композиция по изобретению увеличивает долю субъектов с объективным ответом против *E. coli* серотипа O1A (то есть индивидуумов с сывороточным титром по меньшей мере 1:8 при определении OPA *in vitro*) по сравнению с популяцией до иммунизации. В одном воплощении иммуногенная композиция вызывает титр по меньшей мере 1:8 против *E. coli* серотипа O1A по меньшей мере у 50% субъектов при определении опсонофагоцитарной активности в тесте *in vitro*. В одном воплощении иммуногенная композиция по изобретению вызывает титр по меньшей мере 1:8 против *E. coli* серотипа O1A по меньшей мере у 60%, 70%, 80% или по меньшей мере 90% субъектов при определении опсонофагоцитарной активности в тесте *in vitro*. В одном воплощении иммуногенная композиция по изобретению существенно увеличивает долю субъектов с объективным ответом против *E. coli* серотипа O1A (то есть индивидуумов с сывороточным титром по меньшей мере 1:8 при определении OPA *in vitro*) по сравнению с популяцией до иммунизации. В одном воплощении иммуногенная композиция по изобретению существенно увеличивает OPA титры у субъектов-людей против *E. coli* серотипа O1A по сравнению с популяцией до иммунизации.

В одном аспекте изобретение относится к композиции, включающей полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и конъюгат, включающий сахарид, ковалентно связанный с белком-носителем, где сахарид включает Формулу O2, где n составляет 43 ± 2 . В другом аспекте изобретение относится к композиции, включающей полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и конъюгат, включающий сахарид, ковалентно связанный с белком-носителем, где сахарид включает Формулу O2, где n составляет 47 ± 2 . В другом аспекте изобретение относится к композиции, включающей конъюгат, включающий сахарид, ковалентно связанный с белком-носителем, где сахарид включает Формулу O2, где n составляет 17 ± 2 . В другом аспекте изобретение относится к композиции, включающей конъюгат, включающий сахарид, ковалентно связанный с белком-носителем, где сахарид включает Формулу O2, где n составляет 18 ± 2 . В одном воплощении сахарид дополнительно включает группировку R1 корового сахара *E. coli*. В другом воплощении сахарид дополнительно включает группировку R4 корового сахара *E. coli*. В другом воплощении сахарид дополнительно включает группировку KDO. Предпочтительно,

белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇. В одном воплощении конъюгат получают посредством конъюгирования с присоединением одним концом. В другом воплощении конъюгат получают посредством реакции восстановительного аминирования, предпочтительно в буфере DMSO. В одном воплощении сахарид конъюгирован с белком-носителем через спейсер (2-((2-оксоэтил)тио)этил)карбамат (eTEC). Предпочтительно, композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый разбавитель.

В одном воплощении иммуногенная композиция вызывает у человека продуцирование IgG антител, указанные антитела способны связываться с полисахаридом *E. coli* серотипа O2 в концентрации по меньшей мере 0,2 пг/мл, 0,3 пг/мл, 0,35 пг/мл, 0,4 пг/мл или 0,5 пг/мл при определении методом ELISA. Таким образом, для оценки потенциального увеличения субъектов с объективным ответом можно проводить сравнение ОРА активности в сыворотке до и после иммунизации иммуногенной композицией по изобретению и сравнивать их ответ на серотип O2. В другом воплощении иммуногенная композиция вызывает у человека продуцирование IgG антител, указанные антитела способны уничтожать *E. coli* серотипа O2, что определяют по опсонофагоцитарной активности *in vitro*. В другом воплощении иммуногенная композиция вызывает у человека продуцирование функциональных антител, указанные антитела способны уничтожать *E. coli* серотипа O2, что определяют по опсонофагоцитарной активности *in vitro*. В другом воплощении иммуногенная композиция по изобретению увеличивает долю субъектов с объективным ответом против *E. coli* серотипа O2 (то есть индивидуумов с сывороточным титром по меньшей мере 1:8 при определении ОРА *in vitro*) по сравнению с популяцией до иммунизации. В другом воплощении иммуногенная композиция вызывает титр по меньшей мере 1:8 против *E. coli* серотипа O2 по меньшей мере у 50% субъектов при определении опсонофагоцитарной активности в тесте *in vitro*. В другом воплощении иммуногенная композиция по изобретению вызывает титр по меньшей мере 1:8 против *E. coli* серотипа O2 по меньшей мере у 60%, 70%, 80% или по меньшей мере 90% субъектов при определении опсонофагоцитарной активности в тесте *in vitro*. В другом воплощении иммуногенная композиция по изобретению существенно увеличивает долю субъектов с объективным ответом против *E. coli* серотипа O2 (то есть индивидуумов с сывороточным титром по меньшей мере 1:8 при определении ОРА *in vitro*) по сравнению с популяцией до иммунизации. В другом воплощении иммуногенная композиция по изобретению

существенно увеличивает ОРА титры у субъектов-людей против *E. coli* серотипа O2 по сравнению с популяцией до иммунизации.

В одном аспекте изобретение относится к композиции, включающей полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и конъюгат, включающий сахарид, ковалентно связанный с белком-носителем, где сахарид включает Формулу Об, где n составляет 42 ± 2 . В другом аспекте изобретение относится к композиции, включающей полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент; и конъюгат, включающий сахарид, ковалентно связанный с белком-носителем, где сахарид включает Формулу Об, где n составляет 50 ± 2 . В другом аспекте изобретение относится к композиции, включающей конъюгат, включающий сахарид, ковалентно связанный с белком-носителем, где сахарид включает Формулу Об, где n составляет 17 ± 2 . В другом аспекте изобретение относится к композиции, включающей конъюгат, включающий сахарид, ковалентно связанный с белком-носителем, где сахарид включает Формулу Об, где n составляет 18 ± 2 . В одном воплощении сахарид дополнительно включает группировку R1 корового сахара *E. coli*. В одном воплощении сахарид дополнительно включает группировку KDO. Предпочтительно, белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇. В одном воплощении конъюгат получают посредством конъюгирования с присоединением одним концом. В одном воплощении конъюгат получают посредством реакции восстановительного аминирования, предпочтительно в буфере DMSO. В одном воплощении сахарид конъюгирован с белком-носителем через спейсер (2-((2-оксоэтил)тио)этил)карбамат (eTEC). Предпочтительно, композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый разбавитель.

В одном воплощении иммуногенная композиция вызывает у человека продуцирование IgG антител, указанные антитела способны связываться с полисахаридом *E. coli* серотипа Об в концентрации по меньшей мере 0,2 пг/мл, 0,3 пг/мл, 0,35 пг/мл, 0,4 пг/мл или 0,5 пг/мл при определении методом ELISA. Таким образом, для оценки потенциального увеличения субъектов с объективным ответом можно проводить сравнение ОРА активности в сыворотке до и после иммунизации иммуногенной композицией по изобретению и сравнивать их ответ на серотип Об. В одном воплощении иммуногенная композиция вызывает у человека продуцирование IgG антител, указанные антитела способны уничтожать *E. coli* серотипа Об, что определяют по опсонофагоцитарной активности *in vitro*. В одном воплощении иммуногенная композиция вызывает у человека продуцирование функциональных антител, указанные

антитела способны уничтожать *E. coli* серотипа O6 при определении опсонофагоцитарной активности *in vitro*. В одном воплощении иммуногенная композиция по изобретению увеличивает долю субъектов с объективным ответом против *E. coli* серотипа O6 (то есть индивидуумов с сывороточным титром по меньшей мере 1:8 при определении ОРА *in vitro*) по сравнению с популяцией до иммунизации. В одном воплощении иммуногенная композиция вызывает титр по меньшей мере 1:8 против *E. coli* серотипа O6 по меньшей мере у 50% субъектов при определении опсонофагоцитарной активности в тесте *in vitro*. В одном воплощении иммуногенная композиция по изобретению вызывает титр по меньшей мере 1:8 против *E. coli* серотипа O6 по меньшей мере у 60%, 70%, 80% или по меньшей мере 90% субъектов при определении опсонофагоцитарной активности в тесте *in vitro*. В одном воплощении иммуногенная композиция по изобретению существенно увеличивает долю субъектов с объективным ответом против *E. coli* серотипа O6 (то есть индивидуумов с сывороточным титром по меньшей мере 1:8 при определении ОРА *in vitro*) по сравнению с популяцией до иммунизации. В одном воплощении иммуногенная композиция по изобретению существенно увеличивает ОРА титры у субъектов-людей против *E. coli* серотипа O6 по сравнению с популяцией до иммунизации.

В одном аспекте композиция включает полипептид, имеющий происхождение из *E. coli* или его фрагмент, и конъюгат, включающий сахарид, ковалентно связанный с белком-носителем, где сахарид включает структуру, выбранную из любой из Формулы O1 (например, Формулы O1A, Формулы O1B и Формулы O1C), Формулы O2, Формулы O3, Формулы O4 (например, Формулы O4:K52 и Формулы O4:K6), Формулы O5 (например, Формулы O5ab и Формулы O5ac (штамм 180/C3)), Формулы O6 (например, Формулы O6:K2; K13; K15 и Формулы O6:K54), Формулы O7, Формулы O8, Формулы O9, Формулы O10, Формулы O11, Формулы O12, Формулы O13, Формулы O14, Формулы O15, Формулы O16, Формулы O17, Формулы O18 (например, Формулы O18A, Формулы O18ac, Формулы O18A1, Формулы O18B и Формулы O18B1), Формулы O19, Формулы O20, Формулы O21, Формулы O22, Формулы O23 (например, Формулы O23A), Формулы O24, Формулы O25 (например, Формулы O25a и Формулы O25b), Формулы O26, Формулы O27, Формулы O28, Формулы O29, Формулы O30, Формулы O32, Формулы O33, Формулы O34, Формулы O35, Формулы O36, Формулы O37, Формулы O38, Формулы O39, Формулы O40, Формулы O41, Формулы O42, Формулы O43, Формулы O44, Формулы O45 (например, Формулы O45 и Формулы O45rel), Формулы

O46, Формулы O48, Формулы O49, Формулы O50, Формулы O51, Формулы O52, Формулы O53, Формулы O54, Формулы O55, Формулы O56, Формулы O57, Формулы O58, Формулы O59, Формулы O60, Формулы O61, Формулы O62, Формулы 62D₁, Формулы O63, Формулы O64, Формулы O65, Формулы O66, Формулы O68, Формулы O69, Формулы O70, Формулы O71, Формулы O73 (например, Формулы O73 (штамм 73-1)), Формулы O74, Формулы O75, Формулы O76, Формулы O77, Формулы O78, Формулы O79, Формулы O80, Формулы O81, Формулы O82, Формулы O83, Формулы O84, Формулы O85, Формулы O86, Формулы O87, Формулы O88, Формулы O89, Формулы O90, Формулы O91, Формулы O92, Формулы O93, Формулы O95, Формулы O96, Формулы O97, Формулы O98, Формулы O99, Формулы O100, Формулы O101, Формулы O102, Формулы O103, Формулы O104, Формулы O105, Формулы O106, Формулы O107, Формулы O108, Формулы O109, Формулы O110, Формулы O111, Формулы O112, Формулы O113, Формулы O114, Формулы O115, Формулы O116, Формулы O117, Формулы O118, Формулы O119, Формулы O120, Формулы O121, Формулы O123, Формулы O124, Формулы O125, Формулы O126, Формулы O127, Формулы O128, Формулы O129, Формулы O130, Формулы O131, Формулы O132, Формулы O133, Формулы O134, Формулы O135, Формулы O136, Формулы O137, Формулы O138, Формулы O139, Формулы O140, Формулы O141, Формулы O142, Формулы O143, Формулы O144, Формулы O145, Формулы O146, Формулы O147, Формулы O148, Формулы O149, Формулы O150, Формулы O151, Формулы O152, Формулы O153, Формулы O154, Формулы O155, Формулы O156, Формулы O157, Формулы O158, Формулы O159, Формулы O160, Формулы O161, Формулы O162, Формулы O163, Формулы O164, Формулы O165, Формулы O166, Формулы O167, Формулы O168, Формулы O169, Формулы O170, Формулы O171, Формулы O172, Формулы O173, Формулы O174, Формулы O175, Формулы O176, Формулы O177, Формулы O178, Формулы O179, Формулы O180, Формулы O181, Формулы O182, Формулы O183, Формулы O184, Формулы O185, Формулы O186 и Формулы O187, где n представляет собой целое число от 1 до 100. В одном воплощении сахарид дополнительно включает группировку R1 корового сахара *E. coli*. В одном воплощении сахарид дополнительно включает группировку R2 корового сахара *E. coli*. В одном воплощении сахарид дополнительно включает группировку R3 корового сахара *E. coli*. В другом воплощении сахарид дополнительно включает группировку R4 корового сахара *E. coli*. В одном воплощении сахарид дополнительно включает

группировку K12 корового сахара *E. coli*. В другом воплощении сахарид дополнительно включает группировку KDO. Предпочтительно, белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇. В одном воплощении конъюгат получают посредством конъюгирования с присоединением одним концом. В другом воплощении конъюгат получают посредством реакции восстановительного аминирования, предпочтительно в буфере DMSO. В одном воплощении сахарид конъюгирован с белком-носителем через спейсер (2-((2-оксоэтил)тио)этил)карбамат (eTEC). Предпочтительно, композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый разбавитель. В одном воплощении композиция дополнительно включает по меньшей мере от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 дополнительных конъюгатов до самое большее 30 дополнительных конъюгатов, каждый конъюгат включает сахарид, ковалентно связанный с белком-носителем, где сахарид включает структуру, выбранную из любой из указанных Формул.

А. Сахарид

В одном воплощении сахарид получают посредством экспрессии (не обязательно сверхэкспрессии) различных белков Wzz (например, WzzB) для контролирования размера сахара.

В данном описании термин «сахарид» относится к простой углеводной группировке, или моносахаридному звену, а также к комбинациям двух или более простых углеводных группировок, или моносахаридных звеньев, ковалентно связанных с образованием дисахаридов, олигосахаридов и полисахаридов. Сахарид может быть линейным или разветвленным.

В одном воплощении сахарид продуцирует рекомбинантная грамотрицательная бактерия. В другом воплощении сахарид продуцирует рекомбинантная клетка *E. coli*. В одном воплощении сахарид продуцирует рекомбинантная клетка *Salmonella*. Примеры бактерий включают *E. coli* O25K5H1, *E. coli* BD559, *E. coli* GAR2831, *E. coli* GAR865, *E. coli* GAR868, *E. coli* GAR869, *E. coli* GAR872, *E. coli* GAR878, *E. coli* GAR896, *E. coli* GAR1902, *E. coli* O25a ETC NR-5, *E. coli* O157:H7:K-, *Salmonella enterica* серовар *Typhimurium* штамм LT2, *E. coli* GAR2401, *Salmonella enterica* серотип Enteritidis CVD 1943, *Salmonella enterica* серотип *Typhimurium* CVD 1925, *Salmonella enterica* серотип Paratyphi A CVD 1902 и *Shigella flexneri* CVD 1208S. В одном воплощении бактерия не является *E. coli* GAR2401. Данный генетический подход к получению сахара обеспечивает эффективную продукцию молекул O-полисахаридов и O-антигена в

качестве компонентов вакцин.

Термин «белок wzz», используемый в данном документе, относится к полипептиду, определяющему длину цепи, например, такому как wzzB, wzz, wzz_{SF}, wzz_{ST}, ferE, wzz_{ferE}, wzz1 и wzz2. Номерами доступа приведенных в качестве примера последовательностей гена wzz в GenBank являются AF011910 для E4991/76, AF011911 для F186, AF011912 для M70/1-1, AF011913 для 79/311, AF011914 для Bi7509- 41, AF011915 для C664-1992, AF011916 для C258-94, AF011917 для C722-89 и AF011919 для EDL933. Номерами доступа последовательностей генов wzz G7 и Bi316-41 в GenBank являются U39305 и U39306, соответственно. Другими номерами доступа приведенных в качестве примера последовательностей гена wzz в GenBank являются NP_459581 для *Salmonella enterica* подвид enterica серовар *Typhimurium* str. LT2 FerE; AIG66859 для *E. coli* O157:H7 штамм EDL933 FerE; NP_461024 для *Salmonella enterica* подвид enterica серовар *Typhimurium* str. LT2 WzzB. NP_416531 для *E. coli* K-12 подштамм MG1655 WzzB, NP_415119 для *E. coli* K-12 подштамм MG1655 FerE. В предпочтительных воплощениях белок семейства wzz представляет собой любой из wzzB, wzz, wzz_{SF}, wzz_{ST}, ferE, wzz_{ferE}, wzz1 и wzz2, наиболее предпочтительно wzzB, более предпочтительно ferE.

Приведенные в качестве примера последовательности wzzB включают последовательности, представленные в SEQ ID NO: 30-34. Приведенные в качестве примера последовательности FerE включают последовательности, представленные в SEQ ID NO: 35-39.

В некоторых воплощениях модифицированный сахарид (модифицированный по сравнению с соответствующим сахаридом дикого типа) может быть получен посредством экспрессии (не обязательно сверхэкспрессии) белка семейства wzz (например, ferE) из грамотрицательной бактерии в грамотрицательной бактерии и/или посредством выключения (то есть подавления, делеции, удаления) второго гена wzz (например, wzzB) с образованием высокомолекулярных сахаридов, таких как липополисахариды, содержащие O-антиген с промежуточными или длинными цепями. Например, модифицированные сахариды могут быть продуцированы посредством экспрессии (не обязательно сверхэкспрессии) wzz2 и выключения wzz1. Или, в качестве альтернативы модифицированные сахариды могут быть получены посредством экспрессии (не обязательно сверхэкспрессии) wzz_{ferE} и выключения wzzB. В другом воплощении модифицированные сахариды могут быть продуцированы посредством

экспрессии (не обязательно сверхэкспрессии) wzzB и выключения wzzferE. В другом воплощении модифицированные сахараиды могут быть получены посредством экспрессии ferE. Предпочтительно, белок семейства wzz имеет происхождение из штамма, являющегося гетерологичным по отношению к клетке-хозяину.

В некоторых воплощениях сахараид получают посредством экспрессии белка семейства wzz, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 30% 50%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 39. В одном воплощении белок семейства wzz включает последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 39. Предпочтительно, белок семейства wzz имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 30%, 50%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34. В некоторых воплощениях сахараид получают посредством экспрессии белка, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 30% 50%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентична белку ferE.

В одном аспекте изобретение относится к сахараидам, получаемым посредством экспрессии белка семейства wzz, предпочтительно ferE, в грамотрицательной бактерии с получением высокомолекулярных сахараидов, содержащих O-антиген с промежуточными или длинными цепями, у которого по меньшей мере на 1, 2, 3, 4 или 5 повторяющихся звеньев больше по сравнению с соответствующим O-полисахаридом дикого типа. В одном аспекте изобретение относится к сахараидам, получаемым в культуре грамотрицательных бактерий, экспрессирующих (не обязательно сверхэкспрессирующих) белок семейства wzz (например, wzzB) из грамотрицательной бактерии с получением высокомолекулярных сахараидов, содержащих O-антиген с промежуточными или длинными цепями, у которого повторяющихся звеньев по меньшей мере на 1, 2, 3, 4 или 5 больше по сравнению с соответствующим O-антигеном дикого типа. Дополнительные приведенные в качестве примера сахараиды, имеющие увеличенное число повторяющихся звеньев по сравнению с соответствующими сахараидами дикого типа приведены ниже в описании O-полисахаридов и O-антигенов. Желаемая длина цепи является одним из факторов, обеспечивающих улучшенную или

максимальную иммуногенность в случае с заданной вакцинной конструкцией.

В другом воплощении сахарид включает любую из Формул, выбранных из Таблицы 1, где число повторяющихся звеньев n в сахариде больше, чем число повторяющихся звеньев в соответствующем О-полисахариде дикого типа на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 или более повторяющихся звеньев. Предпочтительно, сахарид включает по меньшей мере на 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 повторяющихся звеньев больше по сравнению с соответствующим О-полисахаридом дикого типа. См., например, Таблица 5. В области техники известны способы определения длины сахаридов. Такие способы включают ядерный магнитный резонанс, масс-спектрометрию и эксклюзионную хроматографию, как описано в Примере 13.

В предпочтительном воплощении изобретение относится к сахариду, полученному в рекомбинантной клетке-хозяине *E. coli*, где осуществлена делеция гена для эндогенного регулятора длины О-антигена *wzz* (например, *wzzB*) и замещение (вторым) геном *wzz* из грамотрицательной бактерии гетерологичным для рекомбинантной клетки-хозяина *E. coli* (например, *Salmonella fepE*) с получением высокомолекулярных сахаридов, таких как липополисахариды, содержащие О-антиген с промежуточными или длинными цепями. В некоторых воплощениях рекомбинантная клетка-хозяин *E. coli* включает ген *wzz* из *Salmonella*, предпочтительно из *Salmonella enterica*.

В одном воплощении клетка-хозяин включает гетерологичный ген для белка семейства *wzz* в стабильно поддерживаемом плазмидном векторе. В другом воплощении клетка-хозяин включает гетерологичный ген для белка семейства *wzz* в виде гена, интегрированного в хромосомную ДНК клетки-хозяина. Способы стабильной экспрессии плазмидного вектора в клетке-хозяине *E. coli* и способы интеграции гетерологичного гена в хромосому клетки-хозяина *E. coli* известны в области техники. В одном воплощении клетка-хозяин включает гетерологичный ген для О-антигена в стабильно поддерживаемом плазмидном векторе. В другом воплощении клетка-хозяин включает гетерологичный ген для О-антигена в виде гена, интегрированного в хромосомную ДНК клетки-хозяина. Способы стабильной экспрессии плазмидного

вектора в клетке-хозяине *E. coli* и клетке-хозяине *Salmonella* известны в области техники. Способы интеграции гетерологичного гена в хромосому клетки-хозяина *E. coli* и клетки-хозяина *Salmonella* известны в области техники.

В одном аспекте рекомбинантную клетку-хозяина культивируют в среде, содержащей источник углерода. Источники углерода для культивирования *E. coli* известны в области техники. Примеры источников углерода включают сахароспирты, полиолы, альдосахара или кетосахара, включая арабинозу, целлобиозу, фруктозу, глюкозу, глицерин, инозитол, лактозу, мальтозу, маннитол, маннозу, рамнозу, рафинозу, сорбитол, сорбозу, сахарозу, трегалозу, пируват, сукцинат и метиламин, но не ограничиваясь перечисленными. В предпочтительном воплощении среда включает глюкозу. В некоторых воплощениях среда включает в качестве источника углерода полиол или альдосахар, например, маннитол, инозитол, сорбозу, глицерин, сорбитол, лактозу и арабинозу. Все источники углерода можно добавлять в среду до начала культивирования или их можно добавлять поэтапно или непрерывно во время культивирования.

Приведенная в качестве примера среда для рекомбинантной клетки-хозяина включает элемент, выбранный из любого из KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, цитрата натрия, Na_2SO_4 , аспарагиновой кислоты, глюкозы, MgSO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 и $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Предпочтительно, среда, содержащая KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, цитрат натрия, Na_2SO_4 , аспарагиновую кислоту, глюкозу, MgSO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 и $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Среда, использованная здесь, может быть твердой или жидкой, искусственной (т.е. созданной человеком) или естественной и может включать достаточно питательных веществ для культивирования рекомбинантной клетки-хозяина. Предпочтительно, среда является жидкой средой.

В некоторых воплощениях среда может дополнительно включать подходящие неорганические соли. В некоторых воплощениях среда может дополнительно включать микроэлементы. В некоторых воплощениях среда может дополнительно включать факторы роста. В некоторых воплощениях среда может дополнительно включать дополнительный источник углерода. В некоторых воплощениях среда может дополнительно включать подходящие неорганические соли, микроэлементы, факторы роста и дополнительный источник углерода. Неорганические соли, микроэлементы,

факторы роста и дополнительные источники углерода, подходящие для культивирования *E. coli*, известны в области техники.

В некоторых воплощениях среда может включать необходимые дополнительные компоненты, такие как пептон, N-Z амин, ферментативный гидролизат сои, дополнительный дрожжевой экстракт, мальтозный экстракт, дополнительные источники углерода и различные витамины. В некоторых воплощениях среда не включает такие дополнительные компоненты, как пептон, N-Z амин, ферментативный гидролизат сои, дополнительный дрожжевой экстракт, мальтозный экстракт, дополнительные источники углерода и различные витамины.

Служащие иллюстрацией примеры подходящих добавочных источников углерода включают другие углеводы, такие как глюкоза, фруктоза, маннитол, крахмал или гидролизованный крахмал, гидролизат целлюлозы и меласса; органические кислоты, такие как уксусная кислота, пропионовая кислота, молочная кислота, муравьиная кислота, яблочная кислота, лимонная кислота и муравьиная кислота; и спирты, такие как глицерин, инозитол, маннитол и сорбитол, не ограничиваясь перечисленным.

В некоторых воплощениях среда дополнительно включает источник азота. Источники азота, подходящие для культивирования *E. coli*, известны в области техники. Служащие иллюстрацией примеры подходящих источников азота включают, без ограничения, аммоний, включая газообразный аммиак и водный раствор аммиака; аммонийные соли неорганических или органических кислот, такие как хлорид аммония, нитрат аммония, фосфат аммония, сульфат аммония и ацетат аммония; мочевины, нитратные или нитритные соли и другие азотсодержащие вещества, включая аминокислоты в виде чистых или неочищенных препаратов, мясной экстракт, пептон, рыбную муку, рыбный гидролизат, кукурузный сироп, гидролизат казеина, гидролизат соевого жмыха, дрожжевой экстракт, сухие дрожжи, дистиллят дрожжей винных, соевую муку, муку из жмыха семян хлопчатника и тому подобное.

В некоторых воплощениях среда включает неорганическую соль. Служащие иллюстрацией примеры подходящих неорганических солей включают, без ограничения соли калия, кальция, натрия, магния, марганца, железа, кобальта, цинка, меди, молибдена, вольфрама и других микроэлементов и фосфорной кислоты.

В некоторых воплощениях среда включает подходящие факторы роста. Служащие иллюстрацией примеры надлежащих микроэлементов, факторов роста и тому подобного включают, без ограничения, кофермент А, пантотеновую кислоту,

пиридоксин-НС1, биотин, тиамин, рибофлавин, флаavin мононуклеотид, флавинадениндинуклеотид, DL-6,8-тиоктовую кислоту, фолиевую кислоту, витамин В12, другие витамины, аминокислоты, такие как цистеин и гидроксипролин, основания, такие как аденин, урацил, гуанин, тимин и цитозин, тиосульфат натрия, р- или г-аминобензойную кислоту, ниацинамид, нитрилоацетат и тому подобное, либо в виде чистых или частично очищенных химических соединений, либо в том виде, в котором они присутствуют в естественных материалах. Специалист в области техники может установить количества эмпирическим путем согласно способам и методикам, известным в области техники.

В другом воплощении модифицированный сахарид (в сравнении с соответствующим сахаридом дикого типа), описанный в данном документе, получен синтетическим путем, например *in vitro*. Получение синтетическим путем или синтез сахаридов может способствовать избеганию затратных по стоимости и по времени производственных процессов. В одном воплощении сахарид является искусственно синтезированным, как, например, с применением стратегии последовательного гликозилирования или комбинации последовательного гликозилирования и стратегии синтеза блоков [3+2] из несущих подходящие защитные группы моносахаридных промежуточных соединений. Например, в качестве доноров гликозила в гликозилировании можно использовать тиогликозиды и трихлорацетимидатные гликозил-производные. В одном воплощении сахарид, который искусственным образом синтезирован *in vitro*, идентичен по структуре сахариду, полученному рекомбинантными способами, такими как манипуляции с белком семейства wzz, как описано выше.

Полученный (рекомбинантным или синтетическим способами) сахарид, включает структуру, имеющую происхождение из *E. coli* любого серотипа, включая, например, любой из следующих серотипов *E. coli*: O1 (например, O1A, O1B и O1C), O2, O3, O4 (например, O4:K52 и O4:K6), O5 (например, O5ab и O5ac (штамм 180/C3)), O6 (например, O6:K2; K13; K15 и O6:K54), O7, O8, O9, O10, O11, O12, O13, O14, O15, O16, O17, O18 (например, O18A, O18ac, O18A1, O18B и O18B1), O19, O20, O21, O22, O23 (например, O23A), O24, O25 (например, O25a и O25b), O26, O27, O28, O29, O30, O32, O33, O34, O35, O36, O37, O38, O39, O40, O41, O42, O43, O44, O45 (например, O45 и O45rel), O46, O48, O49, O50, O51, O52, O53, O54, O55, O56, O57, O58, O59, O60, O61, O62, 62D1, O63, O64, O65, O66, O68, O69, O70, O71, O73 (например, O73 (штамм 73-1)), O74, O75, O76, O77, O78, O79, O80, O81, O82, O83, O84, O85, O86, O87, O88, O89, O90,

O91, O92, O93, O95, O96, O97, O98, O99, O100, O101, O102, O103, O104, O105, O106, O107, O108, O109, O110, O111, O112, O113, O114, O115, O116, O117, O118, O119, O120, O121, O123, O124, O125, O126, O127, O128, O129, O130, O131, O132, O133, O134, O135, O136, O137, O138, O139, O140, O141, O142, O143, O144, O145, O146, O147, O148, O149, O150, O151, O152, O153, O154, O155, O156, O157, O158, O159, O160, O161, O162, O163, O164, O165, O166, O167, O168, O169, O170, O171, O172, O173, O174, O175, O176, O177, O178, O179, O180, O181, O182, O183, O184, O185, O186 и O187.

Индивидуальные полисахариды обычно очищают (обогащают по количеству конъюгата полисахарид-белок) способами, известными в области техники, например, такими как диализ, операции концентрации, операции диафильтрации, тангенциальная поточная фильтрация, преципитация, элюирование, центрифугирование, преципитация, ультрафильтрация, глубинная фильтрация и/или колоночная хроматография (ионообменная хроматография, мультимодальная ионообменная хроматография, DEAE (диэтиламиноэтил) и хроматография гидрофобных взаимодействий). Предпочтительно, полисахариды очищают способом, включающим тангенциальную поточную фильтрацию.

Очищенные полисахариды можно активировать (например, химически активировать), чтобы сделать их способными вступать в реакцию (например, либо непосредственно с белком-носителем, либо через линкер, такой как спейсер eTEC) и затем включать в гликоконъюгаты по изобретению, как описано далее.

В одном предпочтительном воплощении сахарид по изобретению имеет происхождение из серотипа *E. coli*, где серотип представляет собой O25a. В другом предпочтительном воплощении серотип представляет собой O25b. В другом предпочтительном воплощении серотип представляет собой O1A. В другом предпочтительном воплощении серотип представляет собой O2. В другом предпочтительном воплощении серотип представляет собой O6. В другом предпочтительном воплощении серотип представляет собой O17. В другом предпочтительном воплощении серотип представляет собой O15. В другом предпочтительном воплощении серотип представляет собой O18A. В другом предпочтительном воплощении серотип представляет собой O75. В другом предпочтительном воплощении серотип представляет собой O4. В другом предпочтительном воплощении серотип представляет собой O16. В другом предпочтительном воплощении серотип представляет собой O13. В другом

предпочтительном воплощении серотип представляет собой О7. В другом предпочтительном воплощении серотип представляет собой О8. В другом предпочтительном воплощении серотип представляет собой О9.

В данном описании упоминание любого из серотипов, указанных выше, относится к серотипу, охватывающему повторяющееся структурное звено (О-звено, как описано ниже), известное в области техники и уникальное для соответствующего серотипа. Например, термин серотип «О25а» (также известный в области техники как серотип «О25») относится к серотипу, охватывающему Формулу О25, приведенную в Таблице 1. В качестве другого примера, термин серотип «О25b» относится к серотипу, охватывающему Формулу О25b, приведенную в Таблице 1.

В данном описании серотипы упоминаются обобщенно, если специально не указано иное, таким образом, например, термин Формула «О18» обобщенно охватывает Формулу О18А, Формулу О18ас, Формулу 18А1, Формулу О18В и Формулу О18В1.

В данном описании термин «О1» обобщенно охватывает виды Формулы, включающие обобщенный термин «О1» в названии Формулы согласно Таблице 1, такие как любая из Формулы О1А, Формулы О1А1, Формулы О1В и Формулы О1С, каждая из которых приведена в Таблице 1. Соответственно, «серотип О1» обобщенно относится к серотипу, охватывающему любую из Формулы О1А, Формулы О1А1, Формулы О1В и Формулы О1С.

В данном описании термин «Об» обобщенно охватывает виды Формулы, включающие обобщенный термин «Об» в названии Формулы согласно Таблице 1, такие как любая из Формулы Об:К2; К13; К15 и Формулы Об:К54, каждая из которых приведена в Таблице 1. Соответственно, «серотип Об» обобщенно относится к серотипу, охватывающему любую из Формулы Об:К2; К13; К15; и Формулы Об:К54.

Другие примеры терминов, которые обобщенно относятся к видам Формулы, включающим обобщенный термин в названии Формулы согласно Таблице 1, включают: «О4», «О5», «О18» и «О45».

В данном описании термин «О2» относится к Формуле О2, приведенной в Таблице 1. Термин «О-антиген О2» относится к сахариду, охватывающему Формулу О2, приведенную в Таблице 1.

В данном описании упоминание О-антигена указанного выше серотипа относится к сахариду, охватывающему формулу, отмеченную названием соответствующего серотипа. Например, термин «О-антиген О25В» относится к сахариду, охватывающему

Формулу O25B, приведенную в Таблице 1.

В качестве другого примера, термин «О-антиген O1» обобщенно относится к сахариду, охватывающему Формулу, включающую термин «O1», такую как Формула O1A, Формула O1A1, Формула O1B и Формула O1C, каждая из которых приведена в Таблице 1.

В качестве другого примера, термин «О-антиген O6» обобщенно относится к сахариду, охватывающему Формулу, включающую термин «O6», такую как Формула O6:K2, Формула O6:K13, Формула O6:K15 и Формула O6:K54, каждая из которых приведена в Таблице 1.

В. О-полисахарид

В данном описании термин «О-полисахарид» относится к любой структуре, включающей О-антиген, при условии, что указанная структура не включает целую клетку или Липид А. Например, в одном воплощении О-полисахарид включает липополисахарид, в котором нет связанного липида А. Стадия удаления липида А известна в области техники и включает, например, тепловую обработку с добавлением кислоты. Приведенный в качестве примера способ включает обработку 1% уксусной кислотой при 100°C в течение 90 минут. Данный способ комбинируют со способом выделения удаленного липида А. Приведенный в качестве примера способ выделения липида А включает ультрацентрифугирование.

В одном воплощении О-полисахарид относится к структуре, состоящей из О-антигена, в этом случае О-полисахарид является синонимом термину О-антиген. В одном предпочтительном воплощении О-полисахарид относится к структуре, включающей повторяющиеся звенья О-антигена, без центрального сахара. Соответственно, в одном воплощении О-полисахарид не включает коровую группировку R1 *E. coli*. В другом воплощении О-полисахарид не включает коровую группировку R2 *E. coli*. В другом воплощении О-полисахарид не включает коровую группировку R3 *E. coli*. В другом воплощении О-полисахарид не включает коровую группировку R4 *E. coli*. В другом воплощении О-полисахарид не включает коровую группировку K12 *E. coli*. В другом предпочтительном воплощении О-полисахарид относится к структуре, включающей О-антиген и коровый сахарид. В другом воплощении О-полисахарид относится к структуре, включающей О-антиген, коровый сахарид и группировку KDO.

Способы очистки О-полисахарида, включающего коровый олигосахарид, из LPS известны в области техники. Например, после очистки LPS, очищенный LPS можно

гидролизовать путем нагревания в 1% (об./об.) уксусной кислоте в течение 90 минут при 100 градусах Цельсия, после чего выполнить ультрацентрифугирование при 142000 x g в течение 5 часов при 4 градусах Цельсия. Надосадочную жидкость, содержащую О-полисахарид, подвергают лиофилизации и хранят при 4 градусах Цельсия. В некоторых воплощениях описана делеция генов синтеза капсулы, чтобы обеспечить простую очистку О-полисахарида.

О-полисахарид может быть выделен способами, включающими мягкий кислотный гидролиз для удаления липида А из LPS, но не ограничивающимся указанным. Другие воплощения могут включать применение гидразина как агента для получения О-полисахарида. Получение LPS можно осуществлять способами, известными в области техники.

В некоторых воплощениях для применения в конъюгированных вакцинах предложены О-полисахариды, очищенные из имеющих дикий тип, модифицированных или аттенуированных грамотрицательных бактериальных штаммов, экспрессирующих (не обязательно сверхэкспрессирующих) белок Wzz (например, wzzB). В предпочтительных воплощениях О-полисахаридную цепь очищают из грамотрицательного бактериального штамма, экспрессирующего (не обязательно сверхэкспрессирующего) белок wzz, для применения в качестве вакцинного антигена либо в конъюгатной, либо в комплексной вакцине.

В одном воплощении О-полисахарид имеет молекулярную массу, которая увеличена приблизительно в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 11 раз, 12 раз, 13 раз, 14 раз, 15 раз, 16 раз, 17 раз, 18 раз, 19 раз, 20 раз, 21 раз, 22 раз, 23 раз, 24 раз, 25 раз, 26 раз, 27 раз, 28 раз, 29 раз, 30 раз, 31 раз, 32 раз, 33 раз, 34 раз, 35 раз, 36 раз, 37 раз, 38 раз, 39 раз, 40 раз, 41 раз, 42 раз, 43 раз, 44 раз, 45 раз, 46 раз, 47 раз, 48 раз, 49 раз, 50 раз, 51 раз, 52 раз, 53 раз, 54 раз, 55 раз, 56 раз, 57 раз, 58 раз, 59 раз, 60 раз, 61 раз, 62 раз, 63 раз, 64 раз, 65 раз, 66 раз, 67 раз, 68 раз, 69 раз, 70 раз, 71 раз, 72 раз, 73 раз, 74 раз, 75 раз, 76 раз, 77 раз, 78 раз, 79 раз, 80 раз, 81 раз, 82 раз, 83 раз, 84 раз, 85 раз, 86 раз, 87 раз, 88 раз, 89 раз, 90 раз, 91 раз, 92 раз, 93 раз, 94 раз, 95 раз, 96 раз, 97 раз, 98 раз, 99 раз, 100 раз или более по сравнению с соответствующим О-полисахаридом дикого типа. В предпочтительном воплощении О-полисахарид имеет молекулярную массу, которая увеличена по меньшей мере в 1 раз и самое большее в 5 раз по сравнению с соответствующим О-полисахаридом дикого типа. В другом воплощении О-полисахарид имеет молекулярную массу, которая увеличена по

меньшей мере в 2 раза и самое большое в 4 раза по сравнению с соответствующим О-полисахаридом дикого типа. Увеличение молекулярной массы О-полисахарида по сравнению с соответствующим О-полисахаридом дикого типа предпочтительно ассоциировано с увеличением числа повторяющихся О-антигенных звеньев. В одном воплощении увеличение молекулярной массы О-полисахарида обеспечивается белком семейства wzz.

В одном воплощении О-полисахарид имеет молекулярную массу, которая увеличена приблизительно на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 кДа или более по сравнению с соответствующим О-полисахаридом дикого типа. В одном воплощении О-полисахарид по изобретению имеет молекулярную массу, которая увеличена по меньшей мере на 1 и самое большое на 200 кДа по сравнению с соответствующим О-полисахаридом дикого типа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 5 и самое большое на 200 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 10 и самое большое на 200 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 12 и самое большое на 200 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 15 и самое большое на 200 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 18 и самое большое на 200 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 20 и самое большое на 200 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 21 и самое большое на 200 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 22 и самое большое на 200 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 30 и самое большое на 200 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 1 и самое большое на 100 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 5 и самое большое на 100 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 10 и самое большое на 100 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 12 и самое большое на 100 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 15 и самое большое на 100 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей

мере на 20 и самое большее на 100 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 1 и самое большее на 75 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 5 и самое большее на 75 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 10 и самое большее на 75 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 12 и самое большее на 75 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 15 и самое большее на 75 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 18 и самое большее на 75 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 20 и самое большее на 75 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 30 и самое большее на 75 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 10 и самое большее на 75 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 12 и самое большее на 85 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 10 и самое большее на 75 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 10 и самое большее на 70 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 10 и самое большее на 60 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 10 и самое большее на 50 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 10 и самое большее на 49 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 10 и самое большее на 48 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 10 и самое большее на 47 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 10 и самое большее на 46 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 20 и самое большее на 45 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 20 и самое большее на 44 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 20 и самое большее на 43 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 20 и самое большее на 42 кДа. В одном воплощении молекулярная масса увеличена по меньшей мере на 20 и самое большее на 41 кДа. Такое увеличение молекулярной массы О-полисахарида по сравнению с соответствующим О-полисахаридом дикого типа предпочтительно ассоциировано с увеличением числа повторяющихся О-антигенных звеньев. В одном воплощении увеличение молекулярной массы О-полисахарида обеспечивается белком семейства wzz. См., например, Таблицу

21.

В другом воплощении О-полисахарид включает любую из Формул, выбранных из Таблицы 1, где число повторяющихся звеньев *n* в О-полисахариде больше, чем число повторяющихся звеньев в соответствующем О-полисахариде дикого типа на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 или более повторяющихся звеньев. Предпочтительно, сахарид включает по меньшей мере на 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 повторяющихся звеньев больше по сравнению с соответствующим О-полисахаридом дикого типа. См., например, Таблицу 21.

С. О-антиген

О-антиген является частью липополисахарида (LPS) во внешней мембране грамотрицательных бактерий. О-антиген находится на клеточной поверхности и является переменным составляющим элементом клетки. Вариабельность О-антигена служит основой для серотипирования грамотрицательных бактерий. Существующая схема серотипирования *E. coli* включает О-полисахариды с 1 по 181.

О-антиген включает повторяющиеся звенья олигосахаридов (О-звенья), у которых структура дикого типа обычно содержит от двух до восьми остатков широкого спектра сахаров. О-звенья приведенных в качестве примера О-антигенов *E. coli* показаны в Таблице 1, см. также Фиг. 9А-9С и Фиг. 10А-10В.

В одном воплощении сахарид по изобретению может представлять собой одно олигосахаридное звено. В другом воплощении сахарид по изобретению представляет собой одно повторяющееся олигосахаридное звено надлежащего серотипа. В таких воплощениях сахарид может включать структуру, выбранную из любой из Формулы О8, Формулы О9а, Формулы О9, Формулы О20ab, Формулы О20ас, Формулы О52, Формулы О97 и Формулы О101.

В другом воплощении сахарид по изобретению может представлять собой олигосахариды. Олигосахариды могут иметь малое число повторяющихся звеньев (обычно 5-15 повторяющихся звеньев) и обычно получены путем синтеза или гидролиза полисахаридов. В таких воплощениях сахарид может включать структуру, выбранную из любой из Формулы О8, Формулы О9а, Формулы О9, Формулы О20ab, Формулы

О20ас, Формулы О52, Формулы О97 и Формулы О101.

Предпочтительно, все сахараиды по данному изобретению и входящие в состав иммуногенных композиций по данному изобретению представляют собой полисахариды. Высокомолекулярные полисахариды могут индуцировать определенные гуморальные иммунные ответы благодаря эпитомам, присутствующим на поверхности антигена. Для применения в конъюгатах, композициях и способах по данному изобретению предпочтительно предполагается выделение и очистка высокомолекулярных полисахаридов.

В некоторых воплощениях число повторяющихся О-звеньев в каждом отдельном О-антигенном полимере (и, следовательно, длина и молекулярная масса полимерной цепи) зависит от регулятора длины цепи wzz, белка внутренней мембраны. Различные белки wzz обуславливают различные диапазоны модальных длин (от 4 до более 100 повторяющихся звеньев). Термин «модальная длина» относится к числу повторяющихся О-звеньев. Грамотрицательные бактерии часто имеют два различных белка Wzz, обуславливающие две различающиеся модальные длины цепи OAg, одну более длинную и одну более короткую. Экспрессия (не обязательно сверхэкспрессия) белков семейства wzz (например, wzzB) в грамотрицательных бактериях может позволять управлять длиной О-антигена, чтобы сдвинуть или сместить продукцию бактериями О-антигенов определенных диапазонов длины и усилить продукцию высокомолекулярных липополисахаридов с высоким выходом. В одном воплощении используемая здесь «короткая» модальная длина относится к малому числу повторяющихся О-звеньев, например, от 1 до 20. В одном воплощении используемая здесь «длинная» модальная длина относится к числу повторяющихся О-звеньев более 20 и максимум до 40. В одном воплощении используемая здесь «очень длинная» модальная длина относится к числу повторяющихся О-звеньев более 40.

В одном воплощении полученный сахарид имеет по меньшей мере на 10 повторяющихся звеньев, 15 повторяющихся звеньев, 20 повторяющихся звеньев, 25 повторяющихся звеньев, 30 повторяющихся звеньев, 35 повторяющихся звеньев, 40 повторяющихся звеньев, 45 повторяющихся звеньев, 50 повторяющихся звеньев, 55 повторяющихся звеньев, 60 повторяющихся звеньев, 65 повторяющихся звеньев, 70 повторяющихся звеньев, 75 повторяющихся звеньев, 80 повторяющихся звеньев, 85 повторяющихся звеньев, 90 повторяющихся звеньев, 95 повторяющихся звеньев или 100 повторяющихся звеньев больше по сравнению с О-полисахаридом дикого типа.

В одном воплощении сахарид по изобретению имеет на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 или более повторяющихся звеньев больше по сравнению с соответствующим О-полисахаридом дикого типа. Предпочтительно, сахарид включает по меньшей мере на 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 повторяющихся звеньев больше по сравнению с соответствующим О-полисахаридом дикого типа. См., например, Таблицу 21. В области техники известны способы определения длины сахаридов. Такие способы включают ядерный магнитный резонанс, масс-спектрометрию и эксклюзионную хроматографию, как описано в Примере 13.

Способы определения числа повторяющихся звеньев в сахариде также известны в области техники. Например, число повторяющихся звеньев (или «*n*» в Формуле) можно рассчитать путем деления молекулярной массы полисахарида (без молекулярной массы корового сахара или остатка KDO) на молекулярную массу повторяющегося звена (то есть молекулярную массу структуры в соответствующей Формуле, показанной, например, в **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, которую можно теоретически рассчитать как сумму молекулярных масс каждого моносахарида в Формуле). Молекулярная масса каждого моносахарида в Формуле известна в области техники. Например, молекулярная масса повторяющегося звена Формулы O25b составляет приблизительно 862 Да. Например, молекулярная масса повторяющегося звена Формулы O1a составляет приблизительно 845 Да. Например, молекулярная масса повторяющегося звена Формулы O2 составляет приблизительно 829 Да. Например, молекулярная масса повторяющегося звена Формулы O6 составляет приблизительно 893 Да. При определении числа повторяющихся звеньев в конъюгате принимается в расчет молекулярная масса белка-носителя и соотношение белок:полисахарид. В данном документе «*n*» относится к числу повторяющихся звеньев (представленных в скобках в **Ошибка! Источник ссылки не найден.**) в молекуле полисахарида. Как известно в области техники, в биологических макромолекулах повторяющиеся структуры могут перемежаться с областями неидеальных повторов, как, например, с пропущенными ветвями. Кроме того, в области техники известно, что полисахариды, выделенные и очищенные из природных источников, таких как бактерии, могут быть гетерогенными по размеру и ветвлению. В

таком случае n может представлять среднее или медианное значение для n молекул в популяции.

В одном воплощении О-полисахарид имеет по меньшей мере на одно повторяющееся звено О-антигена больше по сравнению с соответствующим О-полисахаридом дикого типа. Повторяющиеся звенья О-антигенов показаны в Таблице 1. В одном воплощении О-полисахарид включает суммарно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 или более повторяющихся звеньев. Предпочтительно, сахарид имеет суммарно по меньшей мере от 3 до самое большее 80 повторяющихся звеньев. В другом воплощении О-полисахарид по изобретению имеет на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 или более повторяющихся звеньев больше по сравнению с соответствующим О-полисахаридом дикого типа.

В одном воплощении сахарид включает О-антиген, где n в любой из формул О-антигена (например, таких как Формулы, показанные в **Ошибка! Источник ссылки не найден.** (см. также Фиг. 9А-9С и Фиг. 10А-10В)) представляет собой целое число равное по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, и самое большее 200, 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 81, 80, 79, 78, 77, 76, 75, 74, 73, 72, 71, 70, 69, 68, 67, 66, 65, 60, 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 51 или 50. Для указания диапазона можно комбинировать любое минимальное значение и любое максимальное значение. Примеры диапазонов включают, например, от по меньшей мере 1 до самое большее 1000; от по меньшей мере 10 до самое большее 500 и от по меньшей мере 20 до самое большее 80, предпочтительно самое большее 90. В одном предпочтительном воплощении n составляет от по меньшей мере 31 до самое большее 90. В предпочтительном воплощении n составляет от 40 до 90, более предпочтительно от 60 до 85.

В одном воплощении сахарид включает О-антиген, где n в любой из формул О-антигена составляет от по меньшей мере 1 до самое большее 200. В одном воплощении

большее 75. В одном воплощении n в любой из формул О-антигена составляет от по меньшей мере 35 до самое большее 70. В одном воплощении n в любой из формул О-антигена составляет от по меньшей мере 35 до самое большее 60. В одном воплощении n в любой из формул О-антигена составляет от по меньшей мере 35 до самое большее 50. В одном воплощении n в любой из формул О-антигена составляет от по меньшей мере 35 до самое большее 49. В одном воплощении n в любой из формул О-антигена составляет от по меньшей мере 35 до самое большее 48. В одном воплощении n в любой из формул О-антигена составляет от по меньшей мере 35 до самое большее 47. В одном воплощении n в любой из формул О-антигена составляет от по меньшей мере 35 до самое большее 46. В одном воплощении n в любой из формул О-антигена составляет от по меньшей мере 36 до самое большее 45. В одном воплощении n в любой из формул О-антигена составляет от по меньшей мере 37 до самое большее 44. В одном воплощении n в любой из формул О-антигена составляет от по меньшей мере 38 до самое большее 43. В одном воплощении n в любой из формул О-антигена составляет от по меньшей мере 39 до самое большее 42. В одном воплощении n в любой из формул О-антигена составляет от по меньшей мере 39 до самое большее 41.

Например, в одном воплощении n в сахариде составляет 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 или 90, наиболее предпочтительно 40. В другом воплощении n составляет от по меньшей мере 35 до самое большее 60. Например, в одном воплощении n представляет собой любое из 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 и 60, предпочтительно 50. В другом предпочтительном воплощении n представляет собой от по меньшей мере 55 до самое большее 75. Например, в одном воплощении n представляет собой 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68 или 69, наиболее предпочтительно 60.

Структуру сахара можно определить способами и инструментами, известными в области техники, например, такими как ядерно-магнитный резонанс (NMR), включая 1D, 1H, и/или 13C, 2D TOCSY, DQF-COSY, NOESY и/или HMQC.

В некоторых воплощениях очищенный полисахарид перед конъюгированием имеет молекулярную массу от 5 кДа и до 400 кДа. В других таких воплощениях сахарид имеет молекулярную массу от 10 до 400 кДа; от 5 кДа до 400 кДа; от 5 кДа до 300 кДа; от 5 кДа до 200 кДа; от 5 кДа до 150 кДа; от 10 кДа до 100 кДа; от 10 кДа до 75 кДа; от

10 кДа до 60 кДа; от 10 кДа до 40 кДа; от 10 кДа до 100 кДа; от 10 кДа до 200 кДа; от 15 кДа до 150 кДа; от 12 кДа до 120 кДа; от 12 кДа до 75 кДа; от 12 кДа до 50 кДа; от 12 кДа до 60 кДа; от 35 кДа до 75 кДа; от 40 кДа до 60 кДа; от 35 кДа до 60 кДа; от 20 кДа до 60 кДа; от 12 кДа до 20 кДа или от 20 кДа до 50 кДа. В других воплощениях полисахарид имеет молекулярную массу от 7 кДа до 15 кДа; от 8 кДа до 16 кДа; от 9 кДа до 25 кДа; от 10 кДа до 100; 10 кДа до 60 кДа; от 10 кДа до 70 кДа; от 10 кДа до 160 кДа; от 15 кДа до 600 кДа; от 20 кДа до 1000 кДа; от 20 кДа до 600 кДа; от 20 кДа до 400 кДа; от 30 кДа до 1000 кДа; от 30 кДа до 60 кДа; от 30 кДа до 50 кДа; или от 5 кДа до 60 кДа. Любое целое значение, входящее в указанные выше диапазоны, также считают воплощением изобретения.

В данном описании термин «молекулярная масса» полисахарида или конъюгата белка-носителя с полисахаридом относится к молекулярной массе, определенной при помощи эксклюзионной хроматографии (SEC) в комбинации с детектированием многоугольного рассеивания лазерного излучения (MALLS).

Полисахарид может незначительно уменьшаться в размере в ходе обычных процедур очистки. Кроме того, как описано в данном документе, полисахарид можно доводить до определенного размера перед конъюгированием. Доводить до определенного размера можно механически или химически. Можно проводить химический гидролиз с применением уксусной кислоты. Механическое доведение до определенного размера можно осуществлять с применением гомогенизации высокого давления. Упомянутые выше диапазоны молекулярных масс относятся к очищенным полисахаридам перед конъюгированием (например, перед активацией).

Таблица 1. Серогруппы/серотипы *E. coli* и группировки О-звеньев

Серогруппа/ Серотип	Структура группировки (О-звено)	Обозначение структуры группировки:
O1A, O1A1	[→3)-α-L-Rha-(1→3)-α-L-Rha-(1→3)-β-L-Rha-(1→4)-β-D-GlcNAc-(1→ β-D-ManNAc-(1→2)] _n	Формула O1A

Серогруппа/ Серотип	Структура группировки (O-звено)	Обозначение структуры группировки:
O1B	[$\rightarrow 3$)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 2)- α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow β -D-ManNAc-(1 \rightarrow 2)] _n	Формула O1B
O1C	[$\rightarrow 3$)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow β -D-ManNAc-(1 \rightarrow 2)] _n	Формула O1C
O2	[$\rightarrow 3$)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- β -L-Rha-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow α -D-Fuc3NAc-(1 \rightarrow 2)] _n	Формула O2
O3	[β -L-RhaNAc(1 \rightarrow 4) α -D-Glc-(1 \rightarrow 4) $\rightarrow 3$)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow] _n	Формула O3
O4:K52	[$\rightarrow 2$)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glc-(1 \rightarrow 3)- α -L-FucNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc(1 \rightarrow] _n	Формула O4:K52
O4:K6	[α -D-Glc-(1 \rightarrow 3) $\rightarrow 2$)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glc-(1 \rightarrow 3)- α -L-FucNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc(1 \rightarrow] _n	Формула O4:K6
O5ab	[$\rightarrow 4$)- β -D-Qui3NAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Ribf-(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalNAc(1 \rightarrow] _n	Формула O5ab
O5ac (штамм 180/C3)	[$\rightarrow 2$)- β -D-Qui3NAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Ribf-(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalNAc(1 \rightarrow] _n	Формула O5ac (штамм 180/C3)
O6:K2; K13; K15	[$\rightarrow 4$)- α -D-GalNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Man-(1 \rightarrow 4)- β -D-Man-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow β -D-Glc-(1 \rightarrow 2)] _n	Формула O6:K2; K13; K15
O6:K54	[$\rightarrow 4$)- α -D-GalNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Man-(1 \rightarrow 4)- β -D-Man-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 2)] _n	Формула O6:K54

Серогруппа/ Серотип	Структура группировки (O-звено)	Обозначение структуры группировки:
O7	[α -L-Rha-(1 \rightarrow 3) \rightarrow 3)- β -D-Qui4NAc-(1 \rightarrow 2)- α -D-Man-(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow)] _n	Формула O7
O10	[\rightarrow 3)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow α -D-Fuc4NAcyl-(1 \rightarrow 2) Acyl=acetyl (60%) or (R)-3-hydroxybutyryl (40%)] _n	Формула O10
O16	[\rightarrow 2)- β -D-Galf ^c -(1 \rightarrow 6)- α -D-Glc-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rha2Ac-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow)] _n	Формула O16
O17	[α -D-Glc-(1 \rightarrow 6) \rightarrow 6)- α -D-Man-(1 \rightarrow 2)- α -D-Man-(1 \rightarrow 2)- β -D-Man-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcNAc(1 \rightarrow)] _n	Формула O17
O18A, O18ac	[\rightarrow 2)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glc-(1 \rightarrow 4)- α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)] _n	Формула O18A, Формула O18ac
O18A1	[α -D-Glc-(1 \rightarrow 6) \rightarrow 2)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glc-(1 \rightarrow 4)- α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)] _n	Формула O18A1
O18B	[\rightarrow 3)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glc-(1 \rightarrow 4)- α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow β -D-Glc-(1 \rightarrow 3)] _n	Формула O18B
O18B1	[α -D-Glc-(1 \rightarrow 4) \rightarrow 3)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glc-(1 \rightarrow 4)- α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow β -D-Glc-(1 \rightarrow 3)] _n	Формула O18B1
O21	[β -D-Gal-(1 \rightarrow 4) \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalNAc-(1 \rightarrow β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 2)] _n	Формула O21
O23A	[α -D-Glc-(1 \rightarrow 6) \rightarrow 6)- α -D-Glc-(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow β -D-GlcNAc(1 \rightarrow 3)] _n	Формула O23A

Серогруппа/ Серотип	Структура группировки (О-звено)	Обозначение структуры группировки:
O24	[$\rightarrow 7$)- α -Neu5Ac-(2 \rightarrow 3)- β -D-Glc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalNAc-(1 \rightarrow α -D-Glc-(1 \rightarrow 2)] _n	Формула O24
O25/O25a	[[β -D-Glc-(1 \rightarrow 6) \rightarrow 4)- α -D-Glc-(1 \rightarrow 3)- α -L-FucNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)] _n	Формула O25a
O25b	$\begin{array}{c} \beta\text{-Glc}p\text{-} \\ 1 \\ \downarrow \\ 6 \end{array}$ $[\alpha\text{-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-Glc}p\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-Rhap}2\text{OAc}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-Glc}p\text{NAc}\text{-}]_n$	Формула O25b
O26	[\rightarrow 3)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 4)- α -L-FucNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow] _n	Формула O26
O28	[\rightarrow 2)-(R)-Gro-1-P \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal β 2Ac-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow] _n	Формула O28
O36	$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Fuc}p \\ 1 \\ \downarrow \\ 3 \end{array}$ $\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Man}p\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fuc}p\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glc}p\text{NAc}\text{-}(1\rightarrow]_n$	Формула O36
O44	[α -D-Glc-(1 \rightarrow 4) \rightarrow 6)- α -D-Man-(1 \rightarrow 2)- α -D-Man-(1 \rightarrow 2)- β -D-Man-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcNAc(1 \rightarrow] _n	Формула O44
O45	[\rightarrow 2)- β -D-Glc-(1 \rightarrow 3)- α -L-6dTal2Ac-(1 \rightarrow 3)- α -D-FucNAc-(1 \rightarrow] _n	Формула O45

Серогруппа/ Серотип	Структура группировки (O-звено)	Обозначение структуры группировки:
O45rel	[$\rightarrow 2$)- β -D-Glc-(1 \rightarrow 3)- α -L-6dTal2Ac-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow)] _n	Формула O45rel
O54	[$\rightarrow 4$)- α -d-GalpA-(1 \rightarrow 2)- α -l-Rhap-(1 \rightarrow 2)- β -d-Ribf-(1 \rightarrow 4)- β -d-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -d-GlcpNAc-(1 \rightarrow)] _n	Формула O54
O55	[$\rightarrow 6$)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalNAc-(1 \rightarrow α -Col-(1 \rightarrow 2)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)] _n	Формула O55
O56	[$\rightarrow 7$)- α -Neu5Ac-(2 \rightarrow 3)- β -D-Glc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow α -D-Gal-(1 \rightarrow 2)] _n	Формула O56
O57	$ \begin{array}{ccc} [\rightarrow 3)-\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-FucpNAc-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-D-GlcpNAc-} \\ (1\rightarrow)]_n & & \\ & \begin{array}{cc} 2 & 4 \\ \uparrow & \uparrow \\ 1 & 1 \end{array} & \\ & \alpha\text{-D-GalpA2/3Ac} & \beta\text{-D-Glcp} \end{array} $	Формула O57
O58	[3-O-[(R)-1-карбоксиитил]- α -L-Rha -(1 \rightarrow 3) $\rightarrow 4$)- α -D-Man-(1 \rightarrow 4)- α -D-Man2Ac-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow)] _n	Формула O58
O64	[β -D-Gal-(1 \rightarrow 6) $\rightarrow 3$)- α -D-ManNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcA-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc(1 \rightarrow)] _n	Формула O64
O68	$ \begin{array}{ccc} [\alpha\text{-L-Rhap} & & \alpha\text{-D-Glcp} \\ 1 & & 1 \\ \downarrow & & \downarrow \\ 3 & & 3 \\ \rightarrow 6)-\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-} \\ \text{D-Manp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{)]}_n \end{array} $	Формула O68

Серогруппа/ Серотип	Структура группировки (О-звено)	Обозначение структуры группировки:
O69	[$\rightarrow 2$)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 2)- α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow] _n	Формула O69
O73 (Штамм 73-1)	[α -D-Glc-(1 \rightarrow 3) \rightarrow 4)- α -D-Man-(1 \rightarrow 2)- α -D-Man-(1 \rightarrow 2)- β -D-Man-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalNAc(1 \rightarrow] _n	Формула O73 (Strain 73-1)
O74	$\begin{array}{c} \rightarrow 6)-\alpha\text{-D-Glc}p\text{NAc}-(1\rightarrow 4)-\beta\text{-D-GalpA}-(1\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Glc}p\text{NAc}-(1\rightarrow]_n \\ \\ [\beta\text{-D-Fuc}p3\text{NAc}-(1\rightarrow 3) \end{array}$	Формула O74
O75	[β -D-Man-(1 \rightarrow 4) \rightarrow 3)- α -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow] _n	Формула O75
O76	[\rightarrow 4)- β -D-Glc p A-(1 \rightarrow 4)- β -D-GalpNAc3Ac-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow] _n	Формула O76
O77	[\rightarrow 6)- α -D-Man-(1 \rightarrow 2)- α -D-Man-(1 \rightarrow 2)- β -D-Man-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcNAc(1 \rightarrow] _n	Формула O77
O78	[\rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-Man-(1 \rightarrow 4)- α -D-Man-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow] _n	Формула O78
O86	[α -D-Gal-(1 \rightarrow 3) \rightarrow 4)- α -L-Fuc-(1 \rightarrow 2)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalNAc-(1 \rightarrow] _n	Формула O86
O88	[α -L-6dTal-(1 \rightarrow 3) \rightarrow 4)- α -D-Man-(1 \rightarrow 3)- α -D-Man-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow] _n	Формула O88
O90	[\rightarrow 4)- α -L-Fuc2/3Ac-(1 \rightarrow 2)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalNAc-(1 \rightarrow] _n	Формула O90

Серогруппа/ Серотип	Структура группировки (О-звено)	Обозначение структуры группировки:
O98	[$\rightarrow 3$)- α -L-QuiNAc-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalNAcA-(1 \rightarrow 3)- α -L-QuiNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow)] _n	Формула O98
O104	[$\rightarrow 4$)- α -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- α -Neu5,7,9Ac ₃ -(2 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalNAc-(1 \rightarrow)] _n	Формула O104
O111	[α -Col-(1 \rightarrow 6) $\rightarrow 4$)- α -D-Glc-(1 \rightarrow 4)- α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow α -Col-(1 \rightarrow 3)] _n	Формула O111
O113	[$\rightarrow 4$)- α -D-GalNAc-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalA-(1 \rightarrow 3)- α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)] _n	Формула O113
O114	[$\rightarrow 4$)- β -D-Qui3N(<i>N</i> -ацетил-L-серил)-(1 \rightarrow 3)- β -D-Ribf-(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcNAc(1 \rightarrow)] _n	Формула O114
O119	[β -D-RhaNAc3Nfo-(1 \rightarrow 3) $\rightarrow 2$)- β -D-Man-(1 \rightarrow 3)- α -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow)] _n	Формула O119
O121	[$\rightarrow 3$)- β -D-Qui4N(<i>N</i> -ацетил-глицил)-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalNAc3AcA6N-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalNAcA-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow)] _n	Формула O121
O124	[4- <i>O</i> -[(<i>R</i>)-1-карбоксиэтил]- β -D-Glc-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glc(1 \rightarrow 4) $\rightarrow 3$)- α -D-Gal-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galf-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalNAc-(1 \rightarrow)] _n	Формула O124
O125	[α -D-Glc-(1 \rightarrow 3) $\rightarrow 4$)- β -D-GalNAc-(1 \rightarrow 2)- α -D-Man-(1 \rightarrow 3)- α -L-Fuc-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalNAc-(1 \rightarrow β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)] _n	Формула O125
O126	[$\rightarrow 2$)- β -D-Man-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow α -L-Fuc-(1 \rightarrow 2)] _n	Формула O126

Серогруппа/ Серотип	Структура группировки (O-звено)	Обозначение структуры группировки:
O127	[$\rightarrow 2$)- α -L-Fuc-(1 \rightarrow 2)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalNAc-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalNAc-(1 \rightarrow) _n	Формула O127
O128	[α -L-Fuc-(1 \rightarrow 2) $\rightarrow 6$)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalNAc-(1 \rightarrow 4)- α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalNAc-(1 \rightarrow) _n	Формула O128
O136	[$\rightarrow 4$)- β -Pse5Ac7Ac-(2 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow β -Pse5Ac7Ac=5,7-диацетамидо-3,5,7,9-тетрадезоксид- <i>L</i> -глицеро- β -L-манно-нонулозоновая кислота] _n	Формула O136
O138	[$\rightarrow 2$)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalNAcA-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow) _n	Формула O138
O140	$[\alpha\text{-D-Galp}^1(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}$ 1 \downarrow 4 $\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcpA-}$ $(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GalpNAc-(1}\rightarrow)_n$	Формула O140
O141	[α -L-Rha-(1 \rightarrow 3) $\rightarrow 4$)- α -D-Man-(1 \rightarrow 3)- α -D-Man6Ac-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow β -D-GlcA-(1 \rightarrow 2)] _n	Формула O141
O142	[$\rightarrow 2$)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 6)- α -D-GalNAc-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalNAc-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalNAc-(1 \rightarrow β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)] _n	Формула O142
O143	[$\rightarrow 2$)- β -D-GalA6R3,4Ac-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcA-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow R=1,3-дигидрокси-2-пропиламино] _n	Формула O143
O147	[$\rightarrow 2$)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 4)- β -D-GalA-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalNAc-(1 \rightarrow) _n	Формула O147

Серогруппа/ Серотип	Структура группировки (O-звено)	Обозначение структуры группировки:
O149	[$\rightarrow 3$)- β -D-GlcNAc-(S)-4,6Py-(1 \rightarrow 3)- β -L-Rha-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow (S)-4,6Py=4,6-O-[(S)-1-карбоксииэтилен]-] _n	Формула O149
O152	[β -L-Rha-(1 \rightarrow 4) $\rightarrow 3$)- α -D-GlcNAc-(1-P \rightarrow 6)- α -D-Glc-(1 \rightarrow 2)- β -D-Glc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow] _n	Формула O152
O157	[$\rightarrow 2$)- α -D-Rha4NAc-(1 \rightarrow 3)- α -L-Fuc-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glc-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalNAc-(1 \rightarrow] _n	Формула O157
O158	[α -D-Glc-(1 \rightarrow 6) $\rightarrow 4$)- α -D-Glc-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalNAc-(1 \rightarrow α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)] _n	Формула O158
O159	[α -L-Fuc-(1 \rightarrow 4) $\rightarrow 3$)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalA-(1 \rightarrow 3)- α -L-Fuc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow] _n	Формула O159
O164	[β -D-Glc-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glc(1 \rightarrow 4) $\rightarrow 3$)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galf-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalNAc-(1 \rightarrow] _n	Формула O164
O173	[α -L-Fuc-(1 \rightarrow 4) $\rightarrow 3$)- α -D-Glc-(1-P \rightarrow 6)- α -D-Glc-(1 \rightarrow 2)- β -D-Glc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow] _n	Формула O173
62D ₁ Предложен как <i>Erwinia herbicola</i>	[α -D-Gal(1 \rightarrow 6) $\rightarrow 2$)- β -D-Qui3NAc-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- α -D-FucNAc-(1 \rightarrow] _n	Формула 62D ₁
O22	[$\rightarrow 6$)- α -D-Glc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcA-(1 \rightarrow 4)- β -D-GalNAc3Ac-(1 \rightarrow 3)- α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalNAc-(1 \rightarrow] _n	Формула O22
O35	[$\rightarrow 3$)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow α -D-GalNAcA6N-(1 \rightarrow 2)] _n	Формула O35

Серогруппа/ Серотип	Структура группировки (О-звено)	Обозначение структуры группировки:
O65	[$\rightarrow 2$)- β -D-Qui3NAc-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalA6N-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GalA-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow) _n	Формула O65
O66	[$\rightarrow 2$)- β -D-Man-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- β -D-Glc3Ac-(1 \rightarrow 3)- α -L-6dTal-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcNAc(1 \rightarrow) _n	Формула O66
O83	[$\rightarrow 6$)- α -D-Glc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcA-(1 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow) _n	Формула O83
O91	[$\rightarrow 4$)- α -D-Qui3NAcyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcA6NGly-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow Acyl=(R)-3-гидроксибутирил] _n	Формула O91
O105	[β -D-Ribf-(1 \rightarrow 3) $\rightarrow 4$)- α -D-GlcA2Ac3Ac-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rha4Ac-(1 \rightarrow 3)- β -L-Rha-(1 \rightarrow 4)- β -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc6Ac-(1 \rightarrow) _n	Формула O105
O116	[$\rightarrow 2$)- β -D-Qui4NAc-(1 \rightarrow 6)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalNAc-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalA-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow) _n	Формула O116
O117	[$\rightarrow 4$)- β -D-GalNAc-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glc-(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalNAc-(1 \rightarrow) _n	Формула O117
O139	[β -D-Glc-(1 \rightarrow 3) $\rightarrow 3$)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow) _n	Формула O139
O153	[$\rightarrow 2$)- β -D-Ribf-(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow) _n	Формула O153
O167	[α -D-Galf-(1 \rightarrow 4) $\rightarrow 2$)- β -D-GalA6N(L)Ala-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- β -D-Galf-(1 \rightarrow 5)- β -D-Galf-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow) _n	Формула O167

Серогруппа/ Серотип	Структура группировки (О-звено)	Обозначение структуры группировки:
O172	$[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-FucNAc-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glc6Ac-(1-}P\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-FucNAc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcNAc-(1}\rightarrow]_n$	Формула O172
O8	$[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Man-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Man-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Man-(1}\rightarrow]_n$	Формула O8
O9a	$[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Man-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Man-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Man-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Man-(1}\rightarrow]_n$	Формула O9a
O9	$[\rightarrow 2)\text{-}[\alpha\text{-D-Man-(1}\rightarrow 2)]_2\text{-}\alpha\text{-D-Man-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Man-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Man-(1}\rightarrow]_n$	Формула O9
O20ab	$[\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Ribf-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Gal-(1}\rightarrow]_n$	Формула O20ab
O20ac	$[\alpha\text{-D-Gal-(1}\rightarrow 3) \rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Ribf-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Gal-(1}\rightarrow]_n$	Формула O20ac
O52	$[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Fucf-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-6dmanHex2Ac-(1}\rightarrow]_n$	Формула O52
O97	$[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-L-Rha-(1}\rightarrow \beta\text{-D-Xulf-(2}\rightarrow 2)\beta\text{-D-Xulf-(2}\rightarrow 2)]_n$	Формула O97

† $\beta\text{-D-6dmanHex2Ac}$ представляет собой 2-О-ацетил-6-дезоксигалакто- $\beta\text{-D-манно-}$ гептопиранозил.

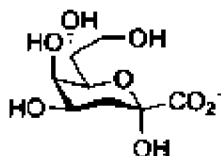
‡ $\beta\text{-D-Xulf}$ представляет собой $\beta\text{-D-трео-}$ пентофуранозил.

D. Коровый олигосахарид

В LPS *E. coli* дикого типа коровый олигосахарид располагается между Липидом А и наружной О-антигенной областью. Более конкретно, коровый олигосахарид в *E. coli* дикого типа является частью полисахарида, включающего связь между О-антигеном и

липидом А. Данная связь включает кетозидную связь между полукетальной функциональной группой самого внутреннего остатка 3-дезоксид-манно-окт-2-улозоновой кислоты (KDO) и гидроксильной группой остатка GlcNAc липида А. Область корового олигосахарида демонстрирует высокую степень сходства среди штаммов *E. coli* дикого типа. Обычно она содержит ограниченное число сахаров. Коровый олигосахарид включает в себя внутреннюю коровую область и внешнюю коровую область.

Более конкретно, внутренняя коровая область состоит преимущественно из L-глицеро-D-манно-гептозы (гептозы) и остатков KDO. Внутренняя коровая область высоко консервативна. Остаток KDO включает в себя следующую Формулу KDO:



Внешняя область корового олигосахарида демонстрирует большую вариабельность, чем внутренняя коровая область, и различия в данной области служат отличительным признаком пяти хемотипов *E. coli*: R1, R2, R3, R4, E3 и K-12. См. Фиг. 24, где показаны обобщенные структуры углеводного остова внешних коровых олигосахаридов пяти известных хемотипов. НерII является последним остатком внутренних коровых олигосахаридов. Тогда как структурная основа всех внешних коровых олигосахаридов схожа, представляя собой углеводный остов (гексоза)₃ и два остатка боковых цепей, порядок гексоз в остове, а также природа, положение и связь остатков боковой цепи могут варьировать. Структуры внешних коровых олигосахаридов R1 и R4 обладают высоким сходством, различаясь только одним β-связанным остатком.

Коровые олигосахариды *E. coli* дикого типа в области техники подразделяют на пять различных хемотипов по структуре дистального олигосахарида: *E. coli* R1, *E. coli* R2, *E. coli* R3, *E. coli* R4 и *E. coli* K12.

В предпочтительном воплощении композиции, описанные в данном документе, включают гликоконъюгаты, в которых О-полисахарид включает в себя коровый олигосахарид, связанный с О-антигеном. В одном воплощении композиция индуцирует иммунный ответ против по меньшей мере любого одного из основных хемотипов *E. coli*: *E. coli* R1, *E. coli* R2, *E. coli* R3, *E. coli* R4 и *E. coli* K12. В другом воплощении композиция индуцирует иммунный ответ против по меньшей мере двух основных хемотипов *E. coli*.

В другом воплощении композиция индуцирует иммунный ответ против по меньшей мере трех основных хемотипов *E. coli*. В другом воплощении композиция индуцирует иммунный ответ против по меньшей мере четырех основных хемотипов *E. coli*. В другом воплощении композиция индуцирует иммунный ответ против всех пяти основных хемотипов *E. coli*.

В другом предпочтительном воплощении композиции, описанные в данном документе, включают гликоконъюгаты, в которых О-полисахарид не включает в себя коровый олигосахарид, связанный с О-антигеном. В одном воплощении такая композиция индуцирует иммунный ответ против по меньшей мере любого из основных хемотипов *E. coli*: *E. coli* R1, *E. coli* R2, *E. coli* R3, *E. coli* R4 и *E. coli* K12, несмотря на то, что гликоконъюгат имеет О-полисахарид, который не включает в себя коровый олигосахарид.

Серотипы *E. coli* можно охарактеризовать одним из пяти хемотипов. В Таблице 2 перечислены примеры серотипов, охарактеризованных по хемотипу. Серотипы, указанные жирным шрифтом, представляют серотипы, которые чаще всего ассоциированы с указанным хемотипом корового олигосахарид. Соответственно, в предпочтительном воплощении композиция индуцирует иммунный ответ против *E. coli* по меньшей мере любого из основных хемотипов: *E. coli* R1, *E. coli* R2, *E. coli* R3, *E. coli* R4 и *E. coli* K12, который включает иммунный ответ против любого из соответствующих серотипов *E. coli*.

Таблица 2. Хемотип корового олигосахарид и ассоциированный серотип *E. coli*

Хемотип корового олигосахарид	Серотип
R1	O25a, O6, O2, O1 , O75, O4, O16 , O8, O18, O9, O13, O20, O21, O91 и O163.
R2	O21, O44, O11, O89, O162, O9
R3	O25b, O15, O153, O21, O17, O11, O159, O22 O86, O93
R4	O2, O1, O86, O7, O102, O160, O166
K-12	O25b , O16

В некоторых воплощениях композиция включает сахарид, включающий структуру, имеющую происхождение из серотипа, имеющего хемотип R1, например,

выбранный из сахараида, имеющего Формулу O25a, Формулу O6, Формулу O2, Формулу O1, Формулу O75, Формулу O4, Формулу O16, Формулу O8, Формулу O18, Формулу O9, Формулу O13, Формулу O20, Формулу O21, Формулу O91 и Формулу O163, где n составляет от 1 до 100. В некоторых воплощениях сахараид в указанной композиции дополнительно включает коровую группировку R1 *E. coli*, например, как показано на Фиг. 24.

В некоторых воплощениях композиция включает сахараид, включающий структуру, имеющую происхождение из серотипа, имеющего хемотип R1, например, выбранный из сахараида, имеющего Формулу O25a, Формулу O6, Формулу O2, Формулу O1, Формулу O75, Формулу O4, Формулу O16, Формулу O18, Формулу O13, Формулу O20, Формулу O21, Формулу O91 и Формулу O163, где n составляет от 1 до 100, предпочтительно от 31 до 100, более предпочтительно от 35 до 90, наиболее предпочтительно от 35 до 65. В некоторых воплощениях сахараид в указанной композиции дополнительно включает коровую группировку R1 *E. coli* в составе сахараида.

В некоторых воплощениях композиция включает сахараид, включающий структуру, имеющую происхождение из серотипа, имеющего хемотип R2, например, выбранный из сахараида, имеющего Формулу O21, Формулу O44, Формулу O11, Формулу O89, Формулу O162 и Формулу O9, где n составляет от 1 до 100, предпочтительно от 31 до 100, более предпочтительно от 35 до 90, наиболее предпочтительно от 35 до 65. В некоторых воплощениях сахараид в указанной композиции дополнительно включает коровую группировку R2 *E. coli*, например, как показано на Фиг. 24.

В некоторых воплощениях композиция включает сахараид, включающий структуру, имеющую происхождение из серотипа, имеющего хемотип R3, например, выбранный из сахараида, имеющего Формулу O25b, Формулу O15, Формулу O153, Формулу O21, Формулу O17, Формулу O11, Формулу O159, Формулу O22, Формулу O86 и Формулу O93, где n составляет от 1 до 100, предпочтительно от 31 до 100, более предпочтительно от 35 до 90, наиболее предпочтительно от 35 до 65. В некоторых воплощениях сахараид в указанной композиции дополнительно включает коровую группировку R3 *E. coli*, например, как показано на Фиг. 24.

В некоторых воплощениях композиция включает сахараид, включающий структуру, имеющую происхождение из серотипа, имеющего хемотип R4, например,

выбранный из сахараида, имеющего Формулу O2, Формулу O1, Формулу O86, Формулу O7, Формулу O102, and Формулу O166, где n составляет от 1 до 100, предпочтительно от 31 до 100, более предпочтительно от 35 до 90, наиболее предпочтительно от 35 до 65. В некоторых воплощениях сахараид в указанной композиции дополнительно включает коровую группировку R4 *E. coli*, например, как показано на Фиг. 24.

В некоторых воплощениях композиция включает сахараид, включающий структуру, имеющую происхождение из серотипа, имеющего хемотип K-12 (например, выбранный из сахараида, имеющего Формулу O25b и сахараида, имеющего Формулу O16), где n составляет от 1 до 1000, предпочтительно от 31 до 100, более предпочтительно от 35 до 90, наиболее предпочтительно от 35 до 65. В некоторых воплощениях сахараид в указанной композиции дополнительно включает коровую группировку K-12 *E. coli*, например, как показано на Фиг. 24.

В некоторых воплощениях сахараид включает коровый сахараид. Соответственно, в одном воплощении O-полисахарид дополнительно включает коровую группировку R1 *E. coli*. В другом воплощении O-полисахарид дополнительно включает коровую группировку R2 *E. coli*. В другом воплощении O-полисахарид дополнительно включает коровую группировку R3 *E. coli*. В другом воплощении O-полисахарид дополнительно включает коровую группировку R4 *E. coli*. В другом воплощении O-полисахарид дополнительно включает коровую группировку K12 *E. coli*.

В некоторых воплощениях сахараид не включает коровый сахараид. Соответственно, в одном воплощении O-полисахарид не включает коровую группировку R1 *E. coli*. В другом воплощении O-полисахарид не включает коровую группировку R2 *E. coli*. В другом воплощении O-полисахарид не включает коровую группировку R3 *E. coli*. В другом воплощении O-полисахарид не включает коровую группировку R4 *E. coli*. В другом воплощении O-полисахарид не включает коровую группировку K12 *E. coli*.

Е. Конъюгированные O-антигены

Химическое связывание O-антигенов или предпочтительно O-полисахаридов с белками-носителями может улучшать иммуногенность O-антигенов или O-полисахаридов. Однако вариабельность размера полимера представляет практическое затруднение для производства. При коммерческом применении размер сахараида может влиять на совместимость с различными стратегиями синтеза конъюгата, однородность продукта и иммуногенность конъюгата. Контролирование экспрессии регулятора длины цепи белка семейства Wzz посредством изменения пути синтеза O-антигена позволяет

получать цепи О-антигена желаемой длины в разнообразных грамтрицательных штаммах бактерий, включая *E. coli*.

В одном воплощении очищенные сахараиды химически активируют для получения активированных сахараидов, способных вступать в реакцию с белком-носителем. После активации каждый сахараид в отдельности ковалентно связывают с белком-носителем для образования конъюгата, а именно гликоконъюгата. В данном документе термин «гликоконъюгат» относится к сахараиду, ковалентно связанному с белком-носителем. В одном воплощении сахараид связан непосредственно с белком-носителем. В другом воплощении сахараид связан с белком через спейсер/линкер.

Конъюгаты можно получать согласно схемам, в которых носитель связывается с О-антигеном в одном или нескольких сайтах на всем протяжении О-антигена или согласно схемам, в которых активируется по меньшей мере один остаток корового сахараида.

В одном воплощении каждый сахараид конъюгирован одним и тем же белком-носителем.

Если белок-носитель является одинаковым для 2 или более сахараидов в композиции, сахараиды могут быть конъюгированы с одной и той же молекулой белка-носителя (например, молекулы-носители имеют 2 или более различных конъюгированных с ними сахараидов).

В предпочтительном воплощении каждый полисахарид отдельно конъюгирован с различными молекулами белковых носителей (каждая молекула белкового носителя имеет только один тип конъюгированных с ней сахараидов). В указанном воплощении говорят, что сахараиды индивидуально конъюгированы с белком-носителем.

Химической активации сахараидов и последующего конъюгирования с белком-носителем можно достигнуть способами активации и конъюгирования, раскрытыми в данном документе. После конъюгирования полисахарида с белком-носителем, гликоконъюгаты очищают (обогащают по количеству конъюгата полисахарид-белок) различными способами. Такие способы включают, например, операции концентрирования/диафильтрации, преципитации/элюирования, колоночной хроматографии и глубинного фильтрования. После очистки отдельных конъюгатов их можно объединять в смеси для составления иммуногенной композиции по данному изобретению.

Активация. Данное изобретение дополнительно относится к активированным

полисахаридам, полученным согласно любому из воплощений, описанных в данном документе, где полисахарид активируют химическим реагентом с получением реакционноспособных групп для конъюгирования с линкером или белком-носителем. В некоторых воплощениях сахарид по изобретению активируют до конъюгирования с белком-носителем. В некоторых воплощениях степень активации существенным образом не уменьшает молекулярную массу полисахарида. Например, в некоторых воплощениях степень активации не расщепляет остов полисахарида. В некоторых воплощениях степень активации существенным образом не влияет на степень конъюгирования, которую измеряют по числу модифицированных остатков лизина в белке-носителе, таком как CRM₁₉₇ (что определяют путем анализа аминокислот). Например, в некоторых воплощениях степень активации не увеличивает существенным образом число модифицированных остатков лизина (что определяют путем анализа аминокислот) в белке-носителе в 3 раза по сравнению с числом модифицированных остатков лизина в белке-носителе конъюгата с эталонным полисахаридом такой же степени активации. В некоторых воплощениях степень активации не увеличивает уровень неконъюгированного свободного сахара. В некоторых воплощениях степень активации не увеличивает оптимальное соотношение сахарид/белок.

В некоторых воплощениях активированный сахарид имеет процент активации, где моли тиола на повторяющееся звено сахара у активированного сахара составляют 1-100%, например, 2-80%, 2-50%, 3-30% и 4-25%. Степень активации составляет по меньшей мере 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% или приблизительно 100%. Предпочтительно, степень активации составляет самое большее 50%, более предпочтительно самое большее 25%. В одном воплощении степень активации составляет самое большее 20%. Для указания диапазона можно комбинировать любое минимальное значение и любое максимальное значение.

В одном воплощении полисахарид активирован 1-циано-4-диметиламинопиридиния тетрафторборатом (CDAP) с образованием цианатного сложного эфира. Активированный полисахарид затем присоединяют к аминогруппе белка-носителя (предпочтительно CRM₁₉₇ или столбнячного анатоксина) напрямую или опосредовано через спейсерную (линкерную) группу.

Например, спейсер может представлять собой цистамин или цистеамин для образования тиолированного полисахарида, который может быть присоединен к носителю посредством тиоэфирной связи, образованной в результате реакции с активированным малеимидом белком-носителем (например, с использованием N-[Y-малеимидобутирилокси]сукцинимидного эфира (GMBS)) или галоацетилованным белком-носителем (например, с использованием иодацетамида, N-сукцинимидил бромоацетата (SBA; SIB), N-сукцинимидил(4-иодацетил)аминобензоата (SIAB), сульфосукцинимидил(4-иодацетил)аминобензоата (сульфо-SIAB), N-сукцинимидил иодацетата (SIA) или сукцинимидил 3-[бромацетамидо]пропионата (SBAP)). В одном воплощении цианатный эфир (возможно, полученный с использованием CDAP) присоединяют к гександиамину или гидразиду адипиновой кислоты (ADH), а дериватизированный аминоклассами сахарид конъюгируют с белком-носителем (например, CRM₁₉₇) с использованием карбодиимида (например, EDAC или EDC) через карбоксильную группу на белке-носителе.

В других подходящих методиках конъюгирования используют карбодиимиды, гидразиды, активные эфиры, норборан, p-нитробензойную кислоту, N-гидроксисукцинимид, S-NHS, EDC, TSTU. В конъюгировании можно использовать карбонильный линкер, который может образоваться в результате реакции свободной гидроксильной группы сахараид с CDI и последующей реакцией с белком с образованием карбаматной связи. Это может включать восстановление аномерной концевой группы в первичную гидроксильную группу, возможную защиту/снятие защиты первичной гидроксильной группы, реакцию первичной гидроксильной группы с CDI с образованием карбаматного промежуточного соединения и связывание карбаматного промежуточного соединения CDI с аминоклассой белка (химия CDI).

Молекулярная масса. В некоторых воплощениях гликоконъюгат содержит сахарид, имеющий молекулярную массу от 10 кДа до 2000 кДа. В других воплощениях сахарид имеет молекулярную массу от 50 кДа до 1000 кДа. В других воплощениях сахарид имеет молекулярную массу от 70 кДа до 900 кДа. В других воплощениях сахарид имеет молекулярную массу от 100 кДа до 800 кДа. В других воплощениях сахарид имеет молекулярную массу от 200 кДа до 600 кДа. В следующих воплощениях сахарид имеет молекулярную массу от 100 кДа до 1000 кДа; 100 кДа до 900 кДа; 100 кДа до 800 кДа; 100 кДа до 700 кДа; 100 кДа до 600 кДа; 100 кДа до 500 кДа; 100 кДа до 400 кДа; 100 кДа до 300 кДа; 150 кДа до 1,000 кДа; 150 кДа до 900 кДа; 150 кДа до 800 кДа; 150 кДа до

700 кДа; 150 кДа до 600 кДа; 150 кДа до 500 кДа; 150 кДа до 400 кДа; 150 кДа до 300 кДа; 200 кДа до 1,000 кДа; 200 кДа до 900 кДа; 200 кДа до 800 кДа; 200 кДа до 700 кДа; 200 кДа до 600 кДа; 200 кДа до 500 кДа; 200 кДа до 400 кДа; 200 кДа до 300; 250 кДа до 1,000 кДа; 250 кДа до 900 кДа; 250 кДа до 800 кДа; 250 кДа до 700 кДа; 250 кДа до 600 кДа; 250 кДа до 500 кДа; 250 кДа до 400 кДа; 250 кДа до 350 кДа; 300 кДа до 1000 кДа; 300 кДа до 900 кДа; 300 кДа до 800 кДа; 300 кДа до 700 кДа; 300 кДа до 600 кДа; 300 кДа до 500 кДа; 300 кДа до 400 кДа; 400 кДа до 1,000 кДа; 400 кДа до 900 кДа; 400 кДа до 800 кДа; 400 кДа до 700 кДа; 400 кДа до 600 кДа; 500 кДа до 600 кДа. В одном воплощении гликоконъюгат, имеющий такую молекулярную массу, получают посредством конъюгирования с присоединением одним концом. В другом воплощении гликоконъюгат, имеющий такую молекулярную массу, получают посредством восстановительного аминирования (РАС) в водном буферном растворе. Любое целое значение, входящее в указанные выше диапазоны, также считают воплощением изобретения.

В некоторых воплощениях гликоконъюгат по изобретению имеет молекулярную массу от 400 кДа до 15000 кДа; от 500 кДа до 10000 кДа; от 2 000 кДа до 10000 кДа; от 3000 кДа до 8000 кДа; или от 3000 кДа до 5000 кДа. В других воплощениях гликоконъюгат имеет молекулярную массу от 500 кДа до 10000 кДа. В других воплощениях гликоконъюгат имеет молекулярную массу от 1000 кДа до 8000 кДа. В следующих воплощениях гликоконъюгат имеет молекулярную массу от 2000 кДа до 8000 кДа или от 3000 кДа до 7000 кДа. В следующих воплощениях гликоконъюгат по изобретению имеет молекулярную массу от 200 кДа до 20000 кДа; от 200 кДа до 15000 кДа; от 200 кДа до 10000 кДа; от 200 кДа до 7500 кДа; от 200 кДа до 5000 кДа; от 200 кДа до 3000 кДа; от 200 кДа до 1000 кДа; от 500 кДа до 20000 кДа; от 500 кДа до 15000 кДа; от 500 кДа до 12500 кДа; от 500 кДа до 10000 кДа; от 500 кДа до 7500 кДа; от 500 кДа до 6000 кДа; от 500 кДа до 5000 кДа; от 500 кДа до 4000 кДа; от 500 кДа до 3000 кДа; от 500 кДа до 2000 кДа; от 500 кДа до 1500 кДа; от 500 кДа до 1000 кДа; от 750 кДа до 20000 кДа; от 750 кДа до 15000 кДа; от 750кДа до 12500 кДа; от 750кДа до 10000 кДа; от 750 кДа до 7500 кДа; от 750 кДа до 6000 кДа; от 750 кДа до 5000 кДа; от 750 кДа до 4000 кДа; от 750 кДа до 3000 кДа; от 750 кДа до 2000 кДа; от 750 кДа до 1500 кДа; от 1000 кДа до 15000 кДа; от 1000 кДа до 12500 кДа; от 1000 кДа до 10000 кДа; от 1000 кДа до 7500 кДа; от 1000 кДа до 6000 кДа; от 1000 кДа до 5000 кДа; от 1000 кДа до 4000 кДа; от 1000 кДа до 2500 кДа; от 2000 кДа до 15000 кДа; от 2000 кДа до 12500 кДа; от 2000

кДа до 10000 кДа; от 2000 кДа до 7500 кДа; от 2000 кДа до 6000 кДа; от 2000 кДа до 5000 кДа; от 2000 кДа до 4000 кДа; или от 2000 кДа до 3000 кДа. В одном воплощении гликоконъюгат, имеющий такую молекулярную массу, получают посредством конъюгирования через eTEC, как описано в данном документе. В другом воплощении гликоконъюгат, имеющий такую молекулярную массу, получают посредством восстановительного аминирования (RAC). В другом воплощении гликоконъюгат, имеющий такую молекулярную массу, получают посредством восстановительного аминирования (RAC) в DMSO.

В следующих воплощениях гликоконъюгат по изобретению имеет молекулярную массу от 1000 кДа до 20000 кДа; от 1000 кДа до 15000 кДа; от 2000 кДа до 10000 кДа; от 2000 кДа до 7500 кДа; от 2000 кДа до 5000 кДа; от 3000 кДа до 20000 кДа; от 3000 кДа до 15000 кДа; от 3000 кДа до 12500 кДа; от 4000 кДа до 10000 кДа; от 4000 кДа до 7500 кДа; от 4000 кДа до 6000 кДа; или от 5000 кДа до 7000 кДа. В одном воплощении гликоконъюгат, имеющий такую молекулярную массу, получают посредством восстановительного аминирования (RAC). В другом воплощении гликоконъюгат, имеющий такую молекулярную массу, получают посредством восстановительного аминирования (RAC) в DMSO. В другом воплощении гликоконъюгат, имеющий такую молекулярную массу, получают посредством конъюгирования через eTEC, как описано в данном документе.

В следующих воплощениях гликоконъюгат по изобретению имеет молекулярную массу от 5000 кДа до 20000 кДа; от 5000 кДа до 15000 кДа; от 5000 кДа до 10000 кДа; от 5000 кДа до 7500 кДа; от 6000 кДа до 20000 кДа; от 6000 кДа до 15000 кДа; от 6000 кДа до 12500 кДа; от 6000 кДа до 10000 кДа или от 6000 кДа до 7500 кДа.

Молекулярная масса гликоконъюгата может быть измерена посредством SEC-MALLS. Любое целое значение, входящее в указанные выше диапазоны, также считают воплощением изобретения. Гликоконъюгаты по изобретению можно также характеризовать соотношением (масс./масс.) сахара к белку-носителю. В некоторых воплощениях соотношение полисахарида к белку-носителю в составе гликоконъюгата (масс./масс.) составляет от 0,5 до 3 (например, приблизительно 0,5, приблизительно 0,6, приблизительно 0,7, приблизительно 0,8, приблизительно 0,9, приблизительно 1,0, приблизительно 1,1, приблизительно 1,2, приблизительно 1,3, приблизительно 1,4, приблизительно 1,5, с приблизительно 1,6, приблизительно 1,7, приблизительно 1,8, приблизительно 1,9, приблизительно 2,0, с приблизительно 2,1, приблизительно 2,2,

приблизительно 2,3, приблизительно 2,4, приблизительно 2,5, с приблизительно 2,6, приблизительно 2,7, приблизительно 2,8, приблизительно 2,9 или приблизительно 3,0). В других воплощениях соотношение сахара к белку-носителю (масс./масс.) составляет от 0,5 до 2,0, от 0,5 до 1,5, от 0,8 до 1,2, от 0,5 до 1,0, от 1,0 до 1,5, или от 1,0 до 2,0. В следующих воплощениях соотношение сахара к белку-носителю (масс./масс.) составляет от 0,8 до 1,2. В предпочтительном воплощении соотношение полисахарида к белку-носителю в конъюгате составляет от 0,9 до 1,1. В некоторых таких воплощениях белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇.

Гликоконъюгаты можно также характеризовать распределением их молекул по размеру (K_d). Для получения распределения молекул конъюгата по относительному размеру можно использовать среду для эксклюзионной хроматографии (CL-4B). Эксклюзионную хроматографию (SEC) применяют в колонках с загрузкой самотеком для определения профиля распределения молекул конъюгатов по размеру. Крупные молекулы, не проникающие в поры среды, элюируются быстрее, чем мелкие молекулы. Для сбора элюата с колонки используют коллекторы фракций. Фракции исследуют колориметрическим способом в тесте на сахара. Для определения K_d колонки калибруют для установления фракции, в которой молекулы полностью исключены (V_0), ($K_d=0$), и фракции, представляющей максимальную ретенцию (V_i), ($K_d=1$). Фракция, в которой достигается определенная характеристика образца (V_e), связана с K_d выражением $K_d = (V_e - V_0) / (V_i - V_0)$.

Свободный сахарид. Гликоконъюгаты и иммуногенные композиции по изобретению могут включать свободный сахарид, который не конъюгирован ковалентно с белком-носителем, но тем не менее присутствует в композиции гликоконъюгата. Свободный сахарид может быть нековалентно ассоциирован (т.е. нековалентно связан с, абсорбирован или захвачен) гликоконъюгатом. В предпочтительном воплощении гликоконъюгат содержит по меньшей мере 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, или 15% свободных полисахаридов относительно общего количества полисахаридов. В предпочтительном воплощении гликоконъюгат содержит меньше, чем приблизительно 25% свободного полисахарида относительно общего количества полисахарида. В предпочтительном воплощении гликоконъюгат содержит самое большее приблизительно 20% свободного полисахарида относительно общего количества полисахарида. В предпочтительном воплощении гликоконъюгат содержит самое большее приблизительно 15% свободного полисахарида относительно общего

количества полисахарида. В другом предпочтительном воплощении гликоконъюгат содержит самое большое приблизительно 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% свободных полисахаридов относительно общего количества полисахарида. В предпочтительном воплощении гликоконъюгат содержит меньше, чем приблизительно 8% свободного полисахарида относительно общего количества полисахарида. В предпочтительном воплощении гликоконъюгат содержит самое большое приблизительно 6% свободного полисахарида относительно общего количества полисахарида. В предпочтительном воплощении гликоконъюгат содержит самое большое приблизительно 5% свободного полисахарида относительно общего количества полисахарида. См., например, Таблицу 19, **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, Таблица 2, Таблица 3, Таблица 4, Таблица 5 и Таблица 6.

Ковалентная связь. В других воплощениях конъюгат содержит по меньшей мере одну ковалентную связь между белком-носителем и сахаридом на каждые 5-10 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 2-7 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 3-8 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 4-9 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 6-11 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 7-12 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 8-13 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 9-14 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 10-15 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 2-6 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 3-7 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 4-8 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 6-10 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 7-11 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 8-12 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 9-13 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 10-14 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 10-20 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 4-25 повторяющихся сахаридных звеньев или каждые 2-25 повторяющихся сахаридных звеньев. В распространенных воплощениях белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇. В другом воплощении по меньшей мере одна связь между белком-носителем и сахаридом возникает на каждые 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 повторяющихся сахаридных звеньев полисахарида. В одном воплощении белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇. Любое целое значение, входящее в указанные выше диапазоны, также считают воплощением изобретения.

Остатки лизина. Другим способом охарактеризовать гликоконъюгат по изобретению является количество остатков лизина в белке-носителе (например, CRM₁₉₇),

которые становятся конъюгированы с сахаридом, которое можно охарактеризовать диапазоном конъюгированных лизинов (степенью конъюгирования). Свидетельства модификации лизина белка-носителя вследствие ковалентного связывания с полисахаридами можно получить рутинными способами анализа аминокислот, известными специалистам в области техники. Конъюгирование приводит к уменьшению числа восстановленных остатков лизина по сравнению с исходным материалом белка-носителя, использованного для создания конъюгированных материалов. В предпочтительном воплощении степень конъюгирования гликоконъюгата по изобретению составляет от 2 до 15, от 2 до 13, от 2 до 10, от 2 до 8, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4, от 3 до 15, от 3 до 13, от 3 до 10, от 3 до 8, от 3 до 6, от 3 до 5, от 3 до 4, от 5 до 15, от 5 до 10, от 8 до 15, от 8 до 12, от 10 до 15 или от 10 до 12. В одном воплощении степень конъюгирования гликоконъюгата по изобретению составляет приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6, приблизительно 7, приблизительно 8, приблизительно 9, приблизительно 10, приблизительно 11, приблизительно 12, приблизительно 13, приблизительно 14 или приблизительно 15. В предпочтительном воплощении степень конъюгирования гликоконъюгата по изобретению составляет от 4 до 7. В некоторых таких воплощениях белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇.

Частота присоединения сахаридных цепей к лизину на белке-носителе является еще одним параметром для характеристики гликоконъюгатов по изобретению. Например, в некоторых воплощениях по меньшей мере одна ковалентная связь между белком-носителем и полисахаридом приходится на каждые 4 повторяющихся сахаридных звена полисахарида. В другом воплощении ковалентная связь между белком-носителем и полисахаридом возникает по меньшей мере однократно на каждые 10 повторяющихся сахаридных звеньев полисахарида. В другом воплощении ковалентная связь между белком-носителем и полисахаридом возникает по меньшей мере однократно на каждые 15 повторяющихся сахаридных звеньев полисахарида. В другом воплощении ковалентная связь между белком-носителем и полисахаридом возникает по меньшей мере однократно на каждые 25 повторяющихся сахаридных звеньев полисахарида.

О-ацетилирование. В некоторых воплощениях сахараиды по изобретению являются О-ацетилированными. В некоторых воплощениях гликоконъюгат содержит сахараид, имеющий степень О-ацетилирования 10-100%, 20-100%, 30-100%, 40-100%, 50-

100%, 60-100%, 70-100%, 75-100%, 80-100%, 90-100%, 50- 90%, 60-90%, 70-90% или 80-90%. В других воплощениях степень О-ацетилирования составляет по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% или приблизительно 100%. Под % О-ацетилирования понимают процентное содержание заданного сахара относительно 100% (где каждое повторяющееся звено полностью ацетилировано относительно его ацетилированной структуры).

В некоторых воплощениях гликоконъюгат получают посредством восстановительного аминирования. В некоторых воплощениях гликоконъюгат представляет собой конъюгированный одним концом сахарид, где сахарид ковалентно связан непосредственно с белком-носителем. В некоторых воплощениях гликоконъюгат ковалентно связан с белком-носителем через спейсер (2-((2-оксоэтил)тио)этил)карбамат (eTEC).

ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЕ АМИНИРОВАНИЕ. В одном воплощении сахарид конъюгирован с белком-носителем посредством восстановительного аминирования (как описано в опубликованных заявках на патент US 2006/0228380, 2007/0231340, 2007/0184071 и 2007/0184072, WO 2006/110381, WO 2008/079653, и WO 2008/143709).

Восстановительное аминирование включает (1) окисление сахара, (2) восстановление активированного сахара и белка-носителя с образованием конъюгата. Перед окислением сахарид возможно гидролизуют. Можно осуществлять механический или химический гидролиз. Можно проводить химический гидролиз с применением уксусной кислоты.

Стадия окисления может включать реакцию с периодатом. Термин «периодат» в данном документе охватывает как периодат, так и йодную кислоту. Термин также охватывает как метапериодат (IO_4^-) и ортопериодат (IO_6^{5-}), так и различные соли периодаты (например, периодат натрия и периодат калия). В одном воплощении полисахарид окислен в присутствии метапериодата, предпочтительно в присутствии периодата натрия (NaIO_4). В другом воплощении полисахарид окислен в присутствии ортопериодата, предпочтительно в присутствии иодной кислоты.

В одном воплощении окисляющий агент представляет собой стабильный нитроксил- или нитроксид-радикальное соединение, такое как пиперидин-N-окси или пирролидин-N-окси соединения, в присутствии окислителя для избирательного

окисления первичных гидроксильных групп. В указанной реакции фактическим окислителем в каталитическом цикле является N-оксоаммониевая соль. В одном аспекте указанное стабильное нитроксил- или нитроксид-радикальное соединение представляет собой пиперидин-N-окси или пирролидин-N-окси соединения. В другом аспекте указанное стабильное нитроксил- или нитроксид-радикальное соединение несет группировку TEMPO (2,2,6,6-тетраметил-1-пиперидинилокси) или PROXYL (2,2,5,5-тетраметил-1-пирролидинилокси). В одном аспекте указанное стабильное нитроксил-радикальное соединение представляет собой TEMPO или его производное. В другом аспекте указанный окислитель представляет собой молекулу, несущую группировку N-галоген. В одном аспекте указанный окислитель выбран из любого из N-хлорсукцинимид, N-бромсукцинимид, N-йодсукцинимид, дихлоризоциануровой кислоты, 1,3,5-трихлор-1,3,5-триазинан-2,4,6-триона, дибромизоциануровой кислоты, 1,3,5-трибром-1,3,5-триазинан-2,4,6-триона, диiodоизоциануровой кислоты, 1,3,5-триiod-1,3,5-триазинан-2,4,6-триона. Предпочтительно, указанный окислитель представляет собой N-хлорсукцинимид.

После стадии окисления сахара сахарид считается активированным и обозначается далее в данном документе как «активированный». Активированный сахарид и белок-носитель могут быть лиофилизированы (подвергнуты сублимационной сушке) либо независимо (раздельная лиофилизация), либо вместе (совместная лиофилизация). В одном воплощении активированный сахарид и белок-носитель лиофилизируют совместно. В другом воплощении активированный сахарид и белок-носитель лиофилизируют независимо.

В одном воплощении лиофилизация происходит в присутствии невосстанавливающего сахара, возможные невосстанавливающие сахара включают сахарозу, трегалозу, раффинозу, стахиозу, меллицитозу, декстран, маннитол, лактит и палатинит.

Следующей стадией процесса конъюгирования является восстановление активированного сахара и белка-носителя с образованием конъюгата (так называемое восстановительное аминирование) с использованием восстанавливающего агента. Подходящие восстанавливающие агенты включают цианоборогидриды, такие как цианоборогидрид натрия, триацетоксиборогидрид натрия или борогидрид натрия или цинка в присутствии кислот Брэнстеда или Льюиса, аминобораны, такие как пиридинборан, 2-пиколинборан, 2,6-диборан-метанол, диметиламин-боран, t-BuMeⁱPrN-

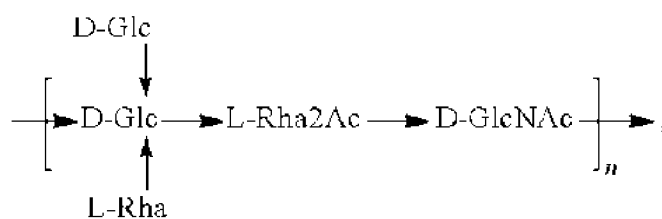
BH_3 , бензиламин- BH_3 или 5-этил-2-метилпиридинборан (PEMB), боран-пиридин или борогидрид-обменную смолу. В одном воплощении восстанавливающий агент представляет собой цианоборогидрид натрия.

В одном воплощении реакцию восстановления осуществляют в водном растворителе (например, выбранном из PBS, MES, HEPES, Bis-tris, ADA, PIPES, MOPSO, BES, MOPS, DIPSO, MOBS, HEPPSO, POPSO, TEA, EPPS, бицина или HEPB с pH от приблизительно 6,0 до 8,5, от 7,0 до 8,0 или от 7,0 до 7,5), в другом воплощении реакцию проводят в апротонном растворителе. В воплощении реакцию восстановления проводят в растворителе DMSO (диметилсульфоксид) или в DMF (диметилформамид). Растворитель DMSO или DMF можно использовать для растворения лиофилизированных активированного полисахарида и белка-носителя.

В конце реакции восстановления в конъюгатах могут оставаться непрореагировавшие альдегидные группы, которые можно кэпировать при помощи подходящего кэпирующего агента. В одном воплощении кэпирующий агент представляет собой борогидрид натрия (NaBH_4). После конъюгирования (реакции восстановления и, возможно, кэпирования) гликоконъюгаты можно очищать (обогащать по количеству конъюгата полисахарид-белок) множеством способов, известных специалистам в области техники. Такие способы включают диализ, операции концентрирования/диафильтрации, тангенциальную поточную фильтрацию, преципитацию/элюирование, колоночную хроматографию (DEAE или хроматографию гидрофобных взаимодействий) и глубинное фильтрование. Гликоконъюгаты могут быть очищены путем диафильтрации и/или ионообменной хроматографии и/или эксклюзионной хроматографии. В воплощении гликоконъюгаты очищают путем диафильтрации и/или ионообменной хроматографии и/или эксклюзионной хроматографии. В одном воплощении гликоконъюгат стерилизуют фильтрованием.

В предпочтительном воплощении гликоконъюгат любого серотипа *E. coli*, выбранного из O25B, O1, O2 и O6, получают посредством восстановительного аминирования. В предпочтительном воплощении гликоконъюгаты *E. coli* серотипов O25B, O1, O2 и O6 получают посредством восстановительного аминирования.

В одном аспекте изобретение относится к конъюгату, включающему белок-носитель, например, CRM₁₉₇, связанный с сахаридом Формулы O25B, представленной



, где n представляет собой любое целое

число больше или равное 1. В предпочтительном воплощении n представляет собой целое число по меньшей мере 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 и самое большее 200, 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 81, 80, 79, 78, 77, 76, 75, 74, 73, 72, 71, 70, 69, 68, 67, 66, 65, 60, 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 51 или 50. Для указания диапазона можно комбинировать любое минимальное значение и любое максимальное значение. Примеры диапазонов включают, например, от по меньшей мере 1 до самое большее 1000; от по меньшей мере 10 до самое большее 500 и от по меньшей мере 20 до самое большее 80. В одном предпочтительном воплощении n представляет собой от по меньшей мере 31 до самое большее 90, более предпочтительно от 40 до 90, наиболее предпочтительно от 60 до 85.

В другом аспекте изобретение относится к конъюгату, включающему белок-носитель, например CRM₁₉₇, связанный с сахаридом, имеющим одну из следующих структур, представленных в Таблице 1 (см. также Фиг. 9А-9С и Фиг. 10А-10В), где n представляет собой целое число больше или равное 1.

Не ограничиваясь конкретной теорией или механизмом, в некоторых воплощениях полагают, что требуется такой уровень модификации сахаридного антигена в стабильном конъюгате, который бы уравнивался сохранением структурной целостности ключевых иммуногенных эпитопов антигена.

Активация и образование альдегида. В некоторых воплощениях сахарид по изобретению активируют, что приводит к образованию альдегида. В таких воплощениях, когда сахарид активирован, процент (%) активации (или степень окисления (DO)) (см., например, Пример 31) относится к молям повторяющихся сахаридных звеньев на моль альдегида активированного полисахарида. Например, в некоторых воплощениях сахарид активируют посредством периодатного окисления vicинальных диолов в повторяющемся звене полисахарида, что приводит к образованию альдегида. Варьирование молярных эквивалентов (meq) периодата натрия относительно повторяющихся звеньев сахара и температуры в ходе окисления приводит к варьирующей степени окисления (DO).

Концентрации сахара и альдегида обычно определяют колориметрическими методами. Альтернативным реагентом является комбинация ТЕМПО (2,2,6,6-тетраметилпиперидин 1-оксильный радикал)–N-хлорсукцинимид (NCS).

В некоторых воплощениях активированный сахарид имеет степень окисления, где моли повторяющегося звена сахара на моли альдегида активированного сахара составляют от 1 до 100, например, от 2 до 80, от 2 до 50, от 3 до 30 и от 4 до 25. Степень активации составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80 или по меньшей мере 90 или приблизительно 100. Предпочтительно, степень окисления (DO) составляет по меньшей мере 5 и самое большее 50, более предпочтительно по меньшей мере 10 и самое большее 25. В одном воплощении степень активации составляет по меньшей мере 10 и самое большее 25. Для указания диапазона можно комбинировать любое минимальное значение и любое максимальное значение. Значение степени окисления может быть представлено как процент (%) активации. Например, в одном воплощении значение DO равное 10 относится к одному повторяющемуся звену активированного сахара на сумму 10 повторяющихся звеньев активированного сахара, в этом случае значение DO равное 10 можно представить как активацию 10%.

В некоторых воплощениях конъюгат, полученный посредством восстановительного аминирования, включает белок-носитель и сахарид, где сахарид включает структуру, выбранную из любой из Формулы O1 (например, Формулы O1A, Формулы O1B и Формулы O1C), Формулы O2, Формулы O3, Формулы O4 (например, Формулы O4:K52 и Формулы O4:K6), Формулы O5 (например, Формулы O5ab и Формулы O5ac (штамм 180/C3)), Формулы O6 (например, Формулы O6:K2; K13; K15 и Формулы O6:K54), Формулы O7, Формулы O8, Формулы O9, Формулы O10, Формулы O11, Формулы O12, Формулы O13, Формулы O14, Формулы O15, Формулы O16, Формулы O17, Формулы O18 (например, Формулы O18A, Формулы O18ac, Формулы O18A1, Формулы O18B и Формулы O18B1), Формулы O19, Формулы O20, Формулы O21, Формулы O22, Формулы O23 (например, Формулы O23A), Формулы O24, Формулы O25 (например, Формулы O25a и Формулы O25b), Формулы O26, Формулы O27, Формулы O28, Формулы O29, Формулы O30, Формулы O32, Формулы O33, Формулы O34, Формулы O35, Формулы O36, Формулы O37, Формулы O38, Формулы O39, Формулы O40, Формулы O41, Формулы O42, Формулы O43, Формулы O44, Формулы

O45 (например, Формулы O45 и Формулы O45rel), Формулы O46, Формулы O48, Формулы O49, Формулы O50, Формулы O51, Формулы O52, Формулы O53, Формулы O54, Формулы O55, Формулы O56, Формулы O57, Формулы O58, Формулы O59, Формулы O60, Формулы O61, Формулы O62, Формулы 62D₁, Формулы O63, Формулы O64, Формулы O65, Формулы O66, Формулы O68, Формулы O69, Формулы O70, Формулы O71, Формулы O73 (например, Формулы O73 (штамм 73-1)), Формулы O74, Формулы O75, Формулы O76, Формулы O77, Формулы O78, Формулы O79, Формулы O80, Формулы O81, Формулы O82, Формулы O83, Формулы O84, Формулы O85, Формулы O86, Формулы O87, Формулы O88, Формулы O89, Формулы O90, Формулы O91, Формулы O92, Формулы O93, Формулы O95, Формулы O96, Формулы O97, Формулы O98, Формулы O99, Формулы O100, Формулы O101, Формулы O102, Формулы O103, Формулы O104, Формулы O105, Формулы O106, Формулы O107, Формулы O108, Формулы O109, Формулы O110, Формулы O111, Формулы O112, Формулы O113, Формулы O114, Формулы O115, Формулы O116, Формулы O117, Формулы O118, Формулы O119, Формулы O120, Формулы O121, Формулы O123, Формулы O124, Формулы O125, Формулы O126, Формулы O127, Формулы O128, Формулы O129, Формулы O130, Формулы O131, Формулы O132, Формулы O133, Формулы O134, Формулы O135, Формулы O136, Формулы O137, Формулы O138, Формулы O139, Формулы O140, Формулы O141, Формулы O142, Формулы O143, Формулы O144, Формулы O145, Формулы O146, Формулы O147, Формулы O148, Формулы O149, Формулы O150, Формулы O151, Формулы O152, Формулы O153, Формулы O154, Формулы O155, Формулы O156, Формулы O157, Формулы O158, Формулы O159, Формулы O160, Формулы O161, Формулы O162, Формулы O163, Формулы O164, Формулы O165, Формулы O166, Формулы O167, Формулы O168, Формулы O169, Формулы O170, Формулы O171, Формулы O172, Формулы O173, Формулы O174, Формулы O175, Формулы O176, Формулы O177, Формулы O178, Формулы O179, Формулы O180, Формулы O181, Формулы O182, Формулы O183, Формулы O184, Формулы O185, Формулы O186 и Формулы O187. В некоторых воплощениях сахарид в конъюгате включает Формулу, где n представляет собой целое число от 1 до 1000, от 5 до 1000, предпочтительно от 31 до 100, более предпочтительно от 35 до 90, наиболее предпочтительно от 35 до 65.

КОНЬЮГАТЫ, ПРИСОЕДИНЕННЫЕ ОДНИМ КОНЦОМ. В некоторых воплощениях конъюгат представляет собой конъюгированный одним концом сахарид,

где сахарид ковалентно связан одним концом с белком-носителем. В некоторых воплощениях конъюгированный одним концом полисахарид имеет концевой сахарид. Например, конъюгат является присоединенным одним концом, если один из концов (концевой сахаридный остаток) полисахарида ковалентно связан с белком-носителем. В некоторых воплощениях конъюгат является присоединенным одним концом, если концевой сахаридный остаток полисахарида ковалентно связан с белком-носителем через линкер. Такие линкеры могут включать, например, цистаминовый линкер (A1), линкер 3,3'-дитио бис(пропановый дигидразид) (A4) и линкер 2,2'-дитио-N,N'-бис(этан-2,1-диил)бис(2-(аминоокси)ацетамид) (A6).

В некоторых воплощениях сахарид конъюгирован с белком-носителем через остаток 3-дезоксид-манно-окт-2-улозоновой кислоты (KDO) с образованием конъюгата, присоединенного одним концом. См., например, Пример 26, Пример 27, Пример 28 и Фиг. 17.

В некоторых воплощениях конъюгат предпочтительно не представляет собой биоконъюгат. Термин «биоконъюгат» относится к конъюгату между белком (например, белком-носителем) и антигеном, например O-антигеном (например, O25B), полученным в клетке-хозяине, где аппарат клетки-хозяина связывает антиген с белком (например, связывает с N). Гликоконъюгаты включают биоконъюгаты, а также конъюгаты антигена, представляющего собой сахар (например, олиго- и полисахариды), с белком, полученные способами, которые не требуют получения конъюгата в клетке-хозяине, например конъюгирование посредством химического связывания белка и сахара.

Активированные тиолом сахараиды. В некоторых воплощениях сахарид по изобретению активирован тиолом. В таких воплощениях, когда сахарид активирован тиолом, процент (%) активации относится к молям тиола на повторяющееся сахаридное звено активированного полисахарида. Концентрации сахараиды и тиола обычно определяют методом Элмана для количественного определения сульфгидрилов. Например, в некоторых воплощениях сахарид включает 2-кето-3-дозоксиоктановую кислоту (KDO), активированную линкером дисульфидамин. См., например, Пример 10 и Фиг. 31. В некоторых воплощениях сахарид ковалентно связан с белком-носителем через двухвалентный гетеробифункциональный линкер (также обозначаемый в данном документе как «спейсер»). Линкер предпочтительно обеспечивает тиоэфирную связь между сахаридом и белком-носителем, в результате чего образуется гликоконъюгат, обозначаемый в данном документе как «тиоэфирный гликоконъюгат». В некоторых

воплощениях линкер дополнительно обеспечивает карбаматные и амидные связи, например, такие как (2-((2-оксоэтил)тио)этил) карбамат (eTEC). См., например, Пример 21.

В некоторых воплощениях конъюгат, присоединенный одним концом, включает белок-носитель и сахарид, где сахарид включает структуру, выбранную из любой из Формулы O1 (например, Формулы O1A, Формулы O1B и Формулы O1C), Формулы O2, Формулы O3, Формулы O4 (например, Формулы O4:K52 и Формулы O4:K6), Формулы O5 (например, Формулы O5ab и Формулы O5ac (штамм 180/C3)), Формулы O6 (например, Формулы O6:K2; K13; K15 и Формулы O6:K54), Формулы O7, Формулы O8, Формулы O9, Формулы O10, Формулы O11, Формулы O12, Формулы O13, Формулы O14, Формулы O15, Формулы O16, Формулы O17, Формулы O18 (например, Формулы O18A, Формулы O18ac, Формулы O18A1, Формулы O18B и Формулы O18B1), Формулы O19, Формулы O20, Формулы O21, Формулы O22, Формулы O23 (например, Формулы O23A), Формулы O24, Формулы O25 (например, Формулы O25a и Формулы O25b), Формулы O26, Формулы O27, Формулы O28, Формулы O29, Формулы O30, Формулы O32, Формулы O33, Формулы O34, Формулы O35, Формулы O36, Формулы O37, Формулы O38, Формулы O39, Формулы O40, Формулы O41, Формулы O42, Формулы O43, Формулы O44, Формулы O45 (например, Формулы O45 и Формулы O45rel), Формулы O46, Формулы O48, Формулы O49, Формулы O50, Формулы O51, Формулы O52, Формулы O53, Формулы O54, Формулы O55, Формулы O56, Формулы O57, Формулы O58, Формулы O59, Формулы O60, Формулы O61, Формулы O62, Формулы 62D₁, Формулы O63, Формулы O64, Формулы O65, Формулы O66, Формулы O68, Формулы O69, Формулы O70, Формулы O71, Формулы O73 (например, Формулы O73 (штамм 73-1)), Формулы O74, Формулы O75, Формулы O76, Формулы O77, Формулы O78, Формулы O79, Формулы O80, Формулы O81, Формулы O82, Формулы O83, Формулы O84, Формулы O85, Формулы O86, Формулы O87, Формулы O88, Формулы O89, Формулы O90, Формулы O91, Формулы O92, Формулы O93, Формулы O95, Формулы O96, Формулы O97, Формулы O98, Формулы O99, Формулы O100, Формулы O101, Формулы O102, Формулы O103, Формулы O104, Формулы O105, Формулы O106, Формулы O107, Формулы O108, Формулы O109, Формулы O110, Формулы O111, Формулы O112, Формулы O113, Формулы O114, Формулы O115, Формулы O116, Формулы O117, Формулы O118, Формулы O119, Формулы O120, Формулы O121, Формулы O123, Формулы O124, Формулы O125, Формулы O126, Формулы O127,

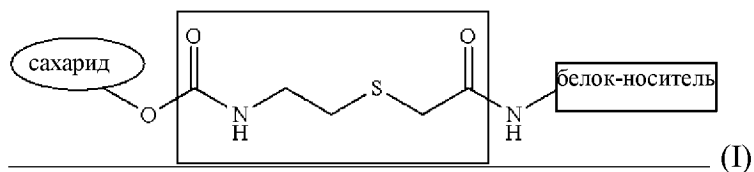
Формулы O128, Формулы O129, Формулы O130, Формулы O131, Формулы O132, Формулы O133, Формулы O134, Формулы O135, Формулы O136, Формулы O137, Формулы O138, Формулы O139, Формулы O140, Формулы O141, Формулы O142, Формулы O143, Формулы O144, Формулы O145, Формулы O146, Формулы O147, Формулы O148, Формулы O149, Формулы O150, Формулы O151, Формулы O152, Формулы O153, Формулы O154, Формулы O155, Формулы O156, Формулы O157, Формулы O158, Формулы O159, Формулы O160, Формулы O161, Формулы O162, Формулы O163, Формулы O164, Формулы O165, Формулы O166, Формулы O167, Формулы O168, Формулы O169, Формулы O170, Формулы O171, Формулы O172, Формулы O173, Формулы O174, Формулы O175, Формулы O176, Формулы O177, Формулы O178, Формулы O179, Формулы O180, Формулы O181, Формулы O182, Формулы O183, Формулы O184, Формулы O185, Формулы O186 и Формулы O187. В некоторых воплощениях сахарид в конъюгате включает Формулу, где n представляет собой целое число от 1 до 1000, от 5 до 1000, предпочтительно от 31 до 100, более предпочтительно от 35 до 90, наиболее предпочтительно от 35 до 65.

Например, в одном воплощении конъюгат, присоединенный одним концом, включает в себя белок-носитель и сахарид, имеющий структуру, выбранную из Формулы O8, Формулы O9a, Формулы O9, Формулы O20ab, Формулы O20ac, Формулы O52, Формулы O97 и Формулы O101, где n представляет собой целое число от 1 до 10.

F. Конъюгаты eTEC

В одном аспекте изобретение в целом относится к гликоконъюгатам, содержащим сахарид, имеющий происхождение из *E. coli*, описанный выше, ковалентно конъюгированный с белком-носителем через спейсер (2-((2-оксоэтил)тио)этил)карбамат (eTEC) (как описано, например, в патенте US 9517274 и публикации Международной заявки на патент WO2014027302, включенных в данное описание во всей полноте путем ссылки), включая иммуногенные композиции, содержащие такие гликоконъюгаты, и способы получения и применения таких гликоконъюгатов и иммуногенных композиций. Указанные гликоконъюгаты содержат сахарид, ковалентно конъюгированный с белком-носителем через один или более спейсеров eTEC, где сахарид ковалентно конъюгирован со спейсером eTEC через карбаматную связь, и где белок-носитель ковалентно конъюгирован со спейсером eTEC через амидную связь. Спейсер eTEC включает семь линейно расположенных атомов (то есть $-C(O)NH(CH_2)_2SCH_2C(O)-$) и обеспечивает стабильные тиозфирную и амидную связи между сахаридом и белком-носителем.

Гликоконъюгаты eTEC по изобретению можно представить общей формулой (I):



где атомы, составляющие спейсер eTEC, находятся в центральном прямоугольнике.

В указанных гликоконъюгатах по изобретению сахарид может представлять собой полисахарид или олигосахарид.

Белки-носители, включенные в гликоконъюгаты по изобретению, выбраны из группы белков-носителей, обычно подходящих для таких целей, как описано в данном документе ниже или известно специалистам в области техники. В конкретных воплощениях белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇.

В другом аспекте изобретения предложен способ получения гликоконъюгата, содержащего сахарид, описанный в данном документе, конъюгированный с белком-носителем через спейсер eTEC, включающий стадии а) осуществления реакции сахара с производным карбоновой кислоты в органическом растворителе с получением активированного сахара; б) осуществления реакции активированного сахара с цистамином или цистеамином или их солью с получением тиолированного сахара; в) осуществления реакции тиолированного сахара с восстанавливающим агентом с получением активированного тиолированного сахара, содержащего один или более свободных сульфгидрильных остатков; г) осуществления реакции активированного тиолированного сахара с активированным белком-носителем, содержащим одну или более α-галоацетамидных групп, с получением конъюгата тиолированного сахара с белком-носителем; и д) осуществления реакции конъюгата тиолированного сахара с белком-носителем с (i) первым кэпирующим реагентом, способным кэпировать неконъюгированные α-галоацетамидные группы активированного белка-носителя; и/или (ii) вторым кэпирующим реагентом, способным кэпировать неконъюгированные свободные сульфгидрильные остатки активированного тиолированного сахара; с получением связанного с eTEC гликоконъюгата.

В распространенных воплощениях производное карбоновой кислоты представляет собой 1,1'-карбонил-ди-(1,2,4-триазол) (CDT) или 1,1'-карбонилдиимидазол (CDI). Предпочтительно, производное карбоновой кислоты

представляет собой CDT, а органический растворитель представляет собой полярный апротонный растворитель, такой как диметилсульфоксид (DMSO). В предпочтительных воплощениях тиолированный сахарид получают путем реакции активированного сахара с бифункциональным симметричным тиоалкиламиновым реагентом, цистамином или его солью. В качестве альтернативы тиолированный сахарид может быть образован в реакции активированного сахара с цистеамином или его солью. Связанные с eTEC гликоконъюгаты, полученные способами по изобретению, можно представить общей формулой (I).

В распространенных воплощениях первый кэпирующий реагент представляет собой N-ацетил-L-цистеин, который вступает в реакцию с неконъюгированными α -галоацетамидными группами на остатках лизина белка-носителя с образованием остатка S-карбоксиметилцистеина (СМС), ковалентно связанного с активированным остатком лизина через тиоэфирную связь.

В других воплощениях второй кэпирующий реагент представляет собой иодоацетамид (IAA), вступающий в реакцию с неконъюгированными свободными сульфгидрильными группами активированного тиолированного сахара с получением кэпированного тиоацетамида. Часто стадия д) включает кэпирование как первым кэпирующим реагентом, так и вторым кэпирующим реагентом. В некоторых воплощениях стадия д) включает кэпирование N-ацетил-L-цистеином в качестве первого кэпирующего реагента и IAA в качестве второго кэпирующего реагента.

В некоторых воплощениях стадия кэпирования д) дополнительно включает реакцию с восстанавливающим агентом, например, DTT, TCEP или меркаптоэтанолам после реакции с первым и/или вторым кэпирующим реагентом.

Связанные с eTEC гликоконъюгаты и иммуногенные композиции по изобретению могут включать в себя свободные сульфгидрильные остатки. В некоторых случаях активированные тиолированные сахара, образованные описанными здесь способами, будут включать множество свободных сульфгидрильных остатков, некоторые из которых могут не подвергаться ковалентному конъюгированию с белком-носителем в ходе стадии конъюгирования. Такие свободные сульфгидрильные остатки кэпируют путем реакции с кэпирующим реагентом, вступающим в реакцию с тиолом, например иодоацетамидом (IAA), для кэпирования потенциально реакционноспособной функциональной группы. Также рассматриваются другие кэпирующие реагенты, вступающие в реакцию с тиолом, например реагенты, содержащие малеимид и им

подобные.

Кроме того, связанные с eТЕС гликоконъюгаты и иммуногенные композиции по изобретению могут включать в себя остаточный неконъюгированный белок-носитель, который может включать активированный белок-носитель, прошедший модификацию в ходе стадий процесса кэпирования.

В некоторых воплощениях на стадии г) перед осуществлением реакции активированного тиолированного сахара с активированным белком-носителем дополнительно обеспечивают активированный белок-носитель, содержащий одну или более α -галоацетамидных групп. В распространенных воплощениях активированный белок-носитель содержит одну или более α -бромацетамидных групп.

В другом аспекте изобретения предложен связанный с eТЕС гликоконъюгат, содержащий сахарид, описанный в данном документе, конъюгированный с белком-носителем через спейсер eТЕС, полученный согласно любому из описанных здесь способов.

В некоторых воплощениях белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇, а ковалентная связь через спейсер eТЕС между CRM₁₉₇ и полисахаридом возникает по меньшей мере однократно на каждые 4, 10, 15 или 25 повторяющихся сахаридных звеньев полисахарида.

Для каждого из аспектов изобретения, в частности, воплощений способов и композиций, описанных в данном документе, связанный с eТЕС гликоконъюгат содержит сахарид, описанный в данном документе, такой как сахарид, имеющий происхождение из *E. coli*.

В другом аспекте изобретения предложен способ предупреждения, лечения или облегчения бактериальной инфекции, заболевания или состояния у субъекта, включающий введение субъекту иммунологически эффективного количества иммуногенной композиции по изобретению, где указанная иммуногенная композиция содержит связанный с eТЕС гликоконъюгат, содержащий сахарид, описанный в данном документе. В некоторых воплощениях сахарид имеет происхождение из *E. coli*.

В некоторых воплощениях связанный с eТЕС гликоконъюгат содержит белок-носитель и сахарид, где указанный сахарид содержит структуру, выбранную из любой из Формулы О1 (например, Формулы О1А, Формулы О1В и Формулы О1С), Формулы О2, Формулы О3, Формулы О4 (например, Формулы О4:К52 и Формулы О4:К6), Формулы О5 (например, Формулы О5ab и Формулы О5ac (штамм 180/С3)), Формулы О6

(например, Формулы O6:K2; K13; K15 и Формулы O6:K54), Формулы O7, Формулы O8, Формулы O9, Формулы O10, Формулы O11, Формулы O12, Формулы O13, Формулы O14, Формулы O15, Формулы O16, Формулы O17, Формулы O18 (например, Формулы O18A, Формулы O18ac, Формулы O18A1, Формулы O18B и Формулы O18B1), Формулы O19, Формулы O20, Формулы O21, Формулы O22, Формулы O23 (например, Формулы O23A), Формулы O24, Формулы O25 (например, Формулы O25a и Формулы O25b), Формулы O26, Формулы O27, Формулы O28, Формулы O29, Формулы O30, Формулы O32, Формулы O33, Формулы O34, Формулы O35, Формулы O36, Формулы O37, Формулы O38, Формулы O39, Формулы O40, Формулы O41, Формулы O42, Формулы O43, Формулы O44, Формулы O45 (например, Формулы O45 и Формулы O45rel), Формулы O46, Формулы O48, Формулы O49, Формулы O50, Формулы O51, Формулы O52, Формулы O53, Формулы O54, Формулы O55, Формулы O56, Формулы O57, Формулы O58, Формулы O59, Формулы O60, Формулы O61, Формулы O62, Формулы 62D₁, Формулы O63, Формулы O64, Формулы O65, Формулы O66, Формулы O68, Формулы O69, Формулы O70, Формулы O71, Формулы O73 (например, Формулы O73 (штамм 73-1)), Формулы O74, Формулы O75, Формулы O76, Формулы O77, Формулы O78, Формулы O79, Формулы O80, Формулы O81, Формулы O82, Формулы O83, Формулы O84, Формулы O85, Формулы O86, Формулы O87, Формулы O88, Формулы O89, Формулы O90, Формулы O91, Формулы O92, Формулы O93, Формулы O95, Формулы O96, Формулы O97, Формулы O98, Формулы O99, Формулы O100, Формулы O101, Формулы O102, Формулы O103, Формулы O104, Формулы O105, Формулы O106, Формулы O107, Формулы O108, Формулы O109, Формулы O110, Формулы O111, Формулы O112, Формулы O113, Формулы O114, Формулы O115, Формулы O116, Формулы O117, Формулы O118, Формулы O119, Формулы O120, Формулы O121, Формулы O123, Формулы O124, Формулы O125, Формулы O126, Формулы O127, Формулы O128, Формулы O129, Формулы O130, Формулы O131, Формулы O132, Формулы O133, Формулы O134, Формулы O135, Формулы O136, Формулы O137, Формулы O138, Формулы O139, Формулы O140, Формулы O141, Формулы O142, Формулы O143, Формулы O144, Формулы O145, Формулы O146, Формулы O147, Формулы O148, Формулы O149, Формулы O150, Формулы O151, Формулы O152, Формулы O153, Формулы O154, Формулы O155, Формулы O156, Формулы O157, Формулы O158, Формулы O159, Формулы O160, Формулы O161, Формулы O162, Формулы O163, Формулы O164, Формулы O165, Формулы O166, Формулы O167,

Формулы O168, Формулы O169, Формулы O170, Формулы O171, Формулы O172, Формулы O173, Формулы O174, Формулы O175, Формулы O176, Формулы O177, Формулы O178, Формулы O179, Формулы O180, Формулы O181, Формулы O182, Формулы O183, Формулы O184, Формулы O185, Формулы O186 и Формулы O187. В некоторых воплощениях сахарид в конъюгате включает Формулу, где n представляет собой целое число от 1 до 1000, от 5 до 1000, предпочтительно от 31 до 100, более предпочтительно от 35 до 90, наиболее предпочтительно от 35 до 65.

Количество остатков лизина в белке-носителе, который становится конъюгированным с сахаридом, можно охарактеризовать диапазоном конъюгированных лизинов. Например, в некоторых воплощениях иммуногенных композиций, CRM₁₉₇ может содержать от 4 до 16 остатков лизина, ковалентно связанных с сахаридом, из 39. Другой способ выражения данного параметра это от приблизительно 10% до приблизительно 41% лизинов CRM₁₉₇, которые ковалентно связаны с сахаридом. В других воплощениях CRM₁₉₇ может содержать от 2 до 20 остатков лизина, ковалентно связанных с сахаридом, из 39. Другой способ выражения данного параметра – это от приблизительно 5% до приблизительно 50% лизинов CRM₁₉₇, которые ковалентно связаны с сахаридом.

В распространенных воплощениях белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇, а ковалентная связь через спейсер eTEC между CRM₁₉₇ и полисахаридом возникает по меньшей мере однократно на каждые 4, 10, 15 или 25 повторяющихся сахаридных звеньев полисахарида.

В других воплощениях конъюгат содержит по меньшей мере одну ковалентную связь между белком-носителем и сахаридом на каждые 5-10 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 2-7 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 3-8 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 4-9 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 6-11 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 7-12 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 8-13 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 9-14 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 10-15 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 2-6 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 3-7 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 4-8 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 6-10 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 7-11 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 8-12 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 9-13 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 10-14 повторяющихся сахаридных звеньев; каждые 10-20 повторяющихся

сахаридных звеньев или каждые 4-25 повторяющихся сахаридных звеньев.

В другом воплощении по меньшей мере одна связь между белком-носителем и сахаридом возникает на каждые 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 повторяющихся сахаридных звеньев полисахарида.

G. БЕЛКИ-НОСИТЕЛИ

Компонент гликоконъюгата по изобретению представляет собой белок-носитель, с которым конъюгирован сахарид. Термины «белковый носитель» или «белок-носитель» или «носитель» могут использоваться здесь взаимозаменяемо. Белки-носители должны быть пригодны для стандартных процедур конъюгирования.

Один компонент конъюгата представляет собой белок-носитель, с которым конъюгирован O-полисахарид. В одном воплощении конъюгат включает в себя белок-носитель, конъюгированный с коровым олигосахаридом O-полисахарида (см. Фиг. 24). В другом воплощении конъюгат включает в себя белок-носитель, конъюгированный с O-антигеном O-полисахарида.

Термины «белковый носитель» или «белок-носитель» или «носитель» могут использоваться здесь взаимозаменяемо. Белки-носители должны быть пригодны для стандартных процедур конъюгирования.

В предпочтительном воплощении белок-носитель конъюгатов независимо выбран из любого из: TT, DT, мутантов DT (таких как CRM₁₉₇), белка D из *H. influenzae*, PhtX, PhtD, слитых белков PhtDE (в частности, описанных в WO 01/98334 и WO 03/54007), обезвреженного пневмолизина, PofB, белка N19, PspA, OMPC, токсина A или B из *C. Difficile* и PsaA. В воплощении белок-носитель из конъюгатов по изобретению представляет собой DT (дифтерийный анатоксин). В другом воплощении белок-носитель из конъюгатов по изобретению представляет собой TT (столбнячный анатоксин). В другом воплощении белок-носитель из конъюгатов по изобретению представляет собой PD (белок D *Haemophilus influenzae*, см., например, EP 0 594 610 B). В некоторых таких воплощениях белок-носитель включает в себя поли(L-лизин) (PLL).

В предпочтительном воплощении сахараиды конъюгированы с белком CRM₁₉₇. Белок CRM₁₉₇ представляет собой нетоксичную форму дифтерийного токсина, но он иммунологически неразличим с дифтерийным токсином. CRM₁₉₇ продуцируют *C. diphtheriae*, инфицированные не образующим токсин фагом β197tox⁺, созданным из токсинообразующего коринебактериофага бета путем мутагенеза с применением нитрозогуанидина. Белок CRM₁₉₇ имеет такую же молекулярную массу, как

дифтерийный токсин, но отличается от него заменой одного основания (гуанина на аденин) в структурном гене. Замена одного основания вызывает аминокислотную замену (глутаминовой кислоты на глицин) в зрелом белке и лишает дифтерийный токсин токсических свойств. Белок CRM₁₉₇ является безопасным и эффективным Т-клеточно-зависимым носителем для сахаридов.

Соответственно, в некоторых воплощениях конъюгаты по изобретению включают в себя CRM₁₉₇ в качестве белка-носителя, где сахарид ковалентно связан с CRM₁₉₇.

В предпочтительном воплощении белок-носитель гликоконъюгатов выбран из группы, состоящей из DT (дифтерийного анатоксина), TT (столбнячного анатоксина) или фрагмента С из TT, CRM₁₉₇ (нетоксичного, но идентичного по антигенным характеристикам варианта дифтерийного токсина), других мутантов DT (таких как CRM₁₇₆, CRM₂₂₈, CRM 45 (Uchida et al J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973), CRM₉, CRM₄₅, CRM₁₀₂, CRM₁₀₃ или CRM₁₀₇; и других мутаций, описанных Nicholls and Youle в *Genetically Engineered Toxins*, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; делеции или мутации Glu-148 на Asp, Gln или Ser и/или Ala 158 на Gly и других мутаций, раскрытых в US 4709017 или US 4950740; мутации по меньшей мере одного или более остатков Lys 516, Lys 526, Phe 530 и/или Lys 534 и других мутаций, раскрытых в US 5917017 или US 6455673; или фрагмента, раскрытого в US 5843711), пневмолизина пневмококка (Kuo et al (1995) *Infect Immun* 63; 2706-13) включая некоторым образом обезвреженный пневмолизин, например, dPLY-GMBS (WO 04081515, PCT/EP2005/010258) или dPLY-formol, PhtX, включая PhtA, PhtB, PhtD, PhtE (последовательности PhtA, PhtB, PhtD или PhtE раскрыты в WO 00/37105 или WO 00/39299) и слитые белки Pht, например, слитые белки PhtDE, слитые белки PhtBE, Pht A-E (WO 01/98334, WO 03/54007, WO2009/000826), ОМРС (белок внешней мембраны менингококка обычно выделенный из *N. meningitidis* серогруппы В - EP0372501), PorB (из *N. meningitidis*), PD (белка D *Haemophilus influenzae* - см., например, EP 0 594 610 В) или их иммунологически функциональных эквивалентов, синтетических пептидов (EP0378881, EP0427347), белков теплового шока (WO 93/17712, WO 94/03208), белков вируса коклюша (WO 98/58668, EP0471 177), цитокинов, лимфокинов, факторов роста или гормонов (WO 91/01146), искусственных белков, содержащих множество различных имеющих происхождение из патогенов антигенных эпитопов для CD4⁺ Т-клеток человека (Falugi et al (2001) *Eur J Immunol* 31 ; 3816-3824), таких как белок N19 (Baraldoi et al (2004) *Infect*

Immun 72; 4884-7), белок PspA поверхности пневмококка (WO 02/091998), белки, захватывающие железо (WO 01/72337), токсин А или В из *C. Difficile* (WO 00/61761), трансферрин-связывающие белки, белок адгезии пневмококка (PsaA), рекомбинантный экзотоксин А из *Pseudomonas aeruginosa* (в частности, его нетоксичные мутанты (такие как экзотоксин А, несущий замену глутаминовой кислоты 553 (Uchida Cameron DM, RJ Collier. 1987. J. Bacteriol. 169:4967-4971)). В качестве белков-носителей также могут применяться другие белки, такие как яичный альбумин, гемоцианин фиссуреллы (KLH), бычий сывороточный альбумин (BSA) или очищенное белковое производное туберкулина (PPD). Другие подходящие белки-носители включают инактивированные бактериальные токсины, такие как холерный анатоксин (например, описанный в международной заявке на патент WO 2004/083251), *E. coli* LT, *E. coli* ST и экзотоксин А из *Pseudomonas aeruginosa*.

В некоторых воплощениях белок-носитель выбран из любого из, например, CRM₁₉₇, фрагмента В дифтерийного токсина (DTFB), DTFB C8, дифтерийного анатоксина (DT), столбнячного анатоксина (TT), фрагмента С из TT, коклюшного анатоксина, холерного анатоксина или экзотоксина А из *Pseudomonas aeruginosa*; обезвреженного экзотоксина А из *P. aeruginosa* (EPA), мальтозо-связывающего белка (MBP), флагеллина, обезвреженного гемолизина А из *S. aureus*, агглютинирующего фактора А, агглютинирующего фактора В, субъединицы В холерного токсина (СТВ), пневмолизина *Streptococcus pneumoniae* и его обезвреженных вариантов, *C. jejuni* AсгА и естественных гликопротеинов *C. jejuni*. В одном воплощении белок-носитель представляет собой обезвреженный экзотоксин *Pseudomonas* (EPA). В другом воплощении белок-носитель не является обезвреженным экзотоксином *Pseudomonas* (EPA). В одном воплощении белок-носитель представляет собой флагеллин. В другом воплощении белок-носитель не представляет собой флагеллин.

В предпочтительном воплощении белок-носитель гликоконъюгатов независимо выбран из группы, состоящей из: TT, DT, мутантов DT (таких как CRM₁₉₇), белка D из *H. influenzae*, PhtX, PhtD, слитых белков PhtDE (в частности, описанных в WO 01/98334 и WO 03/54007), обезвреженного пневмолизина, PоrВ, белка N19, PspA, ОМРС, токсина А или В из *C. Difficile* и PsaA. В воплощении белок-носитель гликоконъюгатов по изобретению представляет собой DT (дифтерийный анатоксин). В другом воплощении белок-носитель гликоконъюгатов по изобретению представляет собой TT (столбнячный анатоксин). В другом воплощении белок-носитель гликоконъюгатов по изобретению

представляет собой PD (белок D *Haemophilus influenzae*, см., например, EP 0 594 610 B).

В предпочтительном воплощении капсульные сахараиды конъюгированы с белком CRM₁₉₇. Белок CRM₁₉₇ представляет собой нетоксичную форму дифтерийного токсина, но он иммунологически неразличим с дифтерийным токсином. CRM₁₉₇ продуцируют *C. diphtheriae*, инфицированные не образующим токсин фагом β 197tox-, созданным из токсинообразующего коринебактериофага бета путем мутагенеза с применением нитрозогуанидина (Uchida, T. et al. 1971, Nature New Biology 233:8-11). Белок CRM₁₉₇ имеет такую же молекулярную массу, как дифтерийный токсин, но отличается от него заменой одного основания (гуанина на аденин) в структурном гене. Замена одного основания вызывает аминокислотную замену (глутаминовой кислоты на глицин) в зрелом белке и лишает дифтерийный токсин токсических свойств. Белок CRM₁₉₇ является безопасным и эффективным Т-клеточно-зависимым носителем для сахараидов. Дальнейшие подробности о CRM₁₉₇ и его получении можно найти, например, в US 5614382.

Соответственно, в распространенных воплощениях гликоконъюгаты по изобретению содержат CRM₁₉₇ в качестве белка-носителя, где капсульный сахараид ковалентно связан с CRM₁₉₇.

Н. Дозировки композиций

Схемы дозирования можно корректировать для обеспечения оптимального желаемого ответа. Например, можно вводить одну дозу полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента, можно вводить несколько отдельных доз в течение времени, или дозу можно пропорционально уменьшать или увеличивать в зависимости от остроты ситуации. Следует отметить, что значения дозировки могут варьировать в зависимости от типа и тяжести состояния, требующего облегчения, и могут включать одну или множество доз. Также следует понимать, что для любого конкретного субъекта определенные схемы дозирования следует корректировать с течением времени в зависимости от индивидуальных потребностей и профессионального суждения лица, осуществляющего введение или контролирующего введение композиций, и что диапазоны дозировок, приведенные в данном документе, служат лишь примерами и не предназначены для ограничения объема или практического применения заявленной композиции. Определение надлежащих дозировок и схем введения терапевтического белка хорошо известно в соответствующей области техники, и специалисту, ознакомившемуся с данным изобретением, будет понятно, что они входят

в объем изобретения.

В некоторых воплощениях количество полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента в композиции, может варьировать от приблизительно 10 мкг до приблизительно 300 мкг каждого белкового антигена. В некоторых воплощениях количество полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента в композиции, может варьировать от приблизительно 20 мкг до приблизительно 200 мкг каждого белкового антигена.

Количество гликоконъюгата(ов) в каждой дозе выбирают как количество, индуцирующее иммунозащитный ответ без существенных побочных эффектов у типовых вакцин. Такое количество будет варьировать в зависимости от того, какой именно иммуноген использовали и как он презентирован.

Количество конкретного конъюгата в иммуногенной композиции можно рассчитать по общему количеству полисахарида (конъюгированного и неконъюгированного) для указанного конъюгата. Например, гликоконъюгат с 20% свободного полисахарида будет иметь приблизительно 80 г конъюгированного полисахарида и приблизительно 20 г неконъюгированного полисахарида в 100 г дозе полисахарида. Количество конъюгата может варьировать в зависимости от серотипа *E. coli*. Концентрацию сахара можно определить методом с урановой кислотой.

«Иммуногенное количество» различных компонентов полисахарида в иммуногенной композиции может расходиться, и каждое может содержать приблизительно 1,0 г, приблизительно 2,0 г, приблизительно 3,0 г, приблизительно 4,0 г, приблизительно 5,0 г, приблизительно 6,0 г, приблизительно 7,0 г, приблизительно 8,0 г, приблизительно 9,0 г, приблизительно 10,0 г, приблизительно 15,0 г, приблизительно 20,0 г, приблизительно 30,0 г, приблизительно 40,0 пг, приблизительно 50,0 пг, приблизительно 60,0 пг, приблизительно 70,0 пг, приблизительно 80,0 пг, приблизительно 90,0 пг или приблизительно 100,0 г каждого конкретного полисахаридного антигена. В целом, каждая доза будет содержать от 0,1 г до 100 г полисахарида заданного серотипа, в частности от 0,5 г до 20 г, более конкретно от 1 г до 10 г и еще более конкретно от 2 г до 5 г. Любое целое значение, входящее в указанные выше диапазоны, также считают воплощением изобретения. В одном воплощении каждая доза будет содержать 1 г, 2 г, 3 г, 4 г, 5 г, 6 г, 7 г, 8 г, 9 г, 10 г, 15 г или 20 г полисахарида заданного серотипа.

Количество белка-носителя. Как правило, каждая доза будет содержать от 5 г до

150 г белка-носителя, в частности от 10 г до 100 г белка-носителя, более конкретно, от 15 г до 100 г белка-носителя, более конкретно от 25 до 75 г белка-носителя, более конкретно от 30 до 70 г белка-носителя, более конкретно от 30 до 60 г белка-носителя, более конкретно от 30 г до 50 г белка-носителя и еще более конкретно от 40 до 60 г белка-носителя. В одном воплощении указанный белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇. В одном воплощении каждая доза будет содержать приблизительно 25 г, приблизительно 26 г, приблизительно 27 г, приблизительно 28 г, приблизительно 29 г, приблизительно 30 г, приблизительно 31 г, приблизительно 32 г, приблизительно 33 г, приблизительно 34 г, приблизительно 35 г, приблизительно 36 г, приблизительно 37 г, приблизительно 38 г, приблизительно 39 г, приблизительно 40 г, приблизительно 41 г, приблизительно 42 г, приблизительно 43 г, приблизительно 44 г, приблизительно 45 г, приблизительно 46 г, приблизительно 47 г, приблизительно 48 г, приблизительно 49 г, приблизительно 50 г, приблизительно 51 г, приблизительно 52 г, приблизительно 53 г, приблизительно 54 г, приблизительно 55 г, приблизительно 56 г, приблизительно 57 г, приблизительно 58 г, приблизительно 59 г, приблизительно 60 г, приблизительно 61 г, приблизительно 62 г, приблизительно 63 г, приблизительно 64 г, приблизительно 65 г, приблизительно 66 г, приблизительно 67 г, 68 г, приблизительно 69 г, приблизительно 70 г, приблизительно 71 г, приблизительно 72 г, приблизительно 73 г, приблизительно 74 г или приблизительно 75 г белка-носителя. В одном воплощении указанный белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇.

I. Адьювант

В некоторых воплощениях иммуногенные композиции, раскрытые в данном документе, могут дополнительно содержать по меньшей мере один, два или три адьюванта. Термин «адьювант» относится к соединению или смеси, которая усиливает иммунный ответ на антиген. Антигены могут действовать преимущественно как система доставки, преимущественно как иммунный модулятор или обладать выраженными характеристиками того и другого. Подходящие адьюванты включают такие, которые подходят для применения у млекопитающих, включая людей.

Примеры известных подходящих адьювантов типа системы доставки, которые можно применять у человека, включают квасцы (например, фосфат алюминия, сульфат алюминия или гидроксид алюминия), фосфат кальция, липосомы, эмульсии масло-в-воде, такие как MF59 (4,3% мас./об. сквален, 0,5% мас./об. полисорбат 80 (Твин 80), 0,5% мас./об. сорбитана триолеат (Span 85)), эмульсии вода-в-масле, такие как Montanide, и

микрочастицы или наночастицы поли(D,L-лактид-ко-гликолида) (PLG), но не ограничиваются перечисленными.

В одном воплощении иммуногенные композиции, раскрытые в данном документе, содержат соли алюминия (квасцы) в качестве адъюванта (например, фосфат алюминия, сульфат алюминия или гидроксид алюминия). В предпочтительном воплощении иммуногенные композиции, изложенные в данном документе, содержат в качестве адъюванта фосфат алюминия или гидроксид алюминия. В одном воплощении иммуногенные композиции, изложенные в данном документе, содержат от 0,1 мг/мл до 1 мг/мл или от 0,2 мг/мл до 0,3 мг/мл элемента алюминия в форме фосфата алюминия. В одном воплощении иммуногенные композиции, изложенные в данном документе, содержат приблизительно 0,25 мг/мл элемента алюминия в форме фосфата алюминия. Примеры известных подходящих адъювантов иммуномодулирующего типа, которые можно применять у человека, включают экстракты сапонины из коры мыльного дерева (QS21, Quil A), агонисты TLR4, такие как MPL (монофосфориллипид A), 3DMPL (3-О-деацетилованный MPL) или GLA-AQ, мутанты LT/CT, цитокины, такие как различные интерлейкины (например, IL-2, IL-12) или GM-CSF, AS01 и тому подобные, но не ограничиваются перечисленными.

Примеры известных подходящих адъювантов иммуномодулирующего типа, обладающих характеристиками как системы доставки, так и иммуномодулятора, которые могут применяться у человека, включают без ограничения ISCOMS (см., например, Sjölander et al. (1998) *J. Leukocyte Biol.* 64:713; WO 90/03184, WO 96/11711, WO 00/48630, WO 98/36772, WO 00/41720, WO 2006/134423 и WO 2007/026190) или GLA-EM, представляющий собой комбинацию агониста TLR4 и эмульсию масло-в-воде.

Для ветеринарных применений, включая эксперименты на животных, но не ограничиваясь ими, можно использовать полный адъювант Фрейнда (CFA), неполный адъювант Фрейнда (IFA), эмульсиген, N-ацетил-мурамил-L-треонил-D-изоглутамин (thr-MDP), N-ацетил-нор-мурамил-L-аланил-D-изоглутамин (CGP 11637, обозначаемый как нор-MDP), N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутаминил-L-аланин-2-(1'-2'-дипальмитоил-sn-глицеро-3-гидроксифосфорилокси)-этиламин (CGP 19835A, обозначаемый как MTP-PE) и RIBI, содержащий три компонента, экстрагированные из бактерий, монофосфорил липид A, димиколят трегалозы и цитоскелет (MPL+TDM+CWS) в 2% эмульсии сквален/Твин 80.

Другие примеры адъювантов для усиления эффективности иммуногенных

композиций, раскрытых в данном документе, включают, без ограничения, (1) эмульсионные составы масло-в-воде (с или без других специфических иммуностимулирующих агентов, таких как мурамилпептиды (см. ниже) или компонентов бактериальной клеточной стенки), например, такие как (а) SAF, содержащий 10% сквалан, 0,4% Твин 80, 5% блок-сополимер плуроник L121, и thr-MDP либо микрофюидизированный в субмикронную эмульсию или перемешанный на вортексе с получением эмульсии с частицами более крупного размера и (б) система адьювантов RIBI™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, Mont.), содержащая 2% сквалан, 0,2% Твин 80 и один или более компонентов бактериальной клеточной стенки, такой как монофосфорил липид А (MPL), димиколят трегалозы (TDM) и цитоскелет (CWS), предпочтительно MPL+CWS (DETOX™); (2) могут применяться сапониновые адьюванты, такие как QS21, STIMULON™ (Cambridge Bioscience, Worcester, Mass.), ABISCO® (Isconova, Sweden) или ISCOMATRIX® (Commonwealth Serum Laboratories, Australia), или частицы, образованные из них, такие как ISCOMs (иммуностимулирующие комплексы), указанные ISCOMs могут быть свободны от дополнительных детергентов (например, WO 00/07621); (3) полный адьювант Фрейнда (CFA) и неполный адьювант Фрейнда (IFA); (4) цитокины, такие как интерлейкины (например, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (например, WO 99/44636)), интерфероны (например, интерферон гамма), макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), фактор некроза опухоли (TNF) и так далее; (5) монофосфорил липид А (MPL) или 3-О-деацелированный MPL (3dMPL) (см., например, GB2220211, EP0689454) (см., например, WO 00/56358); (6) комбинации 3dMPL с, например, QS21 и/или эмульсиями масло-в-воде (см., например, EP0835318, EP0735898, EP0761231); (7) полиоксиэтиленовый простой эфир или полиоксиэтиленовый сложный эфир (см., например, WO 99/52549); (8) поверхностно-активное вещество сложный эфир полиоксиэтилена и сорбитана в комбинации с октоксинолом (например, WO 01/21207) или поверхностно-активное вещество алкиловый простой или сложный эфир полиоксиэтилена в комбинации с одним дополнительным неионным поверхностно-активным веществом, таким как октоксинол (например, WO 01/21152); (9) сапонин и иммуностимулирующий олигонуклеотид (например, CpG олигонуклеотид) (например, WO 00/62800); (10) иммуностимулятор и частицу соли металла (см., например, WO 00/23105); (11) сапонин и эмульсию масло-в-воде (например, WO 99/11241); (12) сапонин (например, QS21)+3dMPL+IM2 (возможно+стерол) (например, WO 98/57659); (13)

другие вещества, действующие как иммуностимулирующие агенты для усиления эффективности композиции. Мурамилпептиды включают N-ацетил-мурамил-L-треонил-D-изоглутамин (thr-MDP), N-25 ацетил-нормурамил-L-аланил-D-изоглутамин (нор-MDP), N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутарнинил-L-аланин-2-(1'-2'-дипальмитоил-sn-глицеро-3-гидроксифосфорилокси)-этиламин МТР-РЕ) и так далее.

В воплощении данного изобретения иммуногенные композиции, описанные в данном документе, содержат в качестве адъюванта CpG олигонуклеотид. В данном документе CpG олигонуклеотид относится к иммуностимулирующему CpG олигодезоксинуклеотиду (CpG ODN) и, соответственно, эти термины используются взаимозаменяемо, если не указано иное. Иммуностимулирующие CpG олигонуклеотиды содержат один или более иммуностимулирующих мотивов CpG, которые представляют собой неметирированные динуклеотиды цитозин-гуанин, возможно в окружении некоторых предпочтительных оснований. Статус метилирования иммуностимулирующего мотива CpG обычно относится к остаткам цитозина в динуклеотиде. Иммуностимулирующий олигонуклеотид, содержащий по меньшей мере один неметирированный динуклеотид CpG, представляет собой олигонуклеотид, содержащий 5'-неметирированный цитозин, связанный фосфатной связью с 3'-гуанином, который активирует иммунную систему через связывание с Toll-подобным рецептором 9 (TLR-9). В другом воплощении иммуностимулирующий олигонуклеотид может содержать один или более метилированных динуклеотидов CpG, которые будут активировать иммунную систему через TLR9, но не так сильно, как если бы мотив(ы) CpG был(и) бы неметирированными. Иммуностимулирующие олигонуклеотиды CpG могут содержать один или более палиндромов, которые в свою очередь могут охватывать динуклеотид CpG. Олигонуклеотиды CpG описаны в ряде выданных патентов, опубликованных заявок на патент и других публикациях, включая патенты US 6194388; 6207646; 6214806; 6218371; 6239116 и 6339068.

В воплощении данного изобретения иммуногенные композиции, раскрытые в данном документе, содержат любой из CpG олигонуклеотидов, описанных на с. 3 строка 22 - с. 12 строка 36 WO 2010/125480.

Обнаружены различные классы иммуностимулирующих олигонуклеотидов CpG. Их обозначают классами А, В, С и Р, и они описаны более подробно на с. 3, строка 22 - с. 12, строка 36 WO 2010/125480. Способы по изобретению охватывают применение этих различных классов иммуностимулирующих олигонуклеотидов CpG.

VII. Наночастицы

В другом аспекте в данном документе раскрыт иммуногенный комплекс, включающий 1) наноструктуру и 2) по меньшей мере один полипептидный антиген фимбрий или его фрагмент. Предпочтительно, полипептид фимбрий или его фрагмент имеет происхождение из Н фимбрий (FimH) *E. coli*. В предпочтительном воплощении полипептид фимбрий выбран из любого из полипептидов фимбрий, описанных выше. Например, полипептид фимбрий может содержать любую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10, 18, 20, 21, 23, 24 и 26-29.

В некоторых воплощениях антиген слит или конъюгирован с внешней наноструктурой для стимуляции развития адаптивных иммунных ответов на экспонированные эпитопы. В некоторых воплощениях иммуногенный комплекс дополнительно включает адъювант или другие иммуномодулирующие соединения, присоединенные снаружи и/или инкапсулированные внутри контейнера, чтобы способствовать адаптации иммунного ответа, развившегося на каждый патоген.

В некоторых воплощениях наноструктура включает единую сборку, включающую множество идентичных полипептидов, связанных с первой наноструктурой.

В альтернативных воплощениях наноструктура включает множество сборок, включающих множество идентичных полипептидов, связанных с первой наноструктурой, и множество вторых сборок, каждая вторая сборка содержит множество идентичных полипептидов, связанных со второй наноструктурой.

В создании иммуногенных композиций, описанных в данном документе, можно применять различные наноструктурные платформы. В некоторых воплощениях используемые наноструктуры образованы множеством копий одной субъединицы. В некоторых воплощениях используемые наноструктуры образованы множеством копий множества различных субъединиц.

Обычно наноструктуры имеют форму шара и/или обладают вращательной симметрией (например, с 3 или 5 осями симметрии), например имеют структуру икосаэдра, приведенную в качестве примера.

В некоторых воплощениях антиген презентирован на самособираемых наночастицах, таких как самособираемые наноструктуры, являющиеся производными ферритина (FR), E2p, Q β и I3-01. E2p представляет собой переработанный вариант дигидролипоилацилтрансферазы из *Bacillus stearothermophilus*. I3-01 представляет собой

сконструированный белок, который способен к самосборке в гиперстабильные наночастицы. Последовательности субъединиц указанных белков известны в области техники. В пятом аспекте данного документа раскрыт полипептид, связанный с наноструктурой, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична на всем своем протяжении по меньшей мере в одном установленном положении границы раздела аминокислотной последовательности полипептида, связанного с наноструктурой, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 59-92. Связанные с наноструктурой полипептиды могут применяться, например, для получения наноструктур. Связанные с наноструктурой полипептиды разрабатывали, чтобы они были способны к самосборке парами с образованием наноструктур, таких как икосаэдрические наноструктуры.

В некоторых воплощениях наноструктура включает (а) множество первых сборок, каждая первая сборка содержит множество идентичных первых полипептидов, связанных с наноструктурой, где первые полипептиды, связанные с наноструктурой, содержат аминокислотную последовательность полипептида, связанного с наноструктурой, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 59-92; и (б) множество вторых сборок, каждая вторая сборка содержит множество идентичных вторых полипептидов, связанных с наноструктурой, где вторые полипептиды, связанные с наноструктурой, содержат аминокислотную последовательность полипептида, связанного с наноструктурой, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 59-92, и где второй полипептид, связанный с наноструктурой, отличается от первого полипептида, связанного с наноструктурой; где множество первых сборок нековалентно взаимодействует с множеством вторых сборок с образованием наноструктуры;

Наноструктура включает симметрично повторяющиеся неприродные нековалентные границы раздела полипептид-полипептид, которые ориентируют первую сборку и вторую сборку в наноструктуру, такую как обладающая икосаэдрической симметрией.

В SEQ ID NO: 59-92 представлены аминокислотные последовательности приведенных в качестве примера полипептидов, связанных с наноструктурой. Число остатков границы раздела для приведенных в качестве примера связанных с наноструктурой полипептидов SEQ ID NO:59-92 варьирует от 4 до 13 остатков. В различных воплощениях полипептиды, связанные с наноструктурой, содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80% 85%, 90%,

91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична на всем своем протяжении и идентична по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 установленных положениях границы раздела (в зависимости от числа остатков границы раздела для заданного полипептида, связанного с наноструктурой) аминокислотной последовательности полипептида, связанного с наноструктурой, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 59-92. В других воплощениях полипептиды, связанные с наноструктурой, содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична на всем своем протяжении и идентична по меньшей мере в 20%, 25%, 33%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% или 100% установленных положений границы раздела аминокислотной последовательности полипептида, связанного с наноструктурой, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 59-92. В следующих воплощениях связанные с наноструктурой полипептиды включают связанный с наноструктурой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность связанного с наноструктурой полипептида, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 59-98.

В одном воплощении, которое не является исчерпывающим, полипептиды, связанные с наноструктурой, могут быть модифицированы для облегчения ковалентного связывания с представляющим интерес «грузом». В одном примере, который не является исчерпывающим, связанные с наноструктурой полипептиды могут быть модифицированы, например посредством внедрения различных остатков цистеина в определенных положениях для облегчения связывания с одним или более антигенами, представляющими интерес, чтобы наноструктура полипептидов, связанных с наноструктурой, служила каркасом, обеспечивающим большое количество антигенов для доставки в качестве вакцины для выработки улучшенного иммунного ответа.

В некоторых воплощениях некоторые или все нативные остатки цистеина, присутствующие в полипептидах, связанных с наноструктурой, но не предназначенные для использования в конъюгировании, могут быть мутированы в другие аминокислоты для облегчения конъюгирования в заданных положениях. В другом воплощении, которое не является исчерпывающим, полипептиды, связанные с наноструктурой, могут быть модифицированы посредством связывания (ковалентного или нековалентного) с группировкой для облегчения «эндосомального высвобождения». Для применений, которые включают доставку молекул, представляющих интерес, в клетку-мишень, такую

как направленная доставка, ключевой стадией может быть высвобождение из эндосомы - мембрано-связанной органеллы, которая является точкой проникновения носителя, осуществляющего доставку, в клетку. Эндосомы созревают в лизосомы, осуществляющие деградацию своего содержимого. Таким образом, если осуществляющий доставку носитель каким-то образом не «высвободится» из эндосомы до того, как она станет лизосомой, он подвергнется деградации и не осуществит свою функцию. Существуют разнообразные липиды или органические полимеры, которые разрушают эндосому и обеспечивают высвобождение в цитозоль. Таким образом, в этом воплощении полипептиды, связанные с наноструктурой, могут быть модифицированы, например, путем внедрения остатков цистеина, которые обеспечат химическое конъюгирование такого липидного или органического полимера с мономером или образующейся поверхностью сборки. В другом примере, который не является исчерпывающим, полипептиды, связанные с наноструктурой, могут быть модифицированы, например, путем внедрения остатков цистеина, которые обеспечат химическое конъюгирование флуорофоров или других визуализирующих агентов, которые позволяют визуализировать наноструктуры *in vitro* или *in vivo*.

Поверхностные аминокислотные остатки полипептидов, связанных с наноструктурой, могут быть мутированы для улучшения стабильности или растворимости субъединиц белка или собранных наноструктур. Как известно специалисту в области техники, если связанный с наноструктурой полипептид обладает существенной гомологией с существующим семейством белков, множественное выравнивание последовательностей других белков этого семейства можно использовать как ориентир для отбора аминокислотных мутаций в неконсервативных положениях, способных повысить стабильность и/или растворимость белка, данный процесс называют консенсусным дизайном белка (9).

Поверхностные аминокислотные остатки полипептидов, связанных с наноструктурой, могут быть мутированы в положительно заряженные (Arg, Lys) или отрицательно заряженные (Asp, Glu) аминокислоты для придания поверхности белка суммарного положительного или суммарного отрицательного заряда. В одном воплощении, которое не является исчерпывающим, поверхностные аминокислотные остатки полипептидов, связанных с наноструктурой, могут быть мутированы для придания внутренней поверхности самособирающейся наноструктуры высокого результирующего заряда. Такая наноструктура может быть затем использована для

упаковки или инкапсулирования молекулы-груза с противоположным зарядом благодаря электростатическому взаимодействию между внутренней поверхностью наноструктуры и молекулой-грузом. В одном воплощении, которое не является исчерпывающим, поверхностные аминокислотные остатки полипептидов, связанных с наноструктурой, могут быть мутированы преимущественно в остатки аргинина или лизина для придания внутренней поверхности самособирающейся наноструктуры высокого положительного заряда. Растворы, содержащие полипептиды, связанные с наноструктурой, можно затем смешивать в присутствии нуклеиновокислотных молекул-грузов, таких как dsDNA, ssDNA, dsRNA, ssRNA, cDNA, miRNA, siRNA, shRNA, piRNA, или других нуклеиновых кислот для инкапсулирования нуклеиновой кислоты внутри самособирающейся наноструктуры. Такую наноструктуру можно использовать, например, для защиты, доставки или концентрирования нуклеиновых кислот.

В одном воплощении наноструктура обладает икосаэдрической симметрией. В указанном воплощении наноструктура может содержать 60 копий первого полипептида, связанного с наноструктурой, и 60 копий второго полипептида, связанного с наноструктурой. В одном таком воплощении число идентичных первых полипептидов, связанных с наноструктурой, в каждой первой сборке отличается от числа идентичных вторых полипептидов, связанных с наноструктурой, в каждой второй сборке. Например, в одном воплощении наноструктура содержит двенадцать первых сборок и двадцать вторых сборок; в этом воплощении каждая первая сборка может, например, содержать пять копий идентичного первого полипептида, связанного с наноструктурой, а каждая вторая сборка может, например, содержать три копии идентичного второго полипептида, связанного с наноструктурой. В другом воплощении наноструктура содержит двенадцать первых сборок и тридцать вторых сборок; в этом воплощении каждая первая сборка может, например, содержать пять копий идентичного первого полипептида, связанного с наноструктурой, а каждая вторая сборка может, например, содержать две копии идентичного второго полипептида, связанного с наноструктурой. В следующем воплощении наноструктура содержит двадцать первых сборок и тридцать вторых сборок; в этом воплощении каждая первая сборка может, например, содержать три копии идентичного первого полипептида, связанного с наноструктурой, а каждая вторая сборка может, например, содержать две копии идентичного второго полипептида, связанного с наноструктурой. Все указанные воплощения способны образовывать синтетические наноматериалы с регулярной икосаэдрической симметрией.

ПРИМЕРЫ

Ниже приведены следующие примеры, помогающие лучше понять данное изобретение. Эти примеры приведены лишь в целях иллюстрации и их не следует считать каким-либо образом ограничивающими объем изобретения. Некоторые воплощения изобретения проиллюстрированы следующими примерами.

ПРИМЕР 1. Сводная информация о конструкциях

Таблица 3.

Конструкция	Плазмида	Сигнальная последовательность	Описание белка	Линкер	Дополнительный вариант белка	Остов	Масса
Лектиновый домен FimH	pSB01877	Сигнальная последовательность FimH	FimH J96 F22..G181	Нет	Нет	pcDNA3.1(+) или pCAG вектор	
Лектиновый домен FimH	pSB01878	Сигнальная последовательность mIgK	FimH J96 F22..G181	Нет	Нет	pcDNA3.1(+) или pCAG вектор	Масса полностью восстановленной формы с His-меткой: 18117,48 Наблюдавшаяся масса невосстановленной формы с His-меткой: 18117,90 Масса без метки: 17022,08
FimH/C	pSB01879	Сигнальная последовательность	FimH J96 F22..Q300	Нет	Нет	pBudCE4.1	

		тельность FimH				вектор с двумя промоторами (CMV & EF1 α)	
FimH/C	pSB01880	Сигнальная последова- тельность mIgK	FimH J96 F22..Q300	Нет	Нет	pBudCE4.1 вектор с двумя промоторами (CMV & EF1 α)	
FimH/C	pSB01881	Сигнальная последова- тельность mIgK	FimC G37..E241 (в соответствии с SEQ ID NO: 18)	Нет	Нет	pBudCE4.1 вектор с двумя промоторами (CMV & EF1 α)	
FimH- dscG	pSB01882	Сигнальная последова- тельность FimH	FimH J96 F22..Q300	DNKQ	FimG A1..K14 (SEQ ID NO: 17)		
FimH- dscG	pSB01883	Сигнальная последова- тельность FimH	FimH J96 F22..Q300	GGSSG	FimG A1..K14 (SEQ ID NO: 17)		
FimH- dscG	pSB01884	Сигнальная последова- тельность FimH	FimH J96 F22..Q300	GGSSG G	FimG A1..K14 (SEQ ID NO: 17)		
FimH- dscG	pSB01885	Сигнальная последова- тельность FimH	FimH J96 F22..Q300	GGSSG GG	FimG A1..K14 (SEQ ID NO: 17)	N-концевой остаток в W20, и следовательно не подвергается процессингу в предпочтитель- ном положении;	

						предпочтительный процессинг демонстрирует небольшое количество присутствующего белка, на что указывает небольшое количество детектируемого пептида FACK	
FimH-dscG	pSB01886	Сигнальная последовательность FimH	FimH J96 F22..Q300	GGGSS GGG	FimG A1..K14 (SEQ ID NO: 17)		
FimH-dscG	pSB01887	Сигнальная последовательность FimH	FimH J96 F22..Q300	GGGSG SGGG	FimG A1..K14 (SEQ ID NO: 17)		
FimH-dscG	pSB01888	Сигнальная последовательность FimH	FimH J96 F22..Q300	GGGSG GSGGG	FimG A1..K14 (SEQ ID NO: 17)		
FimH-dscG	pSB01889	Сигнальная последовательность mIgK	FimH J96 F22..Q300	DNKQ	FimG A1..K14 (SEQ ID NO: 17)		
FimH-dscG	pSB01890	Сигнальная последовательность mIgK	FimH J96 F22..Q300	GGSGG	FimG A1..K14 (SEQ ID NO: 17)		

FimH-dscG	pSB01891	Сигнальная последовательность mIgK	FimH J96 F22..Q300	GGSSG G	FimG A1..K14 (SEQ ID NO: 17)		
FimH-dscG	pSB01892	Сигнальная последовательность mIgK	FimH J96 F22..Q300	GGSSG GG	FimG A1..K14 (SEQ ID NO: 17)	очевидно, имеет сигнальный пептид, подвергающийся процессингу с предпочтительным N-концевым остатком F22; пептид идентифицировали при помощи MS/MS	
FimH-dscG	pSB01893	Сигнальная последовательность mIgK	FimH J96 F22..Q300	GGGSS GGG	FimG A1..K14 (SEQ ID NO: 17)		
FimH-dscG	pSB01894	Сигнальная последовательность mIgK	FimH J96 F22..Q300	GGGSG SGGG	FimG A1..K14 (SEQ ID NO: 17)		
FimH-dscG	pSB01895	Сигнальная последовательность mIgK	FimH J96 F22..Q300	GGGSG GSGGG	FimG A1..K14 (SEQ ID NO: 17)		

FimH lectin domain	pSB02081	Сигнальная последовательность mIgK	F22..G181 J96 FimH N28Q N91S / His8 в pcDNA3.1(+)				
FimH lectin domain	pSB02082	Сигнальная последовательность mIgK	F22..G181 J96 FimH N28Q N91S / His8 в pcDNA3.1(+)				
FimH lectin domain	pSB02083	Сигнальная последовательность mIgK	F22..G181 J96 FimH N28S N91S / His8 в pcDNA3.1(+)				
FimH lectin domain	pSB02088	Сигнальная последовательность mIgK	F22..G181 J96 FimH V48C L55C / His8 в pcDNA3.1(+)				
FimH lectin domain	pSB02089	Сигнальная последовательность mIgK	F22..G181 J96 FimH N28Q V48C L55C N91S / His8 в pcDNA3.1(+)				
FimH lectin domain	pSB02158	Сигнальная последовательность mIgK	F22..G181 J96 FimH N28S V48C L55C N91S / His8 в pcDNA3.1(+)				
FimH-dscG	pSB02159						
FimH-dscG	pSB02198	Сигнальная последовательность mIgK	FimH mIgK сигнал пептид / F22..Q300 J96 FimH N28S V48C L55C N91S N249Q / 7 AA линкер / FimG A1..K14				

			/ GGHis8 в pcDNA3.1(+)				
FimH- dscG	pSB02199	Сигнальная последова- тельность mIgK	FimH mIgK сигнал пептид / F22..Q300 J96 FimH N28S V48C L55C N91S N256Q / 7 AA линкер / FimG A1..K14 / GGHis8 в pcDNA3.1(+)				
FimH- dscG	pSB02200	Сигнальная последова- тельность mIgK	FimH mIgK сигнал пептид / F22..Q300 J96 FimH N28S V48C L55C N91S N249Q N256Q / 7 AA линкер / FimG A1..K14 / GGHis8 в pcDNA3.1(+)				
FimH- dscG	pSB02304	Сигнальная последова- тельность mIgK	FimH mIgK сигнал пептид / F22..Q300 J96 FimH N28S V48C L55C N91S T251A / 7 AA линкер / FimG A1..K14 / GGHis8 в pcDNA3.1(+)				
FimH- dscG	pSB02305	Сигнальная последова-	FimH mIgK сигнал пептид /				

		тельность mIgK	F22..Q300 J96 FimH N28S V48C L55C N91S T258A / 7 AA линкер / FimG A1..K14 / GGHis8 в pcDNA3.1(+)				
FimH- dscG	pSB02306	Сигнальная последова- тельность mIgK	FimH mIgK сигнал пептид / F22..Q300 J96 FimH N28S V48C L55C N91S T251A T258A / 7 AA линкер / FimG A1..K14 / GGHis8 в pcDNA3.1(+)				
FimH- dscG	pSB02307	Сигнальная последова- тельность mIgK	FimH mIgK сигнал пептид / F22..Q300 J96 FimH N28S N91S N249Q / 7 AA линкер / FimG A1..K14 / GGHis8 в pcDNA3.1(+)				
FimH- dscG	pSB02308	Сигнальная последова- тельность mIgK	FimH mIgK сигнал пептид / F22..Q300 J96 FimH N28S N91S N256Q / 7 AA линкер / FimG A1..K14				

			/ GGHis8 в pcDNA3.1(+)				
--	--	--	---------------------------	--	--	--	--

Все изученные конструкции FimH представляли собой мономерные белки ожидаемой молекулярной массы.

Таблица 4.

Белок	Коэффициент седиментации, S	$M_{w, \text{каж.}}$	M_w , ожд.	Гомогенность
Экспрессия в <i>E.coli</i>				
Цитозольный <i>FimH-LD</i>	1,9 S	18 кДа	18 кДа	98%
Периплазматический <i>FimH-LD</i>	1,9 S	18 кДа	18 кДа	98%
<i>FimH-LD</i> закрепленный мутант	2,0 S	19 кДа	18 кДа	97%
Экспрессия у млекопитающих				
<i>FimH-LD</i>	1,9 S	18 кДа	18 кДа	более 99%
<i>FimH-LD</i> закрепленный мутант	1,9 S	18 кДа	18 кДа	98%
<i>FimH</i> дикий тип	2,7 S	36 кДа	34 кДа	96%
<i>FimH</i> закрепленный мутант	2,7 S	34 кДа	34 кДа	94%

Ожидаемая молекулярная масса комплекса FimC-FimH составляет 53,1 кДа;

Ожидаемая молекулярная масса FimC составляет 24 кДа.

ПРИМЕР 2. Экспрессия лектин-связывающего домена FimH у млекопитающих

Данный пример, который не является исчерпывающим, относится к получению полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента, в клеточной линии НЕК. Выход был относительно высоким по сравнению с экспрессией полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента, в клетке-хозяине *E. coli*.

Для осуществления продукции вариантов FimH в клетках млекопитающих использовали алгоритм предсказания SignalP для анализа различных гетерологичных сигнальных последовательностей для секреции белков и фрагментов. Также анализировали лидерную последовательность FimH дикого типа. Согласно

предсказаниям, лидерная последовательность FimH дикого типа может обеспечивать секрецию вариантов FimH в клетках млекопитающих, однако согласно предсказаниям секретированный вариант должен был скорее расщепляться по остатку W20 полноразмерного FimH дикого типа (см. SEQ ID NO: 1), а не по остатку F22 полноразмерного FimH дикого типа (см. SEQ ID NO: 1). Согласно предсказаниям, сигнальная последовательность гемагглютинина не работала. Согласно предсказаниям, сигнальная последовательность IgK мыши приведет к получению F22 на N-конце последовательности SEQ ID NO: 1, или остатка F1 зрелого белка.

На основе данного анализа синтезировали ДНК и получали рекомбинантные конструкции для экспрессии лектинового связывающего домена FimH с лидерным пептидом FimH дикого типа. Также получали конструкции для экспрессии лектинового связывающего домена FimH с сигнальной последовательностью mIgK. Для облегчения очистки к С-концу полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента присоединяли метки для аффинной очистки, такие как His-метка.

Экспрессирующими плазмидами трансфицировали клетки-хозяева HEK, а именно клетки млекопитающих EXP1293.

Полипептиды или их фрагменты, имеющие происхождение из *E. coli*, успешно экспрессировали. Например, результаты MS для конструкции pSB01892 FimHdscG продемонстрировали, что использование сигнальной последовательности mIgK, слитой с началом зрелого FimH, обеспечивало процессинг N-конца по F22, являвшийся предпочтительным. Процессинг конструкции pSB01878 лектинового домена считался корректным, и данные масс-спектрометрии это подтверждали.

С лидерным пептидом нативного FimH предпочтительный процессинг N-конца (то есть процессинг по F22 последовательности SEQ ID NO: 1) продемонстрировать не удалось.

Конструкции pSB01877 и pSB01878 находятся в экспрессирующих векторах млекопитающих pcDNA3.1(+). Клетки разводили и в дальнейшем использовали для трансфекций объемом 20 мл. Использовали 1 мкг/мл ДНК для каждой конструкции и трансфицировали клетки в 125 мл флаконах с применением протокола с эпифектамином. Через 72 часа жизнеспособность клеток была по-прежнему хорошей, поэтому экспрессию продолжали в течение 96 часов. Для проверки экспрессии отбирали образцы через 72 часа и по 10 мкл каждого разделяли на геле SDS PAGE.

Через 96 часов собирали кондиционированную среду и добавляли 0,25 мл смолы

Nickel Excel, после чего всю партию оставляли связываться в течение ночи при 4°C при вращении. Элюировали TrisCl pH 8,0, NaCl, имидазолом. См. Фиг. 4.

pSB01878 имел ожидаемую массу, согласующуюся с N-концевым F22. Гликозилирование имело место по 1 или 2 сайтам (+1 к массе при каждом дезаминировании N-D).

Конструировали мутанты по гликозилированию. См., например, pSB02081, pSB02082, pSB02083, pSB02088 и pSB02089. Мутанты по гликозилированию экспрессировали полипептиды, представляющие интерес. См. Фиг. 5, где представлены результаты.

Также конструировали мутант с закрепленным лектиновым доменом FimH. См, например, pSB02158. Результаты экспрессии конструкции pSB02158 показаны на Фиг. 6B.

Исследование поляризации флуоресценции с использованием 0,5 пмолей конъюгированного с флуоресцеином аминоксенол-маннопиранозида (APMP). Анализ проводили при комнатной температуре, 300 об/мин в течение 64 часов. Результаты показаны на Фиг. 6C.

ПРИМЕР 3. Экспрессия комплекса FimH/C у млекопитающих, pSB01879 и pSB01880

Для получения комплекса FimH/C получали конструкции с двойной экспрессией FimC под промотором EF1альфа и FimH с сигнальным пептидом дикого типа или mIgK. Их клонировали в вектор для экспрессии в клетках млекопитающих pBudCE4.1 (ThermoFisher) и к C-концу FimC добавляли His-метку. Секрецию варианта FimC обеспечивал сигнальный пептид mIgK, поскольку согласно результатам анализа в SignalP, он приводил к получению зрелого белка FimC с G37 в качестве первого остатка.

Более конкретно, указанные конструкции разрабатывали таким образом, чтобы фрагмент FimC находился под контролем промотора EF1alpha в векторе pBudCE4.1, и фрагмент FimH под контролем промотора CMV был встроен в тот же вектор. Вектор pBudCE4.1 представляет собой экспрессирующий вектор от Thermo Fisher, имеющий 2 промотора для экспрессии в клетках млекопитающих. Фрагмент FimC (вставка pSB01881) субклонировали путем разрезания при помощи NotI и XhoI и субклонировали в вектор pBudCE4.1 в этих же сайтах. Осуществляли посев на чашки со средой 2xYT, содержащей зеоцин 50 мкг/мл. Колонии инокулировали в среду 2xYT с 50 мкг/мл

зеоцина, выращивали в течение ночи при 37°C и получали плазмиду. Их разрезали NotI и XhoI и подтверждали, что все колонии имели вставку размером ~722 пн.

pSB01881 разрезали HindIII и BamHI, и ДНК вставки pSB01879 и вставки pSB01880 разрезали HindIII и BamHI. Указанные фрагменты выделяли из геля и субклонировали в вектор pSB01881 и высаживали на чашки с 2xYT с 50 мкг/мл зеоцина. Колонии из каждой из них инокулировали в среду 2xYT с 50 мкг/мл зеоцина, выращивали в течение ночи при 37°C, выделяли плазмиды и расщепляли NotI и XhoI для верификации вставки FimC, а также HindIII и BamHI для верификации вставок FimH. Все клоны имели ожидаемый размер вставок в обоих сайтах клонирования. Клоны pSB01879-1 и pSB01880-1 в дальнейшем использовали для экспрессии.

Было показано, что комплекс FimH/FimC также экспрессируется в клетках EXP1293. Экспрессию можно оптимизировать путем переключения промоторов, таких как EF1 α , CAG, Ub, Tub или других промоторов.

С нативным лидерным пептидом FimH предпочтительный процессинг N-конца (то есть процессинг по F22 последовательности SEQ ID NO: 1) продемонстрировать не удалось.

Приводимые в качестве примера результаты анализа с применением SignalP 4.1 (DTU Bioinformatics), использованные для предсказаний сигнального пептида, показаны ниже. Согласно предсказаниям дополнительные сигнальные пептиды позволяют получить предпочтительный зрелый полипептид FimH или его фрагмент с N-концевым Phe в положении 1. Представленный ниже набор из 4 общих сигнальных последовательностей служит лишь в качестве репрезентативного примера.

Согласно предсказаниям следующие последовательности сигнальных пептидов позволяют получить предпочтительный зрелый полипептид FimH или его фрагмент с N-концевым Phe в положении 1:

Таблица 5.

	Последовательность сигнального пептида	SEQ ID NO:
>sp P55899 FCGRN_HUMAN большая субъединица p51 рецептора IgG FcRn OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FCGRT PE=1 SV=1	MGVPRQPWALGLLLFLLPGLG	SEQ ID NO: 55

>tr Q6FGW4 Q6FGW4_HUMAN белок IL10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IL10 PE=2 SV=1	MHSSALLCCLVLLTGVRA	SEQ ID NO: 56
---	--------------------	------------------

Согласно предсказаниям следующие последовательности сигнальных пептидов HE позволяют получить предпочтительный зрелый полипептид FimH или его фрагмент с N-концевым Phe в положении 1:

Таблица 6.

	Последовательность сигнального пептида	SEQ ID NO:
>sp P03420 FUS_HRSVA силтый белок F0 OS= респираторный синцитиальный вирус А человека (штамм А2) OX=11259 GN=F PE=1 SV=1	MELLILKANAITTILTAVTFCFASG	SEQ ID NO: 57
>sp P03451 HEMA_I57A0 гемагглютинин OS=вирус гриппа А (штамм А/Japan/305/1957 H2N2) OX=387161 GN=HA PE=1 SV=1	MAIYLILLFTAARG	SEQ ID NO: 58

Таблица 7.

Для предсказаний использовали SignalP 4.1

	Слитая последовательность
>sp P55899 FCGRN_HUMAN большая субъединица p51 рецептора IgG FcRn OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FCGRT PE=1 SV=1 MGVPRPQPWALGLLLFLLPAGSLGAES HLSLLYHLTAVSSPAPGTPAFWVSGW LGPQQYLS YNSLRGEAEPGAWVWENQVSWYW EKETDLRIKEKLFLEAFKALGGKGPY TLQGLLGCE LGPLDNTSVPTAKFALNGEEFMNFDLK QGTWGGDWPEALAIQRWQQQDKA ANKELTFLLF SCPHRLREHLERGRGNLEWKEPPSMR LKARPSSPGFSVLTCSAFSFPPELQLR FLRNGL	Сигнальный пептид белка, указанного в соответствующей левой колонке, показана ниже ЗАГЛАВНЫМИ БУКВАМИ . N-конец FimH обозначен строчными буквами. MGVPRPQPWALGLLLFLLPAGSLGfacktangtai pigggсанvyvnlapvvvngqnlvvdls (SEQ ID NO: 103)

<p>AAGTGQGDFGPNSDGSFHASSSLTVK SGDEHHYCCIVQHAGLAQPLRVELES PAKSSVLV VGIVIGVLLLTAAAVGGALLWRRMRS GLPAPWISLRGDDTGVLPTPGEAQD ADLKDVNV IPATA (SEQ ID NO: 102)</p>	<p># Измерение Положение Значение Порог отсечения сигнальный пептид? макс. C 24 0,664 макс. Y 24 0,788 макс. S 9 0,966 среднее S 1-23 0,935 D 1-23 0.867 0,450 ДА</p> <p>Название=Последовательность SP='ДА' Сайт расщепления между полож. 23 и 24: SLG-FA D=0,867 порог отсечения D =0,450 Networks=SignalP-no TM</p>
<p>>sp P03420 FUS_HRSVA слитый гликопротеин F0 OS=респираторный синцитиальный вирус А человека (штамм А2) OX=11259 GN=F PE=1 SV=1</p> <p>MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFY QSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE LSNIKENKCNNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVT ELQLLMQSTPPTNNRRELPRFMNYTLN NAKKTNVTLSSKRRRFLGFLGVSIAISG VAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVS LSNGVSVLTSKVLDLKNIYDKQLLPVINKQSC SISNIETVIEFQQKNRLLLEITREFSVN AGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKK LMSNNVQIVRQQSYMSIIEEVLAYV VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNI CLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKV QSNRVFCDTMNSLTLPSEINLCNVDIFNPKYD CKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT KCTASNKNRGIKTFNGCDYVSNKGMDTVS VGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDP LVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL HNVNAGKSTTNIMITTIIIVIIIVILLS LIAVGLLLYCKARSTPVTL SKDQLSGINNIASF N (SEQ ID NO: 104)</p>	<p>Сигнальный пептид белка, указанного в соответствующей левой колонке, показана ниже ЗАГЛАВНЫМИ БУКВАМИ. N-конец FimH обозначен строчными буквами.</p> <p>MELLILKANAITTILTAVTFCFASGfactangtaipig ggsanvyvnlapvvvngqnlvvdls (SEQ ID NO: 105)</p> <p># Измерение Положение Значение Порог отсечения сигнальный пептид? макс. C 28 0,188 макс. Y 28 0,263 макс. S 11 0,478 среднее S 1-27 0,387 D 1-27 0.312 0,500 НЕТ</p> <p>Название=Последовательность SP='НЕТ' D=0,312 порог отсечения D =0,500 Networks=SignalP-TM</p>

<p>>tr Q6FGW4 Q6FGW4_HUMAN белок IL10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IL10 PE=2 SV=1</p> <p>MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCT HFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQ LDNLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLE EVMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLR LRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNFNLQEQE KGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN (SEQ ID NO: 106)</p>	<p>Сигнальный пептид белка, указанного в соответствующей левой колонке, показана ниже ЗАГЛАВНЫМИ БУКВАМИ. N-конец FimH обозначен строчными буквами.</p> <p>MHSSALLCCLVLLTGVRAfacktangaipiggggsanvyv nlapvvvngqnlvvdls (SEQ ID NO: 107)</p> <p># Измерение Положение Значение Порог отсечения сигнальный пептид? макс. C 19 0,726</p> <p>макс. Y 19 0,829 макс. S 4 0,973 среднее S 1-18 0,947 D 1-18 0.893 0,450 ДА</p> <p>Название=Последовательность SP='ДА' Сайт расщепления между полож. 18 и 19: VRA-FA D=0,893 порог отсечения D =0,450 Networks=SignalP-noTM</p>
<p>>sp P03451 HEMA_157A0 гемагглютинин OS=вирус гриппа А (штамм А/Japan/305/1957 H2N2) OX=387161 GN=HA PE=1 SV=1</p> <p>MAIYLILLFTAVRGDQICIGYHANNSTEKVDT NLERNVTVTHAKDILEKTHNGKLCKLN GIPPELGDCSIAGWLLGNPECDRLLSVPEWS YIMEKENPRDGLCPGFSFNDYEELKHL SSVKHFEEKVILPKDRWTQHTTTGGSRAV SGNPSFFRNMVWLTKEGSDYPVAKGSYNN TSGEQMLIIVGVHHPIDETEQR TLYQNVGTYV SVGTSTLNKRSTPEIATRPKVNGQGGRM EFSWTLDMWDTINFESTGNLIAPEYGFKISK RGSSGIMKTEGTLENCETKCTPLGAIN TTLPFHNVHPLTIGECPKYVKSEKLVLATGLR NVPQIESRGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDG WYGYHHSNDQGSYAADKESTQKAFDGITN KVNVSIEKMNTQFEAVGKEFGNLERLENL NKRMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDF HDSNVKNLYDKVRMQLRDNVKELGNGCFEF</p> <p>YHKCDECMNSVKNGTYDYPKYEEESKLN NEIKGVKLSMGMVYQILAIYATVAGSLA IMMAGISFWMCSNGSLQCRICI (SEQ ID NO: 108)</p>	<p>Сигнальный пептид белка, указанного в соответствующей левой колонке, показана ниже ЗАГЛАВНЫМИ БУКВАМИ. N-конец FimH обозначен строчными буквами.</p> <p>MAIYLILLFTAVRGfacktangaipiggggsanvyv nlapvv nvgqnlvvdls (SEQ ID NO: 109)</p> <p># Измерение Положение Значение Порог отсечения сигнальный пептид? макс. C 18 0,524</p> <p>макс. Y 18 0,690 макс. S 1 0,951 среднее S 1-17 0,895 D 1-17 0.800 0,450 ДА</p> <p>Название=Последовательность SP='ДА' Сайт расщепления между полож. 17 и 18: GFA-CK D=0,800 порог отсечения D=0,450 Networks=SignalP-noTM</p>

ПРИМЕР 4. Экспрессия у млекопитающих комплементированного донорской цепью FimH, слитого с пептидом FimG

Исследовали несколько линкеров различной длины. Осуществляли рекомбинантную экспрессию с указанными линкерами, обеспечивающую слияние FimH с N-концевым пептидом FimG как в FimH дикого типа, так и с сигнальным пептидом mIgK, слитым с F22 FimH.

Было продемонстрировано, что конструкции FimH с комплементацией донорской цепью FimG также успешно экспрессируются в клетках EXPI293.

С нативным лидерным пептидом FimH предпочтительный процессинг N-конца (то есть процессинг по F22 последовательности SEQ ID NO: 1) продемонстрировать не удалось.

Для конструкций с комплементацией донорской цепью конструировали олигонуклеотиды для получения в pсDNA3.1(+) базовых конструкций, содержащих различные линкеры и пептид FimG. Уникальный сайт BstEII включали в остатки G294 V295 T296 согласно нумерации SEQ ID NO: 1 FimH. Тот же сайт BstEII включали в линкеры для получения базовых конструкций.

Создавали базовые конструкции для pSB01882-01895. Использовали праймеры для амплификации PCR pсDNA3.1(+) при помощи ДНК полимеразы ACCUPRIME PFX (Thermo Fisher), расщепляли продукты ПЦР при помощи NdeI (в промоторе CMV) и BamHI и клонировали в pсDNA3.1(+), которую расщепляли при помощи NdeI и BamHI, и выделяли из геля для удаления фрагмента.

Осуществляли другую транзиторную трансфекцию с использованием pSB01877, 01878, 01879, 01880, 01885 и 01892 наряду с клетками EXPI293 в качестве контроля.

Конструкции от pSB01882 до pSB01895 использовали для исследования транзиторной экспрессии после трансфекции клеток EXPI293 от Thermo Fisher согласно инструкциям производителя. См. Фиг. 3, где показаны результаты после экспрессии в 20 мл клеток EXPI293, 72 ч, загружали 10 мкл кондиционированной среды; наблюдались высокие уровни экспрессии; комплекс FimH/FimC, присутствующий в результате экспрессии конструкций pSB01879 & pSB01880; связывание партии кондиционированной среды 20 мл с Nickel Excel, промывание 40 объемами колонки (CV), элюирование имидазолом.

Получали дополнительные конструкции с FimH с комплементацией донорской цепью. См., например, конструкции pSB02198, pSB02199, pSB02200, pSB02304, pSB02305, pSB02306, pSB02307, pSB02308. Экспрессия конструкции pSB2198 закрепленного мутанта FimH dscG показана на Фиг. 7. Транзиторная экспрессия pSB2198 закрепленного мутанта FimH dscG обеспечивала выход 12 мг/л.

Согласно Vi-CELL XR 2.04 (Beckman Coulter, Inc.), наблюдалось следующее (фактическим типом клеток, использованным для экспрессии, были клетки HEK):

Таблица 8.

Образец	Тип клеток Введенный параметр	Жизнеспособность (%)	Всего клеток/мл ($\times 10^6$)	Жизнеспособных клеток/мл ($\times 10^6$)	Средний диаметр (микрон)
EXPI P13	CHO	97,8	3,56	3,48	19,33
pSB01882	CHO	90,9	4,98	4,53	17,39
pSB01889	CHO	89,2	5,23	4,67	17,14
клетки	CHO	88,9	6,66	5,92	16,91
Expi старт	CHO	93,7	3,35	3,14	18,72
Образцы при сборе ~ 85-86 часов после трансфекции:					
1877	SF-9	57,3	4,32	2,48	16,00
pSB01878	SF-9	57,6	3,88	2,24	15,49
pSB01879	SF-9	59,1	5,24	3,10	15,32
pSB01880	SF-9	56,8	5,97	3,39	15,10
pSB01885	SF-9	63,1	6,95	4,39	16,08
pSB01892	SF-9	56,2	4,89	2,75	15,91
187772	SF-9	79,5	5,14	4,09	18,36
187872	SF-9	72,6	5,26	3,81	17,35
Expi продолж	SF-9	75,5	4,95	3,74	18,62

ПРИМЕР 5. Молекулярная масса фрагментов с прошедшим процессинг сигнальным пептидом

Таблица 9.

pSB01877 FimH J96 ELL41155.1 [<i>E. coli</i> J96]			
Анализ			
	Анализ	Фрагмент 15-189	Целый белок
	Длина	175 ак	189 ак
	Молек. масса	18948,34	20522,36 мол.м,
	1 микрограмм =	52,775 пмоль	48,727 пмоль
	Молекул. коэф. поглощения	35800	35800
	1 А(280) соответствует:	0,53 мг/мл	0,57 мг/мл
	А[280] 1 мг/мл	1,89 ед.опт.плотн.	1,74 ед.опт.плотн.
	Изоэлектр. точка	6,81	8
	Заряд при рН7	-0,48	1,52
pSB01878 FimH J96 ELL41155.1 [<i>E. coli</i> J96]			
Анализ			
	Анализ	Фрагмент 21-188	Целый белок
	Длина	168 ак	188 ак
	Молек. масса	18117,48	20344,08 мол.м,
	1 микрограмм =	55,195 пмоль	49,154 пмоль
	Молекул. коэф. поглощения	24420	35800
	1 А(280) соответствует:	0,74 мг/мл	0,57 мг/мл
	А[280] 1 мг/мл	1,35 ед.опт.плотн.	1,76 ед.опт.плотн.
	Изоэлектр. точка	6,81	6,29
	Заряд при рН7	-0,48	-2,47
pSB01885 FimH J96 ELL41155.1 [<i>E. coli</i> J96]			
Анализ			
	Анализ	Фрагмент 20-331	Целый белок
	Длина	312 ак	331 ак
	Молек. масса	32406,19	34537,79 мол.м,
	1 микрограмм =	30,858 пмоль	28,954 пмоль
	Молекул. коэф. поглощения	38030	43720
	1 А(280) соответствует:	0,85 мг/мл	0,79 мг/мл
	А[280] 1 мг/мл	1,17 ед.опт.плотн.	1,27 ед.опт.плотн.
	Изоэлектр. точка	7,25	8,32
	Заряд при рН7	0,5	2,5

pSB01892 FimH J96 ELL41155.1 [<i>E. coli</i> J96]			
Анализ			
	Анализ	Фрагмент 21-330	Целый белок
	Длина	310 ак	330 ак
	Молек. масса	32132,91	34359,51 мол,м,
	1 микрограмм =	31,121 пмоль	29,104 пмоль
	Молекул. коэф. поглощения	32340	43720
	1 А(280) соответствует:	0,99 мг/мл	0,79 мг/мл
	А[280] 1 мг/мл	1,01 ед.опт.плотн.	1,27 ед.опт.плотн.
	Изоэлектр. точка	7,25	6,51
	Заряд при рН7	0,5	-1,49
pSB01893 FimH J96 ELL41155.1 [<i>E. coli</i> J96]			
Анализ			
	Анализ	Целый белок	
	Длина	331 ак	
	Молек. масса	34416,56	
	1 микрограмм =	29,056 пмоль	
	Молекул. коэф. поглощения	43720	
	1 А(280) соответствует:	0,79 мг/мл	
	А[280] 1 мг/мл	1,27 ед.опт.плотн.	
	Изоэлектр. точка	6,51	
	Заряд при рН7	-1,49	
pSB01894 FimH J96 ELL41155.1 [<i>E. coli</i> J96]			
Анализ			
	Анализ	Фрагмент 21-332	Целый белок
	Длина	312 ак	332 ак
	Молек. масса	32247,01	34473,61 мол,м,
	1 микрограмм =	31,011 пмоль	29,008 пмоль
	Молекул. коэф. поглощения	32340	43720
	1 А(280) соответствует:	1,00 мг/мл	0,79 мг/мл
	А[280] 1 мг/мл	1,00 ед.опт.плотн.	1,27 ед.опт.плотн.
	Изоэлектр. точка	7,25	6,51
	Заряд при рН7	0,5	-1,49

pSB02083

Анализ	Фрагмент 21-188	Целый белок
Длина	168 ак	188 ак
Молек. масса	18063,42	20290,02 мол.м.
1 микрограмм =	55,361 пмоль	49,285 пмоль
Молекул. коэф. поглощения	24420	35800
1 А(280) соответствует:	0,74 мг/мл	0,57 мг/мл
А[280] 1 мг/мл	1,35 ед.опт.плотн.	1,76 ед.опт.плотн.
Изоэлектр. точка	6,81	6,29
Заряд при рН7	-0,48	-2,47

pSB02198

Образец	FimH PSB 2198 1,45 мг/мл 5 мл 20190918 SS
Объем (мл)	25
Конц. (мг/мл)	1,45
Общее количество (мг)	36,25
Аликвоты	5 мл x5
Выход	12 мг/л
Буфер : 50 mM TrisCl pH8,0, 300 mM NaCl	

pSB02307

Название образца	Fim H 2307 0,48 мг/мл 5 мл 20190918 SS
Объем (мл)	22,5 мл
Конц. (мг/мл)	0,48 мг/мл
Общее количество (мг)	10,8 мг

Выход	3,6 мг/л
Буфер : 50 мМ TrisCl pH8,0, 300 мМ NaCl	

ПРИМЕР 6. N-концевая α -аминогруппа Phe1 (согласно нумерации SEQ ID NO: 2) в зрелом белке FimH обеспечивает ключевые полярные мотивы распознавания D-маннозы

Не ограничиваясь конкретной теорией или механизмом, предполагается, что корректное расщепление сигнального пептида непосредственно перед Phe1 (согласно нумерации SEQ ID NO: 2) зрелого белка FimH имеет важное значение для экспрессии функционального белка FimH. Изменения N-концевой α -аминогруппы, такие как добавление аминокислоты на N-конце белка FimH перед Phe1, могут устранять взаимодействия в форме водородных связей между O2-, O5- и O6-атомами D-маннозы и приводить к стерическому отталкиванию D-маннозы, тем самым блокируя связывание маннозы. Это подтверждается экспериментальными наблюдениями, что при добавлении дополнительного остатка Gly перед Phe1 SEQ ID NO: 2 связывание маннозы не детектируется.

После анализа кристаллической структуры FimH, связанного с D-маннозой, наблюдалось следующее: N-концевая α -аминогруппа Phe1 наряду с боковыми цепями Asp54 FimH согласно нумерации SEQ ID NO: 2 и Gln133 FimH согласно нумерации SEQ ID NO: 2 обеспечивают ключевые полярные мотивы распознавания D-маннозы, и в результате мутаций и изменения этих полярных взаимодействий связывание маннозы не происходит.

ПРИМЕР 7. Боковая цепь Phe1 в FimH не взаимодействует непосредственно с D-маннозой, но скорее погружена внутрь FimH, что позволяет предположить, что Phe1 может быть заменен на другие остатки, например алифатические гидрофобные остатки (Phe, Leu или Val)

Анализ кристаллических структур FimH в комплексе с D-маннозой и ее аналогами (например, PDB ID: 1QUN) показывает, что боковая цепь Phe1 (согласно нумерации SEQ ID NO: 2) непосредственно не взаимодействует с D-маннозой, но скорее стабилизирует связывающий карман благодаря особой укладке своих ароматических колец и боковых цепей Val56, Tyr95, Gln133 и Phe144 (согласно нумерации SEQ ID NO: 2).

Являющийся альтернативным N-концевой остаток, заменяющий Phe, может

стабилизировать белок FimH, обеспечивать связывание маннозы и позволять корректно расщепляться сигнальному пептиду. Такие остатки можно выявить подходящим способом, известным в области техники, таким как визуальное инспектирование кристаллической структуры FimH, или более количественный отбор с применением программного обеспечения для дизайна белков, такого как BioLuminate™ [BioLuminate, Schrodinger LLC, New York, 2017], Discovery Studio™ [Discovery Studio Modeling Environment, Dassault Systèmes, San Diego, 2017], MOE™ [Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group Inc., Montreal, 2017] и Rosetta™ [Rosetta, University of Washington, Seattle, 2017]. Служащий иллюстрацией пример показан на Фиг. 9А-9С. Замещающие аминокислоты могут быть алифатическими гидрофобными аминокислотами (например, Ile, Leu и Val). На Фиг. 11 показан моделируемый сканирующий мутагенез Phe1 другими аминокислотами, имеющими алифатические гидрофобные боковые цепи, например, Ile, Leu и Val, способными стабилизировать белок FimH и обеспечивать связывание маннозы.

ПРИМЕР 8. Мутации Asn7 согласно нумерации SEQ ID NO: 2 в белке FimH могут удалять возможный сайт N-гликозилирования и предупреждать дезаминирование, не влияя на связывание маннозы, mAb21 или mAb475

Сверхэкспрессия секретируемого FimH *E. coli* в клеточных линиях млекопитающих может привести к N-связанному гликозилированию по остатку Asn7, согласно нумерации SEQ ID NO: 2. Кроме того, остаток Asn7 обращен в сторону растворителя, а за ним следует остаток Gly, что делает его в высокой степени подверженным дезаминированию.

Анализ кристаллических структур FimH в комплексе с D-маннозой и ее аналогами (например, PDB ID: 1QUN) показывает, что Asn7 находится на расстоянии более чем 20 Å от сайта связывания маннозы и его мутация не должна влиять на связывание маннозы. Таким образом, мутации Asn7 на другие аминокислоты (например, Ser, Asp и Gln) может эффективно удалять возможный сайт N-гликозилирования и предупреждать дезаминирование.

ПРИМЕР 9. Штаммы *E. coli* и *S. enterica*

Клинические штаммы и производные приведены в Таблице 10. Дополнительные эталонные штаммы включали: O25K5H1, клинический штамм серотипа O25a и *S. enterica* серовар *Typhimurium* штамм LT2.

Были произведены нокауты генов штаммов *E. coli*, приводящие к удалению

специфической открытой рамки считывания, но оставляющие короткую шрамовую последовательность.

Гидролизованная цепь О-антигена и коровые сахара в целях простоты далее обозначаются как О-полисахарид (OPS).

Таблица 10. Штаммы <i>E. coli</i>			
Штамм	Дополнительное название штамма	Генотип	Серотип
GAR2401	PFEEC0100	wt (изолят из крови)	O25b
'2401 Δ wzzB	--	Δ wzzB	O25b
'2401 Δ AraA Δ (OPS)	--	Δ AraA Δ (rf1B-wzzB)	OPS-
O25K5H1	PFEEC0101	wt	O25a
O25K5H1 Δ wzzB		Δ wzzB	O25a
BD559	--	W3110 Δ AraA Δ fhuA Δ recA	OPS-
BD559 Δ wzzB	--	W3110 Δ AraA Δ fhuA Δ recA Δ wzzB	OPS-
BD559 Δ (OPS)	--	BD559 Δ (rf1B-wzzB)	OPS-
GAR2831	PFEEC0102	wt (изолят из крови)	O25b
GAR865	PFEEC0103	wt (изолят из крови)	O2
GAR868	PFEEC0104	wt (изолят из крови)	O2
GAR869	PFEEC0105	wt (изолят из крови)	O15
GAR872	PFEEC0106	wt (изолят из крови)	O1
GAR878	PFEEC0107	wt (изолят из крови)	O75
GAR896	PFEEC0108	wt (изолят из крови)	O15
GAR1902	PFEEC0109	wt (изолят из крови)	O6
Atlas187913	PFEEC0068	wt (изолят из крови)	O25b
<i>Salmonella enterica</i> серовар <i>Typhimurium</i> штамм LT2	--	wt	N/A

ПРИМЕР 10. Олигонуклеотидные праймеры для клонирования кластера генов *wzzB*, *ferE* и О-антигена

Таблица 11. Олигонуклеотидные праймеры

Название	Последовательность праймера	Комментарии
LT2wzzB_S	GAAGCAAACCGTACGCGTAAAG (SEQ ID NO: 40)	На основе Genbank GCA_000006945.2 <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>Typhimurium</i> штамм LT2
LT2wzzB_AS	CGACCAGCTCTTACACGGCG (SEQ ID NO: 41)	
O25bFepE_S	GAAATAGGACCACTAATAAATACACAAATTAATAAC (SEQ ID NO: 42)	На основе Genbank GCA_000285655.3

Таблица 11. Олигонуклеотидные праймеры

Название	Последовательность праймера	Комментарии
O25bFepE_A	АТААТТGACGATCCGGTTGCC (SEQ ID NO: 43)	штамм O25b EC958 сборка ST131 и данных полногеномного секвенирования O25b GAR2401
wzzB P1_S	GCTATTTACGCCCTGATTGTCTTTTGT (SEQ ID NO: 44)	На основе последовательности штамма <i>E. coli</i> K-12, Genbank <i>MG1655</i> NC_000913.3 или сборки W3110 GCA_000010245.1
wzzB P2_AS	АТТGAGAACCTGCGTAAACGGC (SEQ ID NO: 45)	
wzzB P3_S	TGAAGAGCGGTTTCAGATAACTTCC (SEQ ID NO: 46) (UDP-глюкозо-6-дегидрогеназа)	
wzzB P4_AS	CGATCCGGAACCTCCTACAC (SEQ ID NO:47) (фосфорибозил-АМФ циклогидролаза/ фосфорибозил-АТФ пиррофосфогидролаза)	
O157 FepE_S	GATTATTCGCGCAACGCTAAACAGAT (SEQ ID NO: 48)	fepE <i>E. coli</i> O157 (на основе Genbank EDL933 штамм GCA_000732965.1)
O157 FepE_AS	TGATCATTGACGATCCGGTAGCC (SEQ ID NO: 49)	
pBAD33_adaptor_S	CGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTG GTTTAAACCCAAGCAACAGATCGGCGTCGTCG GTATGGA (SEQ ID NO: 50)	Адаптор имеет центральный сайт <i>PmeI</i> и гомологичен консервативному 5' промотору оперона OAg и последовательностям 3' гена <i>gnd</i>
pBAD33_adaptor_AS	AGCTTCCATACCGACGACGCCGATCTGTTGCT TGGGTTTAAACCACGCTACCGCCCCTGGCTTT ACAGCTACCGAGCT (SEQ ID NO: 51)	
JUMPSTART_r	GGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTG (SEQ ID NO: 52)	универсальный Jumpstart (промотор оперона OAg)
gnd_f	CCATACCGACGACGCCGATCTGTTGCTTGG (SEQ ID NO: 53)	Универсальный антисмысловый праймер 3' оперона OAg (<i>gnd</i>)

ПРИМЕР 11. Плазмиды

Плазмидные векторы и субклоны приведены в Таблице 12. ПЦР фрагменты, несущие различные гены *wzzB* и *fepE* *E. coli* и *Salmonella* амплифицировали из очищенной геномной ДНК и субклонировали в мультикопийную плазмиду, входящую в набор для клонирования PCR®Blunt от Invitrogen, Фиг. 12А-12В. Основой плазмиды является репликон pUC. Для амплификации генов *wzzB* *E. coli* с их нативным промотором использовали праймеры P3 и P4, которые сконструированы для связывания с областями в проксимальных и дистальных генах, кодирующих УДФ-глюкозо-6-

дегидрогеназу и фосфорибозиладенин нуклеотид гидролазу, соответственно (аннотировано в Genbank *MG1655* NC_000913.3). ПЦР-фрагмент, содержащий ген и промотор *fepE* *Salmonella*, амплифицировали с использованием праймеров, описанных ранее. Аналогичные праймеры *fepE* *E. coli* создавали на основе геномных последовательностей, представленных в Genbank, или полногеномных данных, полученных собственными силами (в случае GAR2401 и O25K5H1). Для экспрессии генов биосинтеза О-антигена под контролем промотора арабинозы использовали низкокопийную плазмиду pBAD33. Вначале плазмиду модифицировали для облегчения клонирования (методом Гибсона) длинных ПЦР-фрагментов, амплифицированных с использованием универсальных праймеров, гомологичных 5' промотору и 3' гену б-фосфоглюконат дегидрогеназы (*gnd*) Таблица 12.. Субклон pBAD33, содержащий биосинтетический оперон O25b показан на Фиг. 12А-12В.

Таблица 12.

Плазмиды

Название	Репликон	Маркер устойчивости	Комментарии
PCR®Blunt II TOPO	pUC	KanR	Клонирующий вектор Invitrogen PCR
pBAD33	P15a	CamR	Индукцируемый арабинозой вектор
pBAD33-OAg	P15a	CamR	Оперон OAg Gibson cloning vector
pBAD33-O25b	P15a	CamR	Экспрессирующая плаزمида O25b OAg
pBAD33-O21	P15a	CamR	Экспрессирующая плазмида O21 OAg
pBAD33-O16	P15a	CamR	Экспрессирующая плазмида O16 OAg
pBAD33-O75	P15a	CamR	Экспрессирующая плазмида O75 OAg
pBAD33-O1	P15a	CamR	Экспрессирующая плазмида O1 OAg
pBAD33-O2	P15a	CamR	Экспрессирующая плазмида O2 OAg
pТОРО-O25b 2401 wzzB	pUC	KanR	GAR 2401 матрица гДНК
pТОРО-O25b 2401 fepE	pUC	KanR	
pТОРО-K12 wzzB	pUC	KanR	Матрица гДНК <i>E. coli</i> штамм К-12
pТОРО-O25a wzzB	pUC	KanR	Матрица гДНК <i>E. coli</i> O25a штамм
pТОРО-O25a fepE	pUC	KanR	O25K5H1
pТОРО-Salmonella LT2 wzzB	pUC	KanR	Матрица гДНК <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>Typhimurium</i> штамм LT2
pТОРО-Salmonella LT2 fepE	pUC	KanR	
pТОРО-O25a ETEC wzzB	pUC	KanR	гДНК ETEC штамма O25a приобрели в АТСС ("NR-5" E2539-C1)
pТОРО-O25a ETEC fepE	pUC	KanR	

Плазмиды

Название	Репликон	Маркер устойчивости	Комментарии
pTOPO-O157ferE	pUC	KanR	гДНК шига-токсин-продуцирующего штамма O157:H7:K- приобрели в ATCC (EDL933 #43895D-5)

Пример 12. Очистка O-антигена

Культуральную жидкость обрабатывали уксусной кислотой в конечной концентрации 1-2% (конечные значения pH 4,1). Экстрагирование OAg и обезжиривание осуществляли путем нагревания обработанного кислотой культурального бульона до 100°C в течение 2 часов. В конце кислотного гидролиза партию охлаждали до комнатной температуры и добавляли 14% NH₄OH до конечного значения pH 6,1. Нейтрализованную среду центрифугировали и собирали центрифугат. К центрифугату добавляли CaCl₂ в фосфате натрия и полученную суспензию инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Твердые вещества удаляли путем центрифугирования, а центрифугат концентрировали в 12 раз при помощи мембраны 10 кДа, после чего двукратно проводили диафильтрацию против воды. Ретентат, содержащий OAg затем очищали с применением угольного фильтра. Фильтрат разводили 1:1 (об./об.) 4,0 М сульфатом аммония. Конечная концентрация сульфата аммония составляла 2М. Обработанный сульфатом аммония фильтрат дополнительно очищали с применением мембраны с 2 М сульфатом аммония в качестве проточного буфера. Элюат с OAg собирали. В случае длинного OAg фильтрат HIC концентрировали и затем проводили замену буфера на воду (20 диаобъемов) с применением мембраны 5 кДа. В случае короткого (нативного) полисахарида OAg MWCO (отсечение по молярной массе) было еще меньше для улучшения выхода.

Пример 13. Конъюгирование длинного O-антигена O25b с CRM₁₉₇

Первую партию конъюгатов полисахарида O25b с CRM₁₉₇ получали посредством периодатного окисления с последующим конъюгированием посредством восстановительного аминирования (RAC) (Таблица 14.). Получали варианты конъюгатов с тремя степенями активации (низкой, средней и высокой) путем варьирования степеней окисления. Конъюгаты получали посредством реакции лиофилизированных активированных сахаридов с лиофилизированным CRM₁₉₇, восстановленным в среде

DMSO с применением цианоборогидрида натрия в качестве восстанавливающего агента. Реакции конъюгирования проводили при 23°C в течение 24 часов, с последующим кэпированием с использованием борогидрида натрия в течение 3 ч. После стадии остановки конъюгирования конъюгаты очищали путем ультрафильтрации/диафильтрации с использованием регенерированной целлюлозной мембраны с MWCO 100K с применением 5 mM сукцината/0,9% NaCl, pH 6,0. Финальную фильтрацию конъюгатов осуществляли с применением мембраны 0,22 мкм.

Если не указано иное, конъюгаты, изложенные в Примерах ниже, включают в себя коровую сахаридную группировку.

1.1. Экспрессия длинного O-антигена, обеспечиваемая гетерологичными полимеразами, регулирующими длину цепи

Первоначальная конструкция штамма *E. coli* имела в качестве основы серотип O25. Задачей была сверхэкспрессия гетерологичных генов *wzzB* или *fepE*, чтобы проверить, обеспечивают ли они большую длину цепи у штаммов O25 с нокаутом *wzzB*. Вначале, проводили скрининг изолятов из крови методом ПЦР для обнаружения штаммов подтипа O25a и O25b. Затем проводили скрининг штаммов на чувствительность к ампициллину. Обнаружили единственный чувствительный к ампициллину изолят O25b GAR2401, в который внедряли делецию *wzzB*. Аналогично, осуществляли делецию *wzzB* в штамме O25a O25K5H1. Для генетической комплементации указанных мутаций гены *wzzB* из GAR 2401 и O25K5H1 субклонировали в мультикопийный клонирующий вектор PCR-Blunt II и внедряли в оба штамма путем электропорации. Дополнительные гены *wzzB* из *E. coli* K-12 и *S. enterica* серовар *Typhimurium* LT2 клонировали аналогичным образом и переносили; как и гены *fepE* из *E. coli* O25K5H1, GAR 2401, O25a ETEC NR-5, O157:H7:K- и *S. enterica* серовар *Typhimurium* LT2.

Бактерии выращивали в течение ночи в среде LB и экстрагировали LPS фенолом, разделяли при помощи SDS PAGE (4-12% акриламид) и окрашивали. В каждую лунку геля загружали LPS, экстрагированный из такого же количества бактериальных клеток (приблизительно 2 единицы OD₆₀₀). Размер LPS оценивали по внутреннему стандарту нативного LPS *E. coli* и маркеру длины, узнаваемому в подгруппе образцов, демонстрирующих большой разброс длин цепей (отличающихся на одно повторяющееся звено). В левой части Фиг. 13А показаны профили LPS у трансформированных плазмидами O25a O25K5H1Δ*wzzB*; а в правой части - аналогичные профили

трансформантов O25b GAR 2401 Δ wzzB. Результаты иммуноблоттинга, где вторую копию геля инкубировали с O25-специфической сывороткой, показаны на Фиг. 13B.

Результаты данного эксперимента показали, что внедрение гомологичного гена *wzzB* в хозяина *E. coli* O25a Δ wzzB восстанавливает экспрессию короткого LPS O25 (10-20x), как и *wzzB Salmonella LT2*. Внедрение гена *wzzB* O25b из GAR2401 этого не делает, что позволяет предположить, что фермент WzzB из этого штамма является дефектным. Сравнение аминокислотных последовательностей WzzB *E. coli* позволяет предположить, что ответственными могут быть замены A210E и P253S. Важно, что *fepE Salmonella LT2* и *fepE E. coli* из O25a O25K5H1 обеспечивали способность экспрессировать очень длинный (VL) OAg LPS, при этом *fepE Salmonella LT2* обеспечивал OAg, превосходящий по размеру тот, что обеспечивался *fepE E. coli*.

Аналогичный паттерн экспрессии наблюдался с трансформантами GAR2401 Δ wzzB: Способность продуцировать короткий LPS восстанавливалась *wzzB E. coli* штамма O25a или K12. Наиболее длинный LPS образовывался под влиянием *fepE Salmonella LT2*, несколько более короткий LPS - под влиянием *fepE E. coli*, тогда как *wzzB Salmonella LT2* приводил к образованию LPS промежуточного размера (L). Способность других генов *fepE E. coli* продуцировать очень длинный LPS оценивали в отдельном эксперименте с трансформантами *E. coli* O25a Δ wzzB. Гены *fepE* из GAR2401, штамма ETEC O25a и шига-токсин продуцирующего штамма O157 также обеспечивали способность продуцировать очень длинный LPS, но не такой длинный, как LPS, образованный *fepE Salmonella LT2* (Фиг. 14).

Установив, что среди изучавшихся регуляторов полимеразы наиболее длинный LPS в штаммах серотипа O25a и O25b обеспечивает *fepE Salmonella LT2*, далее авторы изобретения попытались установить, будет ли он также обеспечивать очень длинный LPS в *E. coli* других серотипов. Изоляты бактерий серотипов O1, O2, O6, O15 и O75 дикого типа трансформировали плазмидой с *fepE Salmonella* и экстрагировали LPS. Результаты, показанные на Фиг. 15, подтверждают, что *fepE Salmonella* может придавать способность создавать очень длинный LPS у других распространенных серотипов, ассоциированных с инфекциями крови. Результаты также свидетельствуют, что опосредованная плазмидами экспрессия *fepE Salmonella* способна преодолеть контроль за длиной цепи, обычно осуществляемый эндогенным *wzzB* в этих штаммах.

1.2. Опосредованная плазмидами экспрессия O-антигенов в общем штамме-хозяине *E. coli*

С точки зрения биотехнологических разработок, способность продуцировать О-антигены различных серотипов в общем хозяине *E. coli* вместо множества штаммов значительно упростит производство отдельных антигенов. С этой целью кластеры генов О-антигена из различных серотипов амплифицировали при помощи ПЦР и клонировали в низкокопийную плазмиду (pBAD33) под контролем промотора, регулируемого арабинозой. Плазмида совместима (может сосуществовать) с плазмидой, несущей *fepE* *Salmonella* LT2, в *E. coli*, поскольку она несет другой репликон (p15a) и другой маркер селекции (хлорамфеникол вместо канамицина). В первом эксперименте GAR2401 Δ wzzB совместно трансфицировали субклоном плазмиды pBAD33 с опероном O25b и плазмидой, несущей *fepE* *Salmonella* LT2, и выращивали трансформантов в присутствии или отсутствии 0,2% арабинозы. Результаты, приведенные на Фиг. 16А-16В, показали, что продуцирование очень длинного О-антигена LPS было арабинозо-зависимым.

Кластеры генов О-антигена из других серотипов оценивали аналогичным образом, результаты показаны на Фиг. 17. Совместная экспрессия плазмид с *fepE* *Salmonella* LT2 и pBAD33-OAg позволяла детектировать длинноцепочечный LPS, соответствующий серотипам O1, O2 (для двух клонов из четырех), O16, O21 и O75. По неизвестным причинам плазмида pBAD33-O6 не обеспечивала детектируемый выход LPS ни в одном из протестированных изолятов. Несмотря на вариабельность уровня экспрессии, результаты показали, что экспрессия длинноцепочечных О-антигенов в общем хозяине возможна. Однако, в некоторых случаях может требоваться дополнительная оптимизация, например, модификация последовательностей промотора плазмиды.

Профили LPS из штаммов *E. coli* различных серотипов O25 с плазмидой *fepE* *Salmonella* LT2 или без показаны на Фиг. 18. У двух штаммов исследовали ферментацию, выделение и очистку О-антигенов: у GAR2831 продукцию нативного короткого O25b OAg; и у GAR2401 Δ wzzB/*fepE* продукцию длинного O25b OAg. Соответствующие короткие и длинные формы LPS показаны на геле SDS-PAGE на Фиг. 18, выделены красным. Полисахариды экстрагировали непосредственно из осуществляющих ферментацию бактерий уксусной кислотой и очищали. Профили очищенных коротких и длинных или очень длинных полисахаридов O25b, полученные при помощи эксклюзионной хроматографии, показаны на Фиг. 19А-19В. Свойства двух лотов коротких полисахаридов (из GAR2831) сравнивали с единственным препаратом очень

длинного полисахарида (из штамма GAR2401Δ*wzzB/fepE*). Молекулярная масса длинного О-антигена в 3,3 раза больше по сравнению с коротким О-антигеном, а число повторяющихся звеньев по оценкам составляет ~65 (очень длинный) против ~20. См. Таблицу 13.

Таблица 13.

№ лота полисахарида	Нативный	Нативный	Модифицированный (длинная цепь)
№ лота полисахарида	709766-24А	709722-24В	709766-25А
Мол.масса полисахарида (кДа)	17,3	16,3	55,3
Число повторяющихся звеньев	20	19	64

Очень длинный полисахаридный О-антиген O25b конъюгировали с дифтерийным анатоксином CRM₁₉₇ при помощи стандартного процесса восстановительного аминирования. Получали три различных лота гликоконъюгата путем варьирования степени активации периодатом: средней (5,5%), низкой (4,4%) и высокой (8,3%). Полученные препараты и неконъюгированный полисахарид не были контаминированы эндотоксином (Таблица 14.).

Группы из четырех кроликов (самки новозеландской белой породы) вакцинировали 10 мкг гликоконъюгата и 20 мкг адьюванта QS21 и брали образцы сыворотки (VAC-2017-PRL-EC-0723) согласно схеме, показанной на Фиг. 20А. Следует отметить, что доза 10 мкг находится на нижнем пределе диапазона, обычно даваемого кроликам при оценке бактериальных гликоконъюгатов (более типично 20-50 мкг). В отдельном исследовании (VAC-2017-PRL-GB-0698) группу кроликов также вакцинировали неконъюгированным полисахаридом с применением той же дозы (10 мкг полисахарида + 20 мкг адьюванта QS21) и идентичной схемой введения.

Гуморальные ответы кроликов на три препарата гликоконъюгатов O25b оценивали в тесте LUMINEX, в котором частицы, несущие карбоксильные группы, покрывали метилированным альбумином человеческой сыворотки, предварительно связанным с неконъюгированным длинным полисахаридом O25b. Присутствие O25b-специфических IgG антител в образцах сыворотки определяли при помощи вторичного анти-IgG антитела, меченного фикоэритрином (PE). Профили иммунных ответов,

наблюдавшихся в образцах сыворотки на 9 неделе (до иммунизации), 6 неделе (после 2 введения, PD2), 8 неделе (после 3 введения, PD3) и 12 неделе (после 4 введения, PD4) у кроликов с наилучшим ответом (по одному из каждой группы из четырех) показаны на Фиг. 21А-21С. Ни у одного из 12 кроликов не определялись значимые титры IgG сыворотки до иммунизации. Напротив, специфические к O25b гуморальные ответы детектировались в сыворотке кроликов после вакцинации во всех трех группах, при этом ответы в группе с низкой активацией гликоконъюгатов были чуть выше, чем в группах со средней или высокой активацией гликоконъюгатов. Максимальные ответы наблюдались после 3 введения. У одного кролика в группе с низкой активацией и одного кролика в группе с высокой активацией ответ на вакцинацию не развился (отсутствие ответа).

Для оценки влияния конъюгирования с белком-носителем CRM₁₉₇ на иммуногенность длинного полисахаридного OAg O25b сравнивали наличие антител в сыворотке кроликов, вакцинированных неконъюгированным полисахаридом, и кроликов, вакцинированных гликоконъюгатом с CRM₁₉₇ с низкой активацией, Фиг. 22А-22F. Следует отметить, что свободный полисахарид не был иммуногенным, фактически не вызывая ответа IgG в сыворотке после иммунизации по сравнению с сывороткой до иммунизации (Фиг. 22А). Напротив, у трех кроликов из четырех, вакцинированных OAg O25b - CRM₁₉₇, в точке PD4 наблюдались значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) для IgG, специфических к OAg O25b, которые приблизительно в 10 раз превышали уровни в сыворотке до иммунизации по всему диапазону разведений сыворотки (от 1:100 до 1:6400). Эти результаты демонстрируют необходимость конъюгирования с белком-носителем для выработки IgG антител на полисахаридный OAg O25b в дозе 10 мкг.

Бактерии, выращиваемые на чашках с TSA, суспендировали в PBS, доводили до OD₆₀₀ 2,0 и фиксировали в 4% параформальдегиде в PBS. После блокирования в 4% BSA/PBS в течение 1 часа бактерии инкубировали с разведениями сыворотки до иммунизации и иммунной сыворотки PD3 в 2% BSA/PBS и детектировали связавшиеся IgG при помощи вторичного F(ab) антитела, меченного PE.

Специфичность антител к O25b, индуцированных OAg O25b - CRM₁₉₇ демонстрировали в экспериментах с проточной цитометрией с интактными бактериями. Связывание IgG с цельными клетками детектировали при помощи конъюгированного с

PE F(ab')₂ фрагмента антитела козы против IgG кролика на проточном цитометре Accuri.

Как показано на Фиг. 23А-23С, антитела кроликов до иммунизации не связывались с изолятами дикого типа GAR2831 и GAR2401 серотипа O25b и или со штаммом К-12 *E. coli*, тогда как соответствующие антитела PD3 окрашивали бактерии O25b зависимым от концентрации образом. Штамм К-12, служивший отрицательным контролем, лишенный способности экспрессировать OAg, демонстрировал лишь очень слабое связывание с антителами PD3, вероятнее всего из-за наличия экспонированных эпитопов внутренних коровых олигосахаридов на его поверхности. Внедрение плазмиды с *fepE Salmonella* в изоляты O25b дикого типа приводило к существенному усилению окрашивания, что согласовывалось с большей плотностью иммуногенных эпитопов, обеспечиваемых более длинным полисахаридным OAg.

Заключение: Описанные результаты показывают, что *fepE Salmonella* не только является фактором, обеспечивающим очень длинные полисахаридные O-антигены у видов *Salmonella*, но также может придавать способность производить очень длинные OAg штаммам *E. coli* с различными серотипами O-антигена. Это свойство можно использовать в биотехнологических разработках для получения O-антигенных вакцинных полисахаридов с улучшенными свойствами благодаря облегченной очистке и химического конъюгирования с соответствующими белками-носителями, и возможно, усиления иммуногенности за счет формирования более высокомолекулярных комплексов.

ПРИМЕР 14. Первоначальные исследования на кроликах с получением первых поликлональных антительных реагентов и ответы IgG на полученный восстановительным аминированием (RAC) конъюгат OAg O25b - CRM₁₉₇

Конъюгаты длинноцепочечного полисахарида O25b с CRM₁₉₇ получали посредством периодатного окисления с последующим конъюгированием посредством восстановительного аминирования (RAC) (Таблица 14.). См. также Таблицу 24.

Таблица 14.

Конъюгат CRM₁₉₇	132242-28 Средняя степень активации 5,5%	132242-27 Низкая степень активации 4,5%	132242-29 Высокая степень активации 8,3%	709766-29 Свободный полисахарид O25b
---------------------------------------	--	---	--	--

Концентрация полисахарида (мг/мл)	0,7	0,6	0,67	1
Эндотоксин (ед.эндот./мкг)	0,02	0,02	0,02	<0,6 ед. эндотокс.
Матрикс	5 мкМ сукцинатный буфер /физ. раствор, рН 6,0			

В исследовании 1 на кроликах (VAC-2017-PRL-EC-0723) (см. также описание выше в Примере 13) пять (5) кроликов/группу, получали композицию с 10 мкг RAC-конъюгата с низкой (L-), средней (M-) или высокой (H-) активацией (+QS21) согласно схеме, приведенной на Фиг. 20А. Неконъюгированный свободный полисахарид O25b оказался неиммуногенным при последующем наблюдении за кроликами (VAC-2017-PRL-GB-0698) (см. Фиг. 25).

В исследовании 2 на кроликах (VAC-2018-PRL-EC-077) 2 кролика/группу, получали композицию с L-RAC (AlOH₃, QS21, или без адъюванта) согласно схеме, приведенной на Фиг. 20В.

Кролики 4-1, 4-2, 5-1, 5-2, 6-1 и 6-2 получали очень длинный неконъюгированный полисахарид O25b, описанный в Примере 13, и на 18 неделе исследовали сыворотку.

Более конкретно, кролику 4-1 вводили композицию, включавшую 50 мкг неконъюгированного O25b, 100 мкг адъюванта AlOH₃. Кролику 4-2 вводили композицию, включавшую 50 мкг неконъюгированного O25b, 100 мкг адъюванта AlOH₃. Кролику 5-1 вводили композицию, включавшую 50 мкг неконъюгированного O25b, 50 мкг адъюванта QS-21. Кролику 5-2 вводили композицию, включавшую 50 мкг неконъюгированного O25b, 50 мкг адъюванта QS-21. Кролику 6-1 вводили композицию, включавшую 50 мкг неконъюгированного O25b, без адъюванта. Кролику 6-2 вводили композицию, включавшую 50 мкг неконъюгированного O25b, без адъюванта.

Пример 15. Исследование титров (разведений) сыворотки кроликов, получавших RAC-конъюгат O25b: dLIA

Сравнивали титры (разведения) сыворотки кроликов из исследования 2 (VAC-2018-PRL-EC-077), получавших O25b dLIA, и кролика с наилучшим ответом из исследования 1 (VAC-2017-PRL-EC-0723). В этих экспериментах проводили модифицированный анализ непосредственного связывания Luminex, в котором полилизинный конъюгат длинного O-антигена O25b пассивно адсорбировали на

частицах Lumineх, несущих карбоксил, вместо смеси метилированного сывороточного альбумина с длинным О-антигеном, как описано ранее. Применение конъюгата полилизин-О25b улучшало чувствительность анализа и качество IgG ответов, демонстрировавших зависимость от концентрации, что позволяло определять титры (разведения) сыворотки с применением аппроксимирующей кривой (четырёхпараметрическая модель нелинейной регрессии). в Таблице 15 сравниваются титры IgG к О25b в сыворотке от кролика с наиболее высоким титром из первого исследования и сыворотке кроликов из второго исследования.

Таблица 15.

	конъюгат О25b- CRM, низкая степень активации, адъювант на основе алюминия (EC ₅₀ как разведение сыворотки)		конъюгат О25b- CRM, низкая степень активации, адъювант QS21 (EC ₅₀ как разведение сыворотки)		конъюгат О25b- CRM, низкая степень активации, без адъюванта (EC ₅₀ как разведение сыворотки)	
	кролик 1-1	кролик 1-2	кролик 2-1	кролик 2-2	кролик 3-1	кролик 3-2
Антисыворотка 3 неделя (3 недели после первичной иммунизации)	~1:200	~1:200	<1:100	<1:100	~1:200	~1:200
Антисыворотка 7 неделя (1 неделя после 1 буста)	1:1600	1:4000	1:250	1:500	1:250	1:1500
Антисыворотка 10 неделя (1 неделя после 2 буста)	1:1100	1:1900	1:250	1:500	1:800	1:1200
Антисыворотка 18 неделя (1 неделя после 4 буста)	1:1600	1:4000	1:1300	1:1200	1:1400	1:1600
	Среднее из 6 повторностей наилучшей сыворотки от кролика 2-3 (стандартный образец из первого исследования) EC₅₀ = 1:1700					

Наиболее высокие дозы во втором исследовании на кроликах (50/20 мкг против

10 мкг) не улучшали титры IgG.

Двухмесячная пауза приводила к подъему ответа IgG (не наблюдавшемуся при более коротких интервалах).

Квасцы усиливали ответ IgG у кроликов по сравнению с QS21 или отсутствием адьюванта.

Для измерения функциональной иммуногенности гликоконъюгатов O-антигена провели анализ опсонофагоцитарной активности (OPA) с комплементом крольчонка (BRC) и клетками HL60 в качестве источника нейтрофилов. *E. coli* GAR2831 из банка ранее замороженных клеток выращивали в среде Лурия (LB) при 37°C. Клетки осаждали и ресуспендировали до концентрации 1 единица OD₆₀₀ в PBS с добавлением 20% глицерина и замораживали. Предварительно оттитрованные размороженные бактерии разводили до 0,5X 10⁵ КОЕ/мл в HBSS (сбалансированный солевой раствор Хенка) с 1% желатина) и 10 μл (10³ КОЕ) объединяли в 20 μл последовательно разведенной сыворотки в круглодонных микропланшетах для клеточных культур и встряхивали смесь при 700 об/мин, шейкер BELLSO) в течение 30 мин при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂. 10 μл 2,5% комплемента (сыворотка крольчонка, PEL-FREEZ 31061–3, предварительно разведенная в HBG) и 20 μл клеток HL-60 (0,75X 10⁷ /мл) и 40 μл HBG добавляли в круглодонные микропланшеты для клеточных культур и встряхивали смесь при 700 об/мин, шейкер BELLSO) в течение 45 мин при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂. Затем 10 μл каждой из реакционных смесей объемом 100μл переносили в соответствующие лунки предварительно смоченного планшета для фильтрования MILLIPORE MULTISCREENHTS HV, подготовленного путем нанесения 100 μл воды, фильтровали под вакуумом и наносили 150 μл 50% LB. Планшет для фильтрования подвергали фильтрованию под вакуумом и инкубировали в течение ночи при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂. На следующие сутки после фиксации, окрашивания COOMASSIE и удаления красителя при помощи раствора Destain подсчитывали колонии с применением анализатора IMMUNOSPOT® и программного обеспечения IMMUNOCAPTURE. Для установления специфичности OPA активности иммунные сыворотки предварительно инкубировали с 100 μг/мл очищенного длинного O-антигена O25b перед объединением с другими аналитическими компонентами реакции OPA. Анализ OPA включает контрольные реакции без клеток HL60 или комплемента для демонстрации возможного цитолиза, обусловленного этими компонентами.

В анализе исследовали соответствующие пары образцов сыворотки

репрезентативных кроликов до иммунизации и после вакцинации из обоих исследований на кроликах и определяли титры (разведения) сыворотки (Таблица 16, Фиг. 26А-26В). Предварительная инкубация с неконъюгированным длинным полисахаридным О-антигеном O25b блокировала бактерицидную активность, демонстрируя специфичность ОРА (Фиг. 19С). Таблица 16. Титры ОРА

Кролик 2-3 получал следующие введения: Введение кролику 2-3: 10/10/10/10 мкг RAC-конъюгата + QS21, забор крови после введения (PD) 4. Кролик 1-2 получал следующие введения: 50/20/20/20 мкг RAC-конъюгата + Al(OH)₃, забор крови PD4.

Таблица 1	
Образец	Титр
Кролик 2-3 сыворотка до иммунизации	537
Кролик 2-3 сыворотка 13 недели (терминальный забор крови)	13686
Кролик 1-2 сыворотка до иммунизации	<200
Кролик 1-2 сыворотка 19 недели (терминальный забор крови)	22768

ПРИМЕР 16. Уровни IgG к О-антигену O25b, индуцированные неконъюгированным длинным полисахаридным О-антигеном O25b и полученным с применением RAC/DMSO гликоконъюгатом длинного О-антигена O25b

Группы по 10 мышей CD-1 получали подкожную инъекцию гликоконъюгата длинного О-антигена O25b RAC/DMSO по 0,2 или 2,0 мкг/животное в 0, 5 и 13 недели, забор крови осуществляли на 3 неделе (после 1 введения, PD1), 6 неделе (после 2 введения, PD2) и 13 неделе (после 3 введения, PD3) для исследования иммуногенности. Уровни антиген-специфических IgG определяли в количественном анализе Lumindex (подробности описаны в Примере 15) с O25b-специфическим мышинным mAb в качестве внутреннего стандарта. Исходные уровни IgG (пунктирная линия) определяли в пулированной сыворотке от 20 случайно выбранных невакцинированных мышей. Свободный неконъюгированный иммуноген, представляющий собой длинный полисахаридный О-антиген O25b, не приводил к повышению уровней IgG выше исходных ни в одной временной точке. Напротив, после двух доз гликоконъюгата длинного конъюгата O25b-CRM197 RAC наблюдался ответ IgG: устойчивые однотипные ответы IgG наблюдались в точке PD3, промежуточные и более переменные уровни IgG - в точке PD2. Указаны среднегеометрические значения титров (GMT) IgG (нг/мл) с 95% доверительным интервалом (CI) в качестве планки

погрешностей. См. Фиг. 27А-27С.

Пример 17. Специфичность ОРА (опсонофагоцитарной активности) O25b в анализе с компонентом крольчонка (BRC)

А-В) Сыворотка кроликов 2-3 и 1-2 после иммунизации длинным О-антигеном O25b RAC/DMSO (но не соответствующая контрольная сыворотка до иммунизации) демонстрировала бактерицидную активность в тесте ОРА. С) ОРА активность иммунной сыворотки кролика 1-2 блокировалась предварительной инкубацией с 100 мкг/мл длинного полисахаридного О-антигена O25b. Бактерии штамма GAR2831 инкубировали с HL60s, 2,5% BRC и последовательными разведениями сыворотки в течение 1 ч при 37°C и определяли число выживших бактерий путем подсчета микроколоний (КОЕ) на планшетах для фильтрования. См. Фиг. 26А-26С.

Пример 18. Длинные RAC и eTEC гликоконъюгаты O25b более иммуногенны, чем присоединенные одним концом гликоконъюгаты

Исследование ОРА с BRC с устойчивым к карбапенему и устойчивым к фторхинолону штаммом MDR Atlas187913. Группы по 20 мышей CD-1 вакцинировали 2 мкг гликоконъюгата согласно той же схеме, которая показана на Фиг. 28А-28В, и определяли ОРА ответы после 2 введения (PD2) (Фиг. 28А) и после 3 введения (PD3) (Фиг. 28В). Столбики обозначают GMT с 95% ДИ. Указана частота ответа, превышавшего исходные уровни до вакцинации. Для определения, являются ли различия статистически значимыми, оценивали данные в различных группах после лог-трансформации с применением непарного t-критерия с поправкой Уэлча (Graphpad Prism). Результаты обобщены в Таблице 17. См. Фиг. 28А-28В. Как показано в Таблице 17, у мышей, вакцинированных 2 мкг длинных eTEC гликоконъюгатов O1a, наблюдавшиеся титры ОРА против O1a в точках PD2 и PD3 (данные не представлены) превышали титры ОРА против O25b в точках PD2 и PD3, соответственно.

Таблица 17.

ОПИСАНИЕ	% ответивших (n/N)*	Средний геометрический титр PD2	% ответивших (n/N)*	Средний геометрический титр PD3
Присоединенный одним концом короткий, 2 мкг	45 (9/20)	1,552	85 (17/20)	17,070

Присоединенный одним концом длинный, 2 мкг	30 (6/20)	763	85 (17/20)	10,838
RAC/DMSO длинный, 2 мкг	65 (13/20)	8,297	95 (19/20)	163,210
eTEC (10%) длинный, 2 мкг	90 (18/20)	27,368	100 (19/19)	161,526

ПРИМЕР 19. При использовании eTEC иммуногенность в анализе ОРА может быть улучшена за счет изменения степени активации полисахаридов

Исследование ОРА с BRC с применением устойчивого к карбапенему и устойчивого к фторхинолону штамма MDR Atlas187913. Группы по 20 мышей CD-1 вакцинировали 0,2 мкг или 2 мкг указанного длинного eTEC гликоконъюгата O25b и определяли ОРА ответ во временной точке PD2. Для подтверждения, что различия в ОРА ответах являлись статистически значимыми, оценивали агрегированные данные после лог-трансформации в группах с 4% активацией и 17% активацией с применением непарного t-критерия с поправкой Уэлча (Graphpad Prism). Значения GMT и частоты ответа в отдельных группах обобщены в Таблице 18. См. Фиг. 29.

Таблица 18.

Описание	% ответивших (n/N)	Средний геометрический титр
eTEC длинный 4% активация (0,2 мкг)	35 (7/20)	628
eTEC длинный 4% активация (0,2 мкг)	65 (13/20)	8,185
eTEC длинный 10% активация (0,2 мкг)	45 (9/20)	1,085
eTEC длинный 10% активация (0,2 мкг)	90 (18/20)	27,368
eTEC длинный 17% активация (0,2 мкг)	70 (14/20)	3,734
eTEC длинный 17% активация (0,2 мкг)	80 (16/20)	25,461

ПРИМЕР 20. Провокационное исследование указывает, что eTEC конъюгаты длинного O25b E. coli обеспечивают защиту после трех доз.

Группы по 20 мышей CD-1, иммунизированных в дозе 2 мкг согласно указанной схеме, подвергали внутрибрюшинной (IP) провокации 1×10^9 бактерий штамма GAR2831. Отслеживали последующую выживаемость на протяжении шести суток.

Группы мышей, вакцинированных eТЕС гликоконъюгатами при активации на уровне 4%, 10% или 17%, были защищены от летального исхода после заражения в отличие от невакцинированных контрольных мышей или мышей, вакцинированных 2 мкг неконъюгированного длинного полисахарида O25b. См. Фиг. 30А-30В.

ПРИМЕР 21. Способ получения eТЕС-связанных гликоконъюгатов

Активация сахара и тиолирование цистамина дигидрохлоридом. Сахарид растворяли в безводном диметилсульфоксиде (DMSO). Содержание воды в растворе определяли по методу Карла Фишера (KF) и доводили содержание воды до 0,1 и 1,0%, как правило, 0,5%.

Для запуска активации готовили свежий раствор 1,1'-карбонил-ди-1,2,4-триазола (CDT) или 1,1'-карбонилдиимидазола (CDI) с концентрацией 100 мг/мл в DMSO. Сахарид активировали различными количествами CDT/CDI (1 – 10 молярных эквивалентов) и проводили реакцию в течение 1 - 5 часов при комнатной температуре или 35°C. Добавляли воду для нейтрализации остатка CDI/CDT в активирующем реакционном растворе. Выполняли расчеты для определения добавленного количества воды и доведения общего итогового содержания воды до 2-3%. Проводили реакцию в течение 0,5 ч при комнатной температуре. Готовили свежий цистамина дигидрохлорид в безводном DMSO в концентрации 50 мг/мл. Проводили реакцию активированного сахара с 1-2 молярными эквивалентами цистамина дигидрохлорида. В альтернативном варианте проводили реакцию активированного сахара с 1-2 молярными эквивалентами цистеамина гидрохлорида. Реакция тиолирования протекала в течение 5-20 часов при комнатной температуре с образованием тиолированного сахара. Степень тиолирования определяли по добавленному количеству CDT/CDI.

Восстановление и очистка активированного тиолированного сахара. К реакционной смеси тиолированного сахара добавляли раствор трис(2-карбокситил)фосфина (ТСЕР), 3-6 молярных эквивалентов и проводили реакцию в течение 3-5 часов при комнатной температуре. Затем реакционную смесь разводили в 5-10 раз путем добавления предварительно охлажденного 10 мМ одноосновного фосфата натрия и фильтровали через фильтр с размером пор 5 мкм. Осуществляли диафльтрацию тиолированного сахара против 30-40 диаобъемов предварительно охлажденного 10 мМ одноосновного фосфата натрия. Брали аликвоту ретентата активированного тиолированного сахара для определения концентрации сахара и содержания тиолов (методом Элмана).

Активация и очистка бромацетилированного белка-носителя. Свободные аминокруппы белка-носителя подвергали бромацетилированию в реакции с бромацетилирующим реагентом, таким как N-гидроксисукцинимидный эфир бромоексусной кислоты (BAANS), бромацетилбромид или другой подходящий реагент.

Перед активацией белок-носитель (в 0,1 М фосфате натрия, pH $8,0 \pm 0,2$) вначале находился при 8 ± 3 °С, при pH приблизительно 7. К раствору белка добавляли N-гидроксисукцинимидный эфир бромоексусной кислоты (BAANS) в виде маточного раствора в диметилсульфоксиде (DMSO) (20 мг/мл) в соотношении 0,25 – 0,5 BAANS : белок (масс./масс.). Реакционную смесь осторожно перемешивали при 5 ± 3 °С в течение 30-60 минут. Полученный бромацетилированный (активированный) белок очищали, например, ультрафильтрацией/диафильтрацией с использованием мембраны с MWCO 10 кДа и 10 мМ фосфатного буфера (pH 7,0). После очистки бромацетилированного белка-носителя определяли концентрацию белка методом Лоури.

Степень активации устанавливали посредством определения общего бромида при помощи ионообменной хроматографии в сочетании с кондуктометрическим детектированием с подавлением фоновой электропроводности (ионная хроматография). Связанный бромид на активированном бромацетилированном белке отщеплялся от белка при подготовке образца для исследования и количественно определялся наряду с любым возможно присутствующим свободным бромидом. Любой оставшийся на белке ковалентно связанный бромид высвобождался превращением в бромид-ион при нагревании образца в основном 2-меркаптоэтаноле.

Активация и очистка бромацетилированного CRM₁₉₇. CRM₁₉₇ разводили до 5 мг/мл при помощи 10 мМ забуференного фосфатом 0,9% NaCl pH 7 (PBS) и затем готовили 0,1 М NaHCO₃ pH 7,0, используя 1 М маточный раствор. Добавляли BAANS при соотношении CRM₁₉₇ : BAANS = 1 : 0,35 (мас.:мас.), используя маточный раствор BAANS 20 мг/мл в DMSO. Реакционную смесь инкубировали при приблизительно 3°C - 11°C в течение 30 мин - 1 часа, затем очищали посредством ультрафильтрации/диафильтрации с применением мембраны с MWCO 10K и 10 мМ фосфата натрия/0,9% NaCl, pH 7,0. Очищенный активированный CRM₁₉₇ анализировали методом Лоури для определения концентрации белка и затем разводили PBS до 5 мг/мл. Добавляли сахарозу до 5% мас./об. в качестве криозащитного вещества и замораживали

активированный белок и хранили при $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ до использования в конъюгирования.

Бромоацетилирование остатков лизина CRM₁₉₇ было очень воспроизводимым, обеспечивая активацию от 15 до 25 лизинов из доступных 39 лизинов. Реакция обеспечивала высокий выход активированного белка.

Конъюгирование активированного тиолированного сахара с бромоацетилированным белком-носителем. Затем добавляли бромоацетилированный белок-носитель и активированный тиолированный сахарид. Соотношение подаваемых сахара и белка составляло $0,8 \pm 0,2$. Доводили pH реакционной смеси до $9,0 \pm 0,1$ при помощи 1 М NaOH. Реакцию конъюгирования проводили при 5°C в течение 20 ± 4 часов.

Кэпирование оставшихся реакционноспособных функциональных групп. Непрореагировавшие бромоацетилированные остатки на белке-носителе гасили путем реакции с 2 молярными эквивалентами N-ацетил-L-цистеина как кэпирующего реагента в течение 3 - 5 часов при $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Оставшиеся свободные сульфгидрильные группы кэпировали 4 молярными эквивалентами иодоацетамида (IAA) в течение 20 - 24 часов при 5°C .

Очистка eTЭС-связанного гликоконъюгата. После реакции конъюгирования (после кэпирования IAA) смесь фильтровали через фильтр 0,45 мкм. Ультрафильтрацию/диафильтрацию гликоконъюгата осуществляли против 5 мМ сукцината - 0,9% физиологического раствора, pH 6,0. Ретентат гликоконъюгата затем фильтровали через фильтр 0,2 мкм. Отбирали аликвоту гликоконъюгата для анализа. Оставшийся гликоконъюгат хранили при $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. См. Таблица 2, Таблица 3, Таблица 4, Таблица 5 и Таблица 6.

Пример 22: ПОЛУЧЕНИЕ ETЭС КОНЪЮГАТОВ *E. COLI-O25B*

Процесс активации: активация липополисахарида *E. coli-O25b* Лиофилизированный полисахарид *E. coli-O25b* растворяли в безводном диметилсульфоксиде (DMSO). Содержание воды в растворе лиофилизованного O25b в DMSO определяли по методу Карла Фишера (KF). Содержание воды доводили путем добавления воды для инъекций WFI к раствору O25b/DMSO до достижения содержания воды 0,5%.

Для запуска активации готовили свежий раствор 1,1'-карбонилдиимидазола (CDI) с концентрацией 100 мг/мл в DMSO. Перед стадией тиолирования полисахарид *E. coli-O25b* активировали различными количествами CDI. Активацию CDI осуществляли при комнатной температуре или 35°C в течение 1-3 часов. Добавляли воду для гашения

остатка CDI в активирующем реакционном растворе. Выполняли расчеты для определения добавляемого количества воды и доведения общего итогового содержания воды до 2-3%. Проводили реакцию в течение 0,5 ч при комнатной температуре.

Тиолирование активированного полисахарида *E. coli-O25b* Готовили свежий цистамин-дигидрохлорид в безводном DMSO и добавляли 1-2 молярных эквивалента цистамина дигидрохлорида к реакционному раствору с активированным полисахаридом. Проводили реакцию в течение 20 ± 4 ч при комнатной температуре.

Восстановление и очистка активированного тиолированного полисахарида *E. coli-O25b*. К реакционной смеси тиолированного сахара добавляли раствор трис(2-карбок시에тил)фосфина (ТСЕР), 3-6 молярных эквивалентов и проводили реакцию в течение 3-5 часов при комнатной температуре. Затем реакционную смесь разводили в 5-10 раз путем добавления предварительно охлажденного 10 мМ одноосновного фосфата натрия и фильтровали через фильтр с размером пор 5 мкм. Осуществляли диафальтрацию тиолированного сахара против 40 диаобъемов предварительно охлажденного 10 мМ одноосновного фосфата натрия с использованием мембранных кассет для ультрафильтрации с MWCO 5K. Ретентат тиолированного полисахарида O25b отбирали для определения концентрации сахара и определения тиолов (метод Элмана). Технологическая схема процесса активации представлена на **Фиг. 32А**).

Процесс конъюгирования - конъюгирование тиолированного полисахарида *E. coli-O25b* с бромоацетилированным CRM₁₉₇. Белок-носитель CRM₁₉₇ активировали отдельно путем бромоацетилирования, как описано в Примере 21, а затем проводили реакцию с активированным полисахаридом *E. coli-O25b* для реакции конъюгирования. Бромоацетилированный CRM₁₉₇ и тиолированный полисахарид O25b смешивали вместе в реакционном сосуде. Соотношение подаваемых сахара и белка составляло $0,8 \pm 0,2$. Доводили pH реакционной смеси до 8,0 – 10,0. Реакцию конъюгирования проводили при 5°C в течение 20 ± 4 часов.

Кэпирование реакционноспособных групп на бромоацетилированном CRM₁₉₇ и тиолированном полисахариде *E. coli-O25b*. Непрореагировавшие бромоацетилированные остатки на белках CRM₁₉₇ кэпировали путем реакции с 2 молярными эквивалентами N-ацетил-L-цистеина в течение 3 - 5 часов при 5°C, после чего кэпировали какие-либо оставшиеся свободные сульфгидрильные группы тиолированного полисахарида O25b 4 молярными эквивалентами иодоацетамида (ИАА) в течение 20 - 24 часов при 5°C.

Очистка eTEC-связанного гликоконъюгата *E. coli*-O25b. После конъюгирования раствор фильтровали через фильтр 0,45 мкм или 5 мкм. Осуществляли диафильтрацию гликоконъюгата O25b с применением мембранных кассет для ультрафильтрации с MWCO 100К. Диафильтрацию осуществляли против 5 мМ сукцината - 0,9% физиологического раствора, pH 6,0. Затем 100К ретентат гликоконъюгата *E. coli*-O25b фильтровали через фильтр 0,22 мкм и хранили при 5°C.

Технологическая схема процесса конъюгирования представлена на Фиг. 32В.

Результаты

Параметры реакции и данные, характеризующие несколько партий eTEC-гликоконъюгатов *E. coli*-O25b, показаны в Таблице 19. Активация CDI-тиолирование цистамина дигидрохлоридом приводили к получению гликоконъюгатов сахаридов с выходом от 41 до 92% и свободных сахаридов от менее 5 до 14%. См. также Таблица 2, Таблица 3, Таблица 4, Таблица 5 и Таблица 6.

Таблица 19. Экспериментальные параметры и данные, характеризующие eTEC конъюгаты *E. coli*-O25b

Партия конъюгата	O25b-1A	O25b-2B	O25b-3C	O25b-4D	O25b-5E	O25b-6F
Уровень активации (моль тиолов/моль полисахарида), %	10	20	22	17	25	24
Соотношение подаваемых сахара/белка	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Выход сахара (%)	56	57	79	92	41	59
Соотношение сахарид/белок на выходе	0,88	1	1,18	1,32	2,9	1,4
Свободный сахарид, %	8	<5	6	5	14	5
Свободный белок, %	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Мол. масса конъюгата, кДа	1057	4124	2259	2306	1825	1537
Общий СМСА	3	нд	нд	7,2	нд	нд

ПРИМЕР 23. Процедура получения eТЕС конъюгатов полисахаридного O-антигена *E. coli* -CRM197 (применявшаяся к O-антигенам *E. coli* серотипов O25b, O1a, O2 и O6)

Активация полисахарида

O-антигенный полисахарид *E. coli* растворяли в безводном диметилсульфоксиде (DMSO). Для запуска активации к раствору полисахарида добавляли различные количества 1,1'-карбонилдиимидазола (CDI) (1 – 10 молярных эквивалентов) и проводили реакцию в течение 1 - 5 часов при комнатной температуре или 35°C. Затем добавляли воду (2-3%, об./об.) для гашения возможного остатка CDI в активирующем реакционном растворе. Затем проводили реакцию в течение 0,5 ч при комнатной температуре, добавляли 1-2 молярных эквивалента цистамина дигидрохлорида. Проводили реакцию в течение 5-20 часов при комнатной температуре и затем обрабатывали 3-6 молярными эквивалентами трис(2-карбоксиэтил)фосфина (ТСЕР) с получением тиолированного сахара. Степень тиолирования определяли по количеству добавленного CDI.

Затем реакционную смесь разводили в 5-10 раз путем добавления предварительно охлажденного 10 мМ одноосновного фосфата натрия и фильтровали через фильтр с размером пор 5 мкм. Осуществляли диафильтрацию тиолированного сахара против 30-40 диаобъемов предварительно охлажденного 10 мМ одноосновного фосфата натрия. Брали аликвоту ретентата активированного тиолированного сахара для определения концентрации сахара и содержания тиолов (методом Элмана).

Активация белка-носителя (CRM197)

CRM197 (в 0,1 М фосфате натрия, pH 8,0 ± 0,2) вначале держали при 8 ± 3 °С, приблизительно при pH 8 до активации. К раствору белка добавляли N-гидроксисукцинимидный эфир бромоуксусной кислоты (BAANS) в виде маточного раствора в диметилсульфоксиде (DMSO) (20 мг/мл) в соотношении 0,25 – 0,5 BAANS : белок (масс./масс.). Реакционную смесь осторожно перемешивали при 5 ± 3 °С в течение 30-60 минут. Полученный бромоацетилованный (активированный) белок очищали, например, ультрафильтрацией/диафильтрацией с использованием мембраны с MWCO 10 кДа и 10 мМ фосфатного буфера (pH 7,0). После очистки бромоацетилованного белка-носителя определяли концентрацию белка методом Лоури.

Конъюгирование

Активированный CRM₁₉₇ и активированный О-антигенный полисахарид *E. coli* последовательно добавляли в реактор и смешивали. Соотношение подаваемых сахара и белка составляло $1 \pm 0,2$. Доводили pH реакционной смеси до $9,0 \pm 0,1$ при помощи 1 М NaOH. Реакцию конъюгирования проводили при 5°C в течение 20 ± 4 часов. Непрореагировавшие бромоацетилированные остатки на белке-носителе гасили путем реакции с 2 молярными эквивалентами N-ацетил-L-цистеина в качестве кэпирующего реагента в течение 3 - 5 часов при 5 °С. Оставшиеся свободные сульфгидрильные группы кэпировали 4 молярными эквивалентами иодоацетамида (IAA) в течение 20 - 24 часов при 5°C. Затем реакционную смесь очищали при помощи ультрафильтрации/диафильтрации, которую проводили против 5 мМ сукцината - 0,9% физиологического раствора, pH 6,0. Затем очищенный конъюгат фильтровали через фильтр 0,2 мкм. См. Таблица 2, Таблица 3 Таблица 4, Таблица 5 и Таблица 6.

Пример 24. Общая процедура конъюгирования О-антигенного полисахарида (из *E. coli* серотипов O1, O2, O6, 25b) посредством восстановительного аминирования (RAC).

Конъюгирование в диметилсульфоксиде (RAC/DMSO)

Активация полисахарида

Окисление полисахарида проводили в 100 мМ натрий-фосфатном буфере (pH $6,0 \pm 0,2$), последовательно добавляя расчетное количество 500 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 6,0) и воды для инъекций (WFI) с получением итоговой концентрации полисахарида 2,0 г/л. При необходимости pH реакции доводили до приблизительно pH 6,0. После доведения pH температуру реакции доводили до 4°C. Окисление запускали добавлением приблизительно 0,09-0,13 молярных эквивалентов периодата натрия. Реакцию окисления проводили при $5 \pm 3^\circ\text{C}$ в течение приблизительно 20 ± 4 часов.

Концентрирование и диафильтрацию активированного полисахарида выполняли с использованием кассет для ультрафильтрации с MWCO 5K. Диафильтрацию проводили против 20-кратных диаобъемов WFI. Затем очищенный активированный полисахарид хранили при $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Очищенный активированный сахарид характеризуется, в частности, (i) концентрацией сахара по результатам колориметрического определения; (ii) концентрацией альдегида по результатам колориметрического определения; (iii) степенью окисления и (iv) молекулярной массой по результатам SEC-MALLS.

Компаундирование активированного полисахарида с эксципиентом

сахарозой и лиофилизация

Компаундировали активированный полисахарид с сахарозой в соотношении 25 граммов сахарозы на грамм активированного полисахарида. Затем флакон с составленной смесью лиофилизировали. После лиофилизации флаконы, содержащие лиофилизированный активированный полисахарид, хранили при $-20 \pm 5^\circ\text{C}$. Отдельно проводили тонкослойное замораживание во вращающемся сосуде и лиофилизацию расчетного количества белка CRM₁₉₇. Лيوфилизированный CRM₁₉₇ хранили при $-20 \pm 5^\circ\text{C}$.

Разведение лиофилизированного активированного полисахарида и белка-носителя

Лيوфилизированный активированный полисахарид разводили безводным диметилсульфоксидом (DMSO). После полного растворения полисахарида к лиофилизированному CRM₁₉₇ добавляли равное количество безводного DMSO для разведения.

Конъюгирование и кэпирование

Перед запуском конъюгирования с использованием цианоборогидрида натрия, разведенный активированный полисахарид объединяли с разведенным CRM₁₉₇ в реакционном сосуде и затем тщательно перемешивали для получения прозрачного раствора. Итоговая концентрация полисахарида в реакционном растворе составляла приблизительно 1 г/л. Конъюгирование запускали путем добавления к реакционной смеси 0,5-2,0 МЭкв цианоборогидрида натрия и инкубировали при $23 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 20-48 ч. Реакцию конъюгирования останавливали добавлением 2 МЭкв борогидрида натрия (NaBH₄) для кэпирования непрореагировавших альдегидов. Указанная реакция кэпирования продолжалась при $23 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 3 ± 1 ч.

Очистка конъюгата

При подготовке к очистке фильтрацией в тангенциально-поточном режиме с использованием мембран с MWCO 100-300 К раствор конъюгата разводили 1:10 охлажденным 5 мМ сукцинатом - 0,9% физиологическим раствором (pH 6,0). Разведенный раствор конъюгата пропускали через 5 мкм фильтр и проводили диафильтрацию с использованием в качестве среды 5 мМ сукцината / 0,9% физиологического раствора (pH 6,0). После завершения диафильтрации ретентат конъюгата пропускали через фильтр 0,22 мкм. Затем конъюгат разводили 5 мМ сукцинатом / 0,9% физиологическим раствором (pH 6) до целевой концентрации

сахарида приблизительно 0,5 мг/мл. В альтернативном варианте конъюгат очищали с использованием 20 мМ гистидина - 0,9% физиологического раствора (рН 6,5) при помощи тангенциальной поточной фильтрации с использованием мембран с MWCO 100-300 К. Получение иммуногенного конъюгата завершалось последней стадией фильтрования через мембрану с размером пор 0,22 мкм. См. Таблица 2, Таблица 3 Таблица 4, Таблица 5 и Таблица 6.

Пример 25. Конъюгирование в водном буфере (RAC/водный), применявшееся к *E. coli* серотипов O25B, O1A, O2 и O6

Активацию и диафильтрацию полисахаридов осуществляли таким же образом, как и в случае конъюгирования на основе DMSO.

Прошедший фильтрацию активированный сахарид компаундировали с CRM₁₉₇ в массовом соотношении полисахарида к белку, варьирующем от 0,4 до 2 масс./масс. в зависимости от серотипа. Подаваемое соотношение выбирали для контролирования соотношения полисахарида к CRM₁₉₇ в полученном конъюгате.

Затем составленную смесь лиофилизировали. После конъюгирования смесь полисахарида и белка растворяли в 0,1 М натрий-фосфатном буфере при концентрации полисахарида, варьирующей от 5 до 25 г/л, в зависимости от серотипа, доводили рН до 6,0-8,0 в зависимости от серотипа. Конъюгирование запускали путем добавления к реакционной смеси 0,5-2,0 МЭкв цианоборогидрида натрия и инкубировали при 23 ± 2 °С в течение 20-48 ч. Реакцию конъюгирования останавливали добавлением 1-2 МЭкв борогидрида натрия (NaBH₄) для блокирования непрореагировавших альдегидов.

В альтернативном варианте прошедший фильтрацию активированный сахарид и расчетное количество белка CRM₁₉₇ по-отдельности подвергали тонкослойному замораживанию и лиофилизации, а затем объединяли после растворения в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, после чего могли осуществлять последующее конъюгирование, как описано выше.

В Таблице 20 обобщены результаты по обоим конъюгатам, приготовленным в DMSO и водном буфере

	RAC/DMSO	RAC/водный
Мол. масса полисахарида (кДа)	48К	46К
Степень окисления (DO)	12	12
Соотношение сахарид/белок	0,8	1,0

% свободного сахара	<5%	32%
Мол. масса конъюгата по данным SEC-MALLS, кДа	7950	260

Пример 26: Процедура получения присоединенных одним концом конъюгатов полисахаридного О-антигена *E. coli* с CRM₁₉₇

Липополисахариды (LPS), которые являются обычными компонентами внешней мембраны грамотрицательных бактерий, содержат липид А, коровую область и О-антиген (также обозначаемый О-специфическим полисахаридом или О-полисахаридом). Повторяющиеся звенья О-антигена различных серотипов различаются по своему составу, структуре и реологическим свойствам. О-антиген, использованный в данном изобретении, присоединен к коровому домену, который содержит на конце своей цепи звено сахара, обозначаемое 2-кето-3-дозоксиоктановой кислотой (KDO). В отличие от некоторых способов конъюгирования, основанных на случайной активации полисахаридной цепи (например, активации периодатом натрия или карбодиимидом), в данном изобретении раскрыт процесс конъюгирования, включающий избирательную активацию KDO линкером, представляющим собой дисульфидамин, после демаскировки тиоловой функциональной группы, которую затем конъюгируют с активированным бромом белком CRM₁₉₇, как показано на **ФИГ. 31** (получение присоединенных одним концом конъюгатов).

Конъюгирование на основе цистаминного линкера (A1)

О-антигенный полисахарид и цистамин (50-250 мол. экв. KDO) смешивали в фосфатном буфере, доводили pH до 6,0-7,0. К смеси добавляли цианоборогидрид натрия (NaCNBH₃) (5-30 мол. экв. KDO) и перемешивали смесь при 37°C в течение 48-72 ч. После охлаждения до комнатной температуры и разведения равным объемом фосфатного буфера смесь обрабатывали трис(2-карбок시에тил)фосфином (TCEP) (1,2 мол. экв. добавленного цистамина). Затем смесь очищали путем диафильтрации с применением мембраны с MWCO 5 кДа против 10 мМ раствора одноосновного фосфата натрия, завершающей получение тиол-содержащего О-антигенного полисахарида. Содержание тиолов можно определять методом Элмана.

Затем переходили к конъюгированию путем смешивания вышеупомянутого активированного тиолом О-антигенного полисахарида с активированным бромом белком CRM₁₉₇ в соотношении 0,5-2,0. Доводили pH реакционной смеси до 8,0-10,0 при

помощи 1 М раствора NaOH. Реакцию конъюгирования проводили при 5°C в течение 24 ± 4 часов. Непрореагировавшие остатки брома на белке-носителе гасили путем реакции с 2 молярными эквивалентами N-ацетил-L-цистеина в течение 3 - 5 часов при 5°C. Затем следовало добавление 3 молярных эквивалентов иодоацетамида (по отношению к добавленному N-ацетил-L-цистеину) для блокирования оставшихся свободных сульфгидрильных групп. Реакцию кэпирования проводили в течение следующих 3-5 часов при 5°C и на обеих стадиях кэпирования поддерживали pH 8,0-10,0 путем добавления 1 М NaOH. Полученный конъюгат подвергали ультрафильтрации/диафильтрации с применением мембраны с MWCO 30 кДа против 5 мМ сукцината - 0,9% физиологического раствора, pH 6,0. См. Таблица 2, Таблица 3, Таблица 4, Таблица 5 и Таблица 6.

Пример 27: Конъюгирование на основе линкера, представляющего собой 3,3'-дифторо бис(пропановый дигидразид) (A4)

O-антигенный полисахарид и 3,3'-дифторо бис(пропановый дигидразид) (5-50 мол. экв. KDO) смешивали в ацетатном буфере, доводили pH до 4,5-5,5. К смеси добавляли цианоборогидрид натрия (NaCNBH₃) (5-30 мол. экв. KDO) и перемешивали смесь при 23-37°C в течение 24-72 ч. Затем смесь обрабатывали трис(2-карбокsetил)фосфином (TCEP) (1,2 мол. экв. добавленного линкера 3,3'-дифторо бис(пропановый дигидразид)). Затем смесь очищали путем диафильтрации с применением мембраны с MWCO 5 кДа против 10 мМ раствора одноосновного фосфата натрия, завершающей получение тиол-содержащего O-антигенного полисахарида. Содержание тиолов можно определять методом Элмана.

Затем переходили к конъюгированию путем смешивания вышеупомянутого активированного тиолом O-антигенного полисахарида с активированным бромом белком CRM₁₉₇ в соотношении 0,5-2,0. Доводили pH реакционной смеси до 8,0-10,0 при помощи 1 М раствора NaOH. Реакцию конъюгирования проводили при 5°C в течение 24 ± 4 часов. Непрореагировавшие остатки брома на белке-носителе гасили путем реакции с 2 молярными эквивалентами N-ацетил-L-цистеина в течение 3 - 5 часов при 5°C. Затем следовало добавление 3 молярных эквивалентов иодоацетамида (по отношению к добавленному N-ацетил-L-цистеину) для блокирования оставшихся свободных сульфгидрильных групп. Реакцию кэпирования проводили в течение следующих 3-5 часов при 5°C и на обеих стадиях кэпирования поддерживали pH 8,0-10,0 путем добавления 1 М NaOH. Полученный конъюгат подвергали

ультрафильтрации/диафильтрации с применением мембраны с MWCO 30 кДа против 5 mM сукцината - 0,9% физиологического раствора, pH 6,0.

Пример 28: Конъюгирование на основе линкера 2,2'-дитио-N,N'-бис(этан-2,1-диил)бис(2-(аминоокси)ацетамид) (A6)

O-антигенный полисахарид и 2,2'-дитио-N,N'-бис(этан-2,1-диил)бис(2-(аминоокси)ацетамид) (5-50 мол. экв. KDO) смешивали в ацетатном буфере, доводили pH до 4,5-5,5. Затем смесь перемешивали при 23-37°C в течение 24-72 ч, после чего добавляли цианоборогидрид натрия (NaCNBH₃) (5-30 мол. экв. KDO) и перемешивали смесь еще в течение 3-24 ч. Затем смесь обрабатывали трис(2-карбоксиэтил)фосфином (ТСЕР) (1,2 мол. экв. добавленного линкера). Затем смесь очищали путем диафильтрации с применением мембраны с MWCO 5 кДа против 10 mM раствора одноосновного фосфата натрия, завершающей получение тиол-содержащего O-антигенного полисахарида. Содержание тиолов можно определять методом Элмана.

Затем переходили к конъюгированию путем смешивания вышеупомянутого активированного тиолом O-антигенного полисахарида с активированным бромом белком CRM₁₉₇ в соотношении 0,5-2,0. Доводили pH реакционной смеси до 8,0-10,0 при помощи 1 M раствора NaOH. Реакцию конъюгирования проводили при 5°C в течение 24 ± 4 часов. Непрореагировавшие остатки брома на белке-носителе гасили путем реакции с 2 молярными эквивалентами N-ацетил-L-цистеина в течение 3 - 5 часов при 5°C. Затем следовало добавление 3 молярных эквивалентов иодоацетамида (по отношению к добавленному N-ацетил-L-цистеину) для блокирования оставшихся свободных сульфгидрильных групп. Реакцию кэпирования проводили в течение следующих 3-5 часов при 5°C и на обеих стадиях кэпирования поддерживали pH 8,0-10,0 путем добавления 1 M NaOH. Полученный конъюгат подвергали ультрафильтрации/диафильтрации с применением мембраны с MWCO 30 кДа против 5 mM сукцината - 0,9% физиологического раствора, pH 6,0.

Пример 29: Получение активированного бромом CRM₁₉₇

Получали CRM₁₉₇ в 0,1M растворе фосфата натрия, pH 8,0 ± 0,2 и охлаждали до 5 ± 3 °C. К раствору белка добавляли N-гидроксисукцинимидный эфир бромоексусной кислоты (BAANS) в виде маточного раствора в диметилсульфоксиде (DMSO) (20 мг/мл) в соотношении 0,25 – 0,5 BAANS : белок (масс./масс.). Реакционную смесь осторожно перемешивали при 5 ± 3 °C в течение 30-60 минут. Полученный бромоацетилованный

(активированный) белок очищали, например, ультрафильтрацией/диафильтрацией с использованием мембраны с MWCO 10 кДа и 10 мМ фосфатного буфера (pH 7,0). После очистки бромоацетилированного белка-носителя оценивали концентрацию белка методом Лоури.

Таблица 2: Конъюгаты O1a

№ лота конъюгата	132240-112-2	132242-106	132242-124	132242-127	132242-130
№ лота полисахарида	709756-160	709756-160	709756-160	710958-116	710958-116
Тип полисахарида	Длинная цепь			Короткая цепь	
Мол.масса полисахарида (кДа)	33	33	33	11	11
Вариант	eTEC	Присоединенный одним концом	RAC/DMSO	Присоединенный одним концом	RAC/DMSO
Активация	8% SH	2,1% SH	DO: 13	6,4% SH	DO: 16
Данные по конъюгату					
Выход (%)	30	26	77	45	35
Соотношение сахарид/белок	0,6	0,5	1,0	0,7	0,6
Свободный сахарид (%)	9	9	20	5	6
Мол. масса (кДа)	1035	331	1284	280	2266
Конц. сахараида (мг/мл)	0,31	0,37	0,58	0,59	0,37
Эндотоксин (ед.эндот./мкг)	0,03	0,02	0,01	0,01	0,01
Буфер	5 мМ сукцинат/солевой раствор, pH 6,0				

Таблица 3 Конъюгаты O2

№ лота конъюгата	00709749-0003-1	132242-161	132242-152	132242-159	132242-157
------------------	-----------------	------------	------------	------------	------------

№ лота полисахарида	709766-33	709766-65		710958-141-2	
Тип полисахарида	Длинная цепь			Короткая цепь	
Мол.масса полисахарида (кДа)	36	39		14	
Вариант	eTEC	Присоединенный одним концом	RAC/DMSO	Присоединенный одним концом	RAC/DMSO
Активация	6,8% SH	1,6% SH	DO: 17	6,3% SH	DO: 19
Данные по конъюгату					
Выход (%)	26	33	50	38	36
Соотношение сахарид/белок	1,5	0,8	0,8	1,0	0,6
Свободный сахарид (%)	11	24%	<5	<5	6
Мол. масса (кДа)	1161	422	3082	234	1120
Эндотоксин (ед.эндот./мкг)	0,025	0,02	0,01	0,01	0,01
Буфер	5 мМ сукцинат/солевой раствор, pH 6,0				

Таблица 4 Конъюгаты О6

№ лота конъюгата	132240-117-1	132242-134	132242-137	132242-146	132242-145
№ лота полисахарида	710958-121-1			710958-143-3	
Тип полисахарида	Длинная цепь			Короткая цепь	
Мол.масса полисахарида (кДа)	44			15	
Вариант	eTEC	Присоединенный одним концом	RAC/DMSO	Присоединенный одним концом	RAC/DMSO
Активация	18% SH	2,2% SH	DO: 16,5	6,1% SH	DO: 22
Данные по конъюгату					
Выход (%)	27	23	58	48	30
Соотношение сахарид/белок	0,78	0,6	0,82	0,7	0,6

Свободный сахарид (%)	9	4	4	<5	8
Мол. масса (кДа)	1050	340	1910	256	2058
Конц. сахараида (мг/мл)	0,39	0,45	0,59	0,88	0,41
Эндотоксин (ед.эндот./мкг)	0,03	0,02	0,01	0,004	0,005
Буфер	5 мМ сукцинат/солевой раствор, pH 6,0				

Таблица 5 Конъюгаты O25b

№ лота конъюгата	132242-28	132242-98	13224-0-73-1-1	13224-0-62-1	13224-0-81	132242-116	132242-121	132242-27	132242-29
№ лота полисахарида	709766-28	709766-29	70976-6-30	70976-6-30	70976-6-30	710958-117/118	710958-117/118	709766-28	709766-28
Тип полисахарида	Длинная цепь					Короткая цепь		Длинная цепь	Короткая цепь
Мол.масса полисахарида (кДа)	51	48	48	48	48	14	14	51	51
Вариант	RAC/DM SO	Присоединенный одним концом	eTEC	eTEC	eTEC	Присоединенный одним концом	RAC/DM SO	RAC/DM SO	RAC/DM SO
Активация	DO: 18	2,4% SH	10% SH	4% SH	17% SH	6,6% SH	DO: 17	21	12
Conjugate Data									
Выход (%)	82	26	56	32	92	28	18	71	80
Соотношение сахарид/белок	0,9	0,82	0,88	0,64	1,32	0,7	0,36	0,81	0,84
Свободный сахарид (%)	7,2	5	< 5	11	< 5	< 5	< 5	8,3	<5
Мол. масса (кДа)	4415	840	1057	1029	2306	380	9114	3303	7953

Конц. сахара (мг/мл)	0,7	0,4	0,43	0,36	0,9	0,45	0,19	0,6	0,67
Эндотоксин (ед.эндот./мкг)	0,01	0,02	0,08	0,08	0,01	0,01	0,01	0,02	0,22
Конъюгат (DS) Буферный матрикс	5 мМ сукцинат/физиологический раствор, рН 6,0								

Таблица 6 Конъюгаты O25b K-12

№ лота конъюгата	709749-015-2	709744-0016
№ лота полисахарида	710958-137	
Тип полисахарида	Длинная цепь (K12)	
Мол. масса полисахарида (кДа)	44	
Вариант	eTEC	RAC/DMSO
Активация	SH: 24%	DO: 19
Данные о конъюгате		
Выход (%)	59%	33%
Соотношение сахара к белку	1,4	0,83
Свободный сахарид (%)	5%	5,2%
Мол. масса (кДа)	1537	4775
Конц. сахара (мг/мл)	0,91	0,29
Эндотоксин (ЭЕ/мкг)	0,08	0,01
Буфер	5 мМ сукцинат/физ. раствор, рН 6,0	

Пример 29: Получение конъюгатов O-Ag *E. coli* –ТТ

Для конъюгирования со столбнячным анатоксином (ТТ) использовали длинный полисахарид *E. coli* серотипа O25b, лот № 709766-30 (приблизительно 6,92 мг/мл, молекулярная масса приблизительно 39 кДа), 50 мг, лиофилизированный.

Длинный полисахарид *E. coli* серотипа O1a 710958-142-3 (приблизительно 6,3 мг/мл, молекулярная масса приблизительно 44,3 кДа) (50 мг, 7,94 мл) был лиофилизирован.

Длинный полисахарид *E. coli* серотипа O6 710758-121-1 (приблизительно 16,8 мг/мл, молекулярная масса приблизительно 44 кДа) (50 мг, 2,98 мл) был лиофилизирован.

Каждый из указанных выше лиофилизированных полисахаридов растворяли в WFI до достижения приблизительно 5-10 мг/мл, добавляли 0,5 мл раствора (100 мг (1-циано-4-диметиламинопиридиния тетрафторбората (CDAP) в 1 мл ацетонитрила) и перемешивали при комнатной температуре. Добавляли триэтиламин (TEA) 0,2 М (2 мл) и перемешивали при комнатной температуре.

Получение столбнячного анатоксина (ТТ): ТТ (100 мг, 47 мл) концентрировали до приблизительно 20 мл и отмывали двукратно физиологическим раствором (2 x 50 мл) с применением фильтрующих пробирок. Затем его разводили HEPES и физиологическим раствором с получением финальной концентрации HEPES приблизительно 0,25 М.

ТТ получали, как описано выше, и доводили рН реакционной смеси до приблизительно 9,1-9,2. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре.

Через 20-24 ч реакцию останавливали глицином (0,5 мл). После этого концентрировали с применением регенерированных целлюлозных мембран с MWCO и осуществляли диафильтрацию против физиологического раствора. Фильтровали и анализировали. См. Таблицу 26.

Таблица 26.

Примеры воплощений:

Конъюгат <i>E. coli</i> серотип O25b–ТТ	Конъюгат <i>E. coli</i> серотип O6–ТТ
<p>Объем: 41 мл</p> <p>Конц. сах. (антрон): 1,122 мг/мл (выход 92%)</p> <p>Конц. белка (Лоури): 1,133 мг/мл</p> <p>Соотношение сахара и белка: 0,99</p> <p>Свобод. сах. (дезоксихолат): 74,7%</p> <p>Полученный продукт концентрировали до 15 мл с применением регенерированных целлюлозных мембран MWCO и осуществляли диафильтрацию против физиологического раствора (40X диаобъемов). Фильтровали через фильтр 0,22 мкм и анализировали.</p> <p>Объем: 27 мл</p> <p>Конц. сах. (антрон): 1,041 мг/мл (выход 56%)</p> <p>Конц. белка (Лоури): 1,012 мг/мл</p> <p>Соотношение сахара и белка: 1,03</p>	<p>Объем: 42 мл</p> <p>Конц. сах. (антрон): 0,790 мг/мл (выход 66%)</p> <p>Конц. белка (Лоури): 1,895 мг/мл</p> <p>Соотношение сахара и белка: 0,42</p> <p>Свобод. сах. (дезоксихолат): <5%</p> <p>Мол. Масса (кДа): 1192</p> <p>Эндотоксин (ЕЭ/мкг): 0,022</p>

Свобод. сах. (дезоксихолат): 60,6% (регенерация полисахарида 100%)	
--	--

Пример 30: Дополнительные результаты по ферментации, очистки и конъюгированию О-антигена

Приведенные в качестве примера процессы, описанные ниже, обычно можно применять ко всем серотипам *E. coli*. Получение каждого полисахарида включало периодическое культивирование с дальнейшей химической инактивацией до последующей очистки.

Штаммы и хранение. Штаммы, использованные для биосинтеза короткоцепочечного О-антигена представляли собой клинические штаммы *E. coli* дикого типа. Длинноцепочечный О-антиген получали от производных продуцентов короткоцепочечные вариантов, модифицированных по методу Ваннера и Даценко, имеющих делецию нативного гена *wzzb* и комплементаризированных *fepE* от *Salmonella*, обеспечивающим функцию удлинения «длинной цепи». Функция *fepE* обеспечивалась экспрессией под контролем нативного промотора либо в мультикопийном векторе “topo” на базе *colE1*, либо в низкокопийном производном векторе pET30a на базе *colE1*, в котором была произведена делеция области промотора T7.

Банк клеток получали путем выращивания клеток либо в не содержащей компонентов животного происхождения среде LB, либо в минимальной среде до значений OD₆₀₀ по меньшей мере 3,0. Затем культуральный бульон разводили свежей средой и объединяли с 80% глицерином для получения конечной концентрации глицерина 20% с 2,0 OD₆₀₀/мл.

Среды, использованные для посевной культуры и ферментации. Использованные среды для посева и ферментации имели следующий состав: KН₂РO₄, K₂НРO₄, (NH₄)₂SO₄, цитрат натрия, Na₂SO₄, аспарагиновая кислота, глюкоза, MgSO₄, FeSO₄-7H₂O, Na₂MoO₄-2H₂O, H₃BO₃, CoCl₂-6H₂O, CuCl₂-2H₂O, MnCl₂-4H₂O, ZnCl₂ и CaCl₂-2H₂O.

Условия посева и ферментации. Осуществляли инокуляцию 0,1% посевного материала из одной пробирки с посевным материалом. Засеянные колбы инкубировали при 37°C в течение 16-18 часов, обычно достигались значения 10-20 OD₆₀₀/мл.

Ферментацию осуществляли в 10 л ферментере из нержавеющей стали, стерилизуемом паром.

Как правило, инокуляция ферментера посевным материалом с OD_{600} 10 составляла 1:1000. Фаза до подпитки, представляющая собой период, в течение которого рост происходит на 10 г/л загруженной глюкозы, обычно продолжалась 8 часов. После истощения глюкозы происходило резкое повышение растворенного кислорода, в этот момент в ферментер подавали глюкозу. После этого ферментация обычно протекала в течение 16-18 часов с выходом более 120 OD_{600} /мл.

Первоначальная оценка продукции короткоцепочечного/длинноцепочечного O-антигена у серотипов O1a, O2, O6 и O25b.

Штаммы дикого типа O1a, O2, O6 и O25b ферментировали в минимальной среде с добавками в периодическом режиме до $OD_{600} = 15-20$. После истощения глюкозы, приводившего к резкому падению потребления кислорода, осуществляли подачу лимитирующей рост глюкозы в виде раствора глюкозы в течение 16-18 часов. Достигалась плотность клеток 124-145 OD_{600} единиц/мл. Затем доводили pH собранного бульона до приблизительно 3,8 и нагревали до 95°C в течение 2 часов. Затем гидролизованный бульон охлаждали до 25°C, доводили pH до 6,0 и центрифугировали для удаления твердых частиц. Полученную надосадочную жидкость затем наносили на колонку для SEC-HPLC для количественного определения O-антигена. Достигалась продуктивность в диапазоне 2240-4180 мг/л. Молекулярная масса очищенного короткоцепочечного O-антигена в этих партиях варьировала от 10 до 15 кДа. Также отмечалось, что эксклюзионная хроматография гидролизатов O2 и O6 выявляла отчетливые и различимые примесные полисахариды, что не было очевидно в гидролизатах O1a и O25b.

Длинноцепочечные версии O-антигенов O1a, O2, O6 и O25b получали посредством ферментации каждого штамма с делецией *wzzb*, несущего гетерологичный комплементирующий ген *fepE* на мультিকопийной плазмиде *topo* с отбором по канамицину. Ферментацию осуществляли как и для короткой цепи, но с отбором по канамицину. Итоговые плотности клеток, наблюдавшиеся при 124-177 OD_{600} /мл, были ассоциированы с продуктивностью O-антигена 3500-9850 мг/л. Основанный на комплементации синтез длинноцепочечного O-антигена был по меньшей мере настолько же продуктивным, как и у родительского короткоцепочечного штамма, а в некоторых случаях превосходил его. Молекулярные массы очищенного O-антигенного полисахарида составляли 33-49 кДа или приблизительно в 3 раза превышали размер соответствующей короткой цепи.

		цепь (LC)						
O1a	wt	SC	Нет	Нет	125	2550	11	N
O1a	$\Delta wzzb/fepE$	LC	topo	канам.	130	5530	33	N
O1a	$\Delta wzzb/fepE$	LC	pET	канам.	не опр. (НО)	НО	НО	НО
O2	wt	SC	Нет	Нет	127	2240	13	Y
O2	$\Delta wzzb/fepE$	LC	topo	канам.	177	3750	49	Y
O2	x	LC	pET	x	НД	НД	НД	НД
O6	wt	SC	Нет	Нет	145	4180	16	Y
O6	$\Delta wzzb/fepE$	LC	topo	канам.	124	9850	44	Y
O6	$\Delta wzzb/fepE$	LC	pET	канам.	НО	НО	НО	НО
O11	wt	SC	Нет	Нет	194	4720	x	N
O11	$\Delta wzzb/fepE$	LC	topo	канам.	142	7220	x	N
O11	x	LC	pET	x	НД	НД	НД	НД
O13	wt	SC	Нет	x	113	4770	x	N
O13	$\Delta wzzb/fepE$	LC	topo	сам	101	4680	x	N
O13	$\Delta wzzb/fepE$	LC	pET	сам	108	4600	x	N
O16	wt	SC	Нет	x	154	1870	x	N
O16	$\Delta wzzb/fepE$	LC	topo	сам	129	1180	x	N
O16	$\Delta wzzb/fepE$	LC	pET	сам	137	1280	x	N
O21	wt	SC	Нет	x	140	1180	x	N
O21	$\Delta wzzb/fepE$	LC	topo	сам	НО	НО	x	N
O21	$\Delta wzzb/fepE$	LC	pET	сам	131	820	x	N
O25b	2831	SC	Нет	Нет	126	3550	10	N
O25b	$\Delta wzzb/fepE$	LC	topo	канам.	152	3500	49	N
O25b	x	LC	pET	x	НД	НД	НД	НД
O75	wt	SC	Нет	x	149	1690	x	N
O75	$\Delta wzzb/fepE$	LC	topo	сам	132	1500	x	N
O75	$\Delta wzzb/fepE$	LC	pET	сам	138	1520	x	N

Процесс очистки полисахаридов включал кислотный гидролиз для высвобождения О-антигенов. Неочищенную суспензию серотип-специфической культуры *E. coli* обрабатывали уксусной кислотой непосредственно в ферментере до итоговых значений pH $3,5 \pm 0,5$ и подкисленный бульон нагревали до температуры $95 \pm 5^\circ\text{C}$ в течение по меньшей мере одного часа. Обработка расщепляла связь между KDO на проксимальном конце олигосахарида и липидом А, обеспечивая высвобождение цепи О-

Ag. Подкисленный культуральный бульон, содержащий высвобожденный O-Ag, охлаждали до $20 \pm 10^\circ\text{C}$ перед тем как нейтрализовать до pH $7 \pm 1,0$ при помощи NH_4OH . Процесс дополнительно включал несколько стадий центрифугирования, фильтрации и концентрирования/диафильтрации.

Таблица 28.

Серотип (сердцев)	Описание	Ожидаемый размер полисахарида	Титр (г/л)	Мол. масса очищ. полисах. (кДа)	Число повт. звеньев	Увел. мол. массы (кДа) относительно короткого	NMR	Мол. масса очищ. конъюг. (кДа)	№ лота конъюг.
O25b (R1)	$\Delta\text{wzzB} + \text{LT2FepE}$	длинный	5,3	47	55	34	✓	5365	132242-28 (RAC/DMS O)
								1423	132242-98 (одним концом)
								1258	132240-73-1-1 (eTEC)
	$\Delta\text{wzzB} + \text{O25a wzzB}$	короткий	2,3	13/14	15	NA	✓	380	132242-116 (одним концом)
9114								132242-121 (RAC/DMS O)	
O25b (K12)	$\Delta\text{wzzB} + \text{LT2FepE}$	длинный	3,5	44	51	27	✓	1537	709749-015-2 (eTEC)
								4775	709744-0016 (RAC/DMS O)
	wt	короткий	3,5	17	17	NA	✓		
O1a (R1)	$\Delta\text{wzzB} + \text{LT2FepE}$	длинный	5,5	33	39		✓	1035	132240-112-2 (eTEC)

						22		331	132242-106 (одним концом)
								1284	132242-124 (RAC/DMS O)
	wt	короткий	2,5	11	13	NA	✓	280	132242-127 (одним концом)
								2266	132242-130 (RAC/DMS O)
O2 (R1)	$\Delta wzzB +$ LT2FepE	длинный	4,9	36	43	22	✓	1161	00707947- 0003-1 (eTEC)
				39	47	25		422	132242-161 (одним концом)
	wt	короткий	2,8	14	17	NA	✓	3082	132242-152 (RAC/DMS O)
								234	132242-159 (одним концом)
								1120	1322421-157 (RAC/DMS O)
O2 (R4)	$\Delta wzzB +$ LT2FepE	длинный	5,1	NA	NA	NA	NA		
	wt	короткий	2,1	14,7	18	NA	✓		
O6 (R1)	$\Delta wzzB +$ LT2FepE	длинный	6,9	37,2	42	22.2	✓		

	wt	короткий	3,5	15	17	NA	✓	256	132242-146 (одним концом)
								2058	123342-145 (RAC/DMS O)
O6 (R1)	ΔwzzB + LT2FerE	длинный	8,4	44,4	50	28.2	✓	1050	132240-117- 1 (eTEC)
								340	132242-134 (одним концом) 132242-137
								1910	(RAC/DMS O)
	wt	короткий	3,6	16,2	18	NA	✓		

**Пример 31: Исследование конъюгирования с O-антигеном (O4, O11, O21, O75)
(RAC/DMSO)**

Таблица 29.

Конъюгаты O4

№ лота конъюгата	709744-70	709744-73	709744-72
№ лота полисахарида	709740-168		
Мол. масса полисахарида (кДа)	52		
Степень окисления (DO)	26	19	15
Мол. масса акт. полисахарида (кДа)	51		
Конъюгирование			
Подаваемое соотношение сахара к белку	1,0	1,0	1,0
Соотношение сахара к белку	0,85	1,0	1,0

Свободный сахарид (%)	<5%	<5%	<5%
Мол. масса (кДа)	4764	4758	3423
Выход (%)	72	80	82
Эндотоксин (ЭЕ/мкг)	0,003	0,001	0,005

Таблица 30.

Конъюгаты O11

№ лота конъюгата	709744-64	709744-66	709744-65	709744-67
№ лота полисахарида	709740-162			
Мол. масса полисахарида (кДа)	39			
Степень окисления (DO)	21		14	
Мол. масса акт. полисахарида (кДа)	40			
Конъюгирование				
Подаваемое соотношение сахара к белку	1,0	1,3	1,0	1,3
Соотношение сахара к белку	0,5	0,64	0,65	0,75
Свободный сахарид (%)	<5%	<5%	<5%	<5%
Мол. масса (кДа)	10520	7580	4814	4338
Выход (%)	30	30	44	38
Эндотоксин (ЭЕ/мкг)	0,005	0,005	0,005	0,005

Таблица 31.

Конъюгаты O21

№ лота коньгата	709749-113	709749-111	709749-112	709749-115	709749-116
№ лота полисахарида	709740-165				
Мол. масса полисахарида (кДа)	40				
Степень окисления (DO)	25	18		15	
Мол. масса акт. полисахарида (кДа)	40	41		40	
Конъюгирование					
Подаваемое соотношение сахара к белку	1,0	1,0	0,8	1,0	1,25
Соотношение сахара к белку	0,6	0,6	0,5	0,9	1,1
Свободный сахарид (%)	6%	5%	<5%	12%	7%
Мол. масса (кДа)	6920	5961	9729	2403	1960
Выход (%)	31	36	37	52	54
Эндотоксин (ЭЕ/мкг)	0,02	0,02	0,03	0,01	0,009

Таблица 32.

Конъюгаты О75

№ лота коньгата	709749-101	709749-102	709749-103
№ лота полисахарида	709766-080В		
Мол. масса полисахарида (кДа)	48		
Степень окисления (DO)	18		25
Мол. масса акт. полисахарида (кДа)	43		44
Конъюгирование			

Подаваемое соотношение сахара к белку	1,0	0,8	1,0
Соотношение сахара к белку	0,94	0,76	0,78
Свободный сахарид (%)	<5%	6%	6%
Мол. масса (кДа)	2304	2427	5229
Выход (%)	62	65	45
Эндотоксин (ЭЕ/мкг)	0,02	0,01	0,01

Пример 32. Полученные конъюгаты PLL

Таблица 33.

Серотип	O11	O75	O21	O4
№ лота конъюгата	00707779-0413	00707779-0414	00707779-0415	00707779-0416
№ лота полисахарида	709740-162	709766-080B	709740-165	709740-168
Мол. масса полисахарида (кДа)	39	48	40	52
Данные по конъюгату				
Соотношение сахара к белку	13,5	16,8	18,1	21,2
Свободный сахарид (%)	9,8%	<5%	<5%	6,9%
Концентрация сахара	789 мкг/мл	676 мкг/мл	978 мкг/мл	837 мкг/мл
Концентрация поли-L-лизина	58,3 мкг/мл	40,3 мкг/мл	54,0 мкг/мл	39,4 мкг/мл
Эндотоксин (ЭЕ/мкг)	0,002	0,002	0,005	0,004
Конъюгат (DS) матрикс	1X PBS, 1M NaCl			

Пример 33. Стабильная экспрессия полипептидов *E. coli* в клетках млекопитающих. Клоны CHO, стабильно экспрессирующие FimH GSD или FimH

LD, получали с применением системы для стабильной экспрессии SSI (сайт-специфической интеграции).

Клетка-хозяин СНО представляет собой генно-модифицированную клеточную линию в генетическом окружении CHOK1SV GS-KO (для описания линии клеток-хозяев CHOK1SV GS-KO см., например, заявку на патент US 20200002727). Вкратце, систему «landing pad» («посадочная площадка») с геном зеленого флуоресцентного белка, окруженного двумя сайтами FRT, внедрили в горячую точку транскрипции в геном клетки-хозяина. Ген GFP может обмениваться с геном GS и геном, представляющим интерес, также окруженными сайтами FRT, из вектора LVEC, при совместной экспрессии с рекомбиназой флиппазой (FLPe). Данная система не только обеспечивает профили роста и продуктивности, которые предпочтительны по сравнению со случайной интеграцией, но также демонстрирует генотипическую и фенотипическую стабильность по меньшей мере в 100 поколениях.

В данном документе термин «сайт FRT» относится к нуклеотидной последовательности, в которой продукт гена флиппазы (FLP) 2 мкм плазмиды дрожжей, рекомбиназа FLP, способна катализировать сайт-специфическую рекомбинацию. В области техники известно множество неидентичных сайтов FRT. Последовательности различных сайтов FRT схожи тем, что все они содержат идентичные инвертированные повторы длиной 13 пар нуклеотидов, фланкирующие асимметричную коровую область длиной 8 пар нуклеотидов, в которой происходит рекомбинация. Асимметричная коровая область ответственна за направленность сайта и за вариацию между различными сайтами FRT. Их приведенные в качестве иллюстрации (не являющиеся исчерпывающими) примеры включают FRT естественного происхождения (F) и несколько мутантов или вариантов сайта FRT, такие как FRT F1 и FRT F2.

В данном документе термин «landing pad» («посадочная площадка») относится к нуклеотидной последовательности, содержащей первый сайт направленной рекомбинации, интегрированной в хромосому клетки-хозяина. В некоторых воплощениях «landing pad» содержит два или более сайтов направленной рекомбинации, интегрированных в хромосому клетки-хозяина. В некоторых воплощениях клетка содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 систем «landing pad». В некоторых воплощениях клетка содержит 1, 2 или 3 системы «landing pad». В некоторых воплощениях клетка содержит 4 системы «landing pad». В некоторых воплощениях системы «landing pad» интегрированы в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 различных хромосомных локусах. В некоторых

воплощениях системы «landing pad» интегрированы в 1, 2 или 3 различных хромосомных локусах. В некоторых воплощениях системы «landing pad» интегрированы в 4 различных хромосомных локусах.

Клетку-хозяина SSI совместно трансфицировали экспрессирующим вектором LVEC для FimH GSD или FimH LD и экспрессирующим вектором FLPe посредством электропорации с применением BioRad Gene Pulser Xcell или Amaha 4D-Nucleofector. Затем клетки культивировали в среде без глутамина для отбора клеток, у которых ген GS был интегрирован в сайт «landing pad». Обычно клетки восстанавливались через 2-3 недели. Затем осуществляли клонирование одиночных клеток в 96-луночные планшеты с применением FACS или предельного разведения. Лунки с клетками ранжировали по титрам, чтобы сузить число клонов до 48 наилучших. Проводили второй раунд скрининга путем периодического культивирования с подпиткой в 24-луночных глубоких планшетах, чтобы сузить число клонов до 12 наилучших. Осуществляли третий раунд скрининга в ходе культивирования с подпиткой в Ambr15, чтобы сузить число клонов до 3 наилучших. Для выявления наилучшего клона использовали эксперименты с Ambr15. После его выявления создавали главный банк клеток и рабочий банк клеток наилучшего клона.

Пример 34: Создание линии клеток и экспрессия белков FimH-DSG WT и FimH_{LD} WT в промышленном реакторе

В приведенном здесь примере описан пример получения белков FimH-DSG WT и FimH_{LD} WT в стабильной линии клеток СНО, где кодирующие последовательности для каждого белка были стабильно интегрированы в геном СНО.

В условиях промышленного биореактора отобранные стабильные линии клеток СНО были способны продуцировать приблизительно 1 грамм целевого белка FimH-DSG WT на литр культуры и 250 миллиграммов FimH_{LD} WT на литр культуры. Посевной материал для промышленного реактора наращивали постепенно, начиная от размораживания ампулы из рабочего банка клеток и размножения во встряхиваемых колбах, при плотности инокулируемых жизнеспособных клеток $0,3 \times 10^6$ клеток/мл на протяжении трех циклов пассажей во встряхиваемых колбах для получения достаточного количества клеток для промышленного реактора. Клетки выращивали при 36,5 градусах по Цельсию и 5% CO₂ в течение трех-четырёх суток.

Промышленный реактор засеивали из последней встряхиваемой колбы, при целевой плотности инокулируемых клеток 1×10^6 клеток/мл. Выращивание в

промышленном реакторе осуществляли при 36,5 градусах по Цельсию в течение семи суток, при рН 7,05 (+/- 0,15) и целевом насыщении CO₂ 5-10%. Значения рН контролировали при помощи бикарбоната натрия/калия для регуляции основности и барботажа CO₂ для регуляции кислотности. Растворенный кислород поддерживали на заданном уровне 40% путем барботажа чистым кислородом. Температуру доводили до 31 градуса по Цельсию на седьмой день. Подпитку реактора осуществляли в сутки 1 согласно стратегии, при которой питательные вещества добавляют в зависимости от плотности жизнеспособных клеток, это достигалось с применением коэффициента подпитки 0,75, чтобы гарантировать, что питательные компоненты не израсходуются в ходе процесса. Затем подпитку осуществляли непрерывно, обеспечивая желаемый объем подпитки на протяжении суток.

Сбор из промышленного реактора осуществляли в 13 сутки, а собранную культуру центрифугировали и пропускали через фильтр 0,22 мкм перед последующей переработкой.

В следующих пунктах описаны дополнительные воплощения изобретения:

C1. Композиция, содержащая полипептид, имеющий происхождение из FimH, или его фрагмент и сахарид, содержащий структуру, выбранную из любой из Формулы O1 (например, Формулы O1A, Формулы O1B и Формулы O1C), Формулы O2, Формулы O3, Формулы O4 (например, Формулы O4:K52 и Формулы O4:K6), Формулы O5 (например, Формулы O5ab и Формулы O5ac (штамм 180/C3)), Формулы O6 (например, Формулы O6:K2; K13; K15 и Формулы O6:K54), Формулы O7, Формулы O8, Формулы O9, Формулы O10, Формулы O11, Формулы O12, Формулы O13, Формулы O14, Формулы O15, Формулы O16, Формулы O17, Формулы O18 (например, Формулы O18A, Формулы O18ac, Формулы O18A1, Формулы O18B и Формулы O18B1), Формулы O19, Формулы O20, Формулы O21, Формулы O22, Формулы O23 (например, Формулы O23A), Формулы O24, Формулы O25 (например, Формулы O25a и Формулы O25b), Формулы O26, Формулы O27, Формулы O28, Формулы O29, Формулы O30, Формулы O32, Формулы O33, Формулы O34, Формулы O35, Формулы O36, Формулы O37, Формулы O38, Формулы O39, Формулы O40, Формулы O41, Формулы O42, Формулы O43, Формулы O44, Формулы O45 (например, Формулы O45 и Формулы O45rel), Формулы O46, Формулы O48, Формулы O49, Формулы O50, Формулы O51, Формулы O52, Формулы O53, Формулы O54, Формулы O55, Формулы O56, Формулы O57, Формулы O58, Формулы O59, Формулы O60, Формулы O61, Формулы O62, Формулы 62D1,

Формулы O63, Формулы O64, Формулы O65, Формулы O66, Формулы O68, Формулы O69, Формулы O70, Формулы O71, Формулы O73 (например, Формулы O73 (штамм 73-1)), Формулы O74, Формулы O75, Формулы O76, Формулы O77, Формулы O78, Формулы O79, Формулы O80, Формулы O81, Формулы O82, Формулы O83, Формулы O84, Формулы O85, Формулы O86, Формулы O87, Формулы O88, Формулы O89, Формулы O90, Формулы O91, Формулы O92, Формулы O93, Формулы O95, Формулы O96, Формулы O97, Формулы O98, Формулы O99, Формулы O100, Формулы O101, Формулы O102, Формулы O103, Формулы O104, Формулы O105, Формулы O106, Формулы O107, Формулы O108, Формулы O109, Формулы O110, Формулы O111, Формулы O112, Формулы O113, Формулы O114, Формулы O115, Формулы O116, Формулы O117, Формулы O118, Формулы O119, Формулы O120, Формулы O121, Формулы O123, Формулы O124, Формулы O125, Формулы O126, Формулы O127, Формулы O128, Формулы O129, Формулы O130, Формулы O131, Формулы O132, Формулы O133, Формулы O134, Формулы O135, Формулы O136, Формулы O137, Формулы O138, Формулы O139, Формулы O140, Формулы O141, Формулы O142, Формулы O143, Формулы O144, Формулы O145, Формулы O146, Формулы O147, Формулы O148, Формулы O149, Формулы O150, Формулы O151, Формулы O152, Формулы O153, Формулы O154, Формулы O155, Формулы O156, Формулы O157, Формулы O158, Формулы O159, Формулы O160, Формулы O161, Формулы O162, Формулы O163, Формулы O164, Формулы O165, Формулы O166, Формулы O167, Формулы O168, Формулы O169, Формулы O170, Формулы O171, Формулы O172, Формулы O173, Формулы O174, Формулы O175, Формулы O176, Формулы O177, Формулы O178, Формулы O179, Формулы O180, Формулы O181, Формулы O182, Формулы O183, Формулы O184, Формулы O185, Формулы O186 и Формулы O187, где n представляет собой целое число от 1 до 100.

C2. Композиция по п. C1, где сахарид содержит структуру, выбранную из Формулы O1 (например, Формулы O1A, Формулы O1B и Формулы O1C), Формулы O2, Формулы O3, Формулы O4 (например, Формулы O4:K52 и Формулы O4:K6), Формулы O5 (например, Формулы O5ab и Формулы O5ac (штамм 180/C3)), Формулы O6 (например, Формулы O6:K2; K13; K15 и Формулы O6:K54), Формулы O7, Формулы O10, Формулы O16, Формулы O17, Формулы O18 (например, Формулы O18A, Формулы O18ac, Формулы O18A1, Формулы O18B и Формулы O18B1), Формулы O21, Формулы O23 (например, Формулы O23A), Формулы O24, Формулы O25 (например, Формулы

О25а и Формулы О25b), Формулы О26, Формулы О28, Формулы О44, Формулы О45 (например, Формулы О45 и Формулы О45rel), Формулы О55, Формулы О56, Формулы О58, Формулы О64, Формулы О69, Формулы О73 (например, Формулы О73 (штамм 73-1)), Формулы О75, Формулы О77, Формулы О78, Формулы О86, Формулы О88, Формулы О90, Формулы О98, Формулы О104, Формулы О111, Формулы О113, Формулы О114, Формулы О119, Формулы О121, Формулы О124, Формулы О125, Формулы О126, Формулы О127, Формулы О128, Формулы О136, Формулы О138, Формулы О141, Формулы О142, Формулы О143, Формулы О147, Формулы О149, Формулы О152, Формулы О157, Формулы О158, Формулы О159, Формулы О164, Формулы О173, Формулы 62D₁, Формулы О22, Формулы О35, Формулы О65, Формулы О66, Формулы О83, Формулы О91, Формулы О105, Формулы О116, Формулы О117, Формулы О139, Формулы О153, Формулы О167 и Формулы О172, где *n* представляет собой целое число от 20 до 100.

С3. Композиция по п. С2, где сахарид содержит структуру, выбранную из Формулы О1 (например, Формулы О1А, Формулы О1В и Формулы О1С), Формулы О2, Формулы О3, Формулы О4 (например, Формулы О4:К52 и Формулы О4:К6), Формулы О5 (например, Формулы О5ab и Формулы О5ac (штамм 180/С3)), Формулы О6 (например, Формулы О6:К2; К13; К15 и Формулы О6:К54), Формулы О7, Формулы О10, Формулы О16, Формулы О17, Формулы О18 (например, Формулы О18А, Формулы О18ac, Формулы О18А1, Формулы О18В и Формулы О18В1), Формулы О21, Формулы О23 (например, Формулы О23А), Формулы О24, Формулы О25 (например, Формулы О25а и Формулы О25b), Формулы О26, Формулы О28, Формулы О44, Формулы О45 (например, Формулы О45 и Формулы О45rel), Формулы О55, Формулы О56, Формулы О58, Формулы О64, Формулы О69, Формулы О73 (например, Формулы О73 (штамм 73-1)), Формулы О75, Формулы О77, Формулы О78, Формулы О86, Формулы О88, Формулы О90, Формулы О98, Формулы О104, Формулы О111, Формулы О113, Формулы О114, Формулы О119, Формулы О121, Формулы О124, Формулы О125, Формулы О126, Формулы О127, Формулы О128, Формулы О136, Формулы О138, Формулы О141, Формулы О142, Формулы О143, Формулы О147, Формулы О149, Формулы О152, Формулы О157, Формулы О158, Формулы О159, Формулы О164, Формулы О173 и Формулы 62D₁, где *n* представляет собой целое число от 20 до 100.

С4. Композиция по п. С2, содержащая структуру, выбранную из Формулы О1 (например, Формулы О1А, Формулы О1В и Формулы О1С), Формулы О2, Формулы О6

(например, Формулы О6:К2; К13; К15 и Формулы О6:К54), Формулы О15, Формулы О16, Формулы О21, Формулы О25 (например, Формулы О25а и Формулы О25b) и Формулы О75.

С5. Композиция по п. С2, содержащая структуру, выбранную из Формулы О4, Формулы О11, Формулы О21 и Формулы О75.

С6. Композиция по п. С1, где сахарид не содержит структуру, выбранную из Формулы О8, Формулы О9а, Формулы О9, Формулы О20ab, Формулы О20ас, Формулы О52, Формулы О97 и Формулы О101.

С7. Композиция по п. С1, где сахарид не содержит структуру, выбранную из Формулы О12.

С8. Композиция по п. С1, где сахарид продуцирован в результате экспрессии белка семейства wzz в грамотрицательной бактерии для получения указанного сахарида.

С9. Композиция по п. С8, где белок семейства wzz выбран из группы, состоящей из wzzB, wzz, wzz_{SF}, wzz_{ST}, ferE, wzz_{ferE}, wzz1 и wzz2.

С10. Композиция по п. С8, где белок семейства wzz представляет собой wzzB.

С11. Композиция по п. С8, где белок семейства wzz представляет собой ferE.

С12. Композиция по п. С8, где белок семейства wzz представляет собой wzzB и ferE.

С13. Композиция по п. С8, где белок семейства wzz имеет происхождение из *Salmonella enterica*.

С14. Композиция по п. С8, где белок семейства wzz содержит последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 39.

С15. Композиция по п. С8, где белок семейства wzz содержит последовательность, обладающую идентичностью по меньшей мере 90% с любой из SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34.

С16. Композиция по п. С8, где белок семейства wzz содержит последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 39.

С17. Композиция по п. С1, где сахарид является искусственно синтезированным.

С18. Композиция по любому из п.п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.-**

Ошибка! Источник ссылки не найден., где сахарид дополнительно содержит группировку R1 *E. coli*.

C19. Композиция по любому из п.п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.-**
Ошибка! Источник ссылки не найден., где сахарид дополнительно содержит группировку R2 *E. coli*.

C20. Композиция по любому из п.п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.-**
Ошибка! Источник ссылки не найден., где сахарид дополнительно содержит группировку R3 *E. coli*.

C21. Композиция по любому из п.п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.-**
Ошибка! Источник ссылки не найден., где сахарид дополнительно содержит группировку R4 *E. coli*.

C22. Композиция по любому из п.п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.-**
Ошибка! Источник ссылки не найден., где сахарид дополнительно содержит группировку K-12 *E. coli*.

C23. Композиция по любому из п.п. C22-**Ошибка! Источник ссылки не найден.**, где сахарид дополнительно содержит группировку 3-дезоксид-д-манно-окт-2-улозоновой кислоты (KDO).

C24. Композиция по любому из п.п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.-**
Ошибка! Источник ссылки не найден., где сахарид не содержит дополнительно группировку R1 *E. coli*.

C25. Композиция по любому из п.п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.-**
Ошибка! Источник ссылки не найден., где сахарид не содержит дополнительно группировку R2 *E. coli*.

C26. Композиция по любому из п.п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.-**
Ошибка! Источник ссылки не найден., где сахарид не содержит дополнительно группировку R3 *E. coli*.

C27. Композиция по любому из п.п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.-**
Ошибка! Источник ссылки не найден., где сахарид не содержит дополнительно группировку R4 *E. coli*.

C28. Композиция по любому из п.п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.-**
Ошибка! Источник ссылки не найден., где сахарид не содержит дополнительно группировку K-12 *E. coli*.

C29. Композиция по любому из п.п. C22-**Ошибка! Источник ссылки не**

найден., где сахарид не содержит дополнительно группировку 3-дезоксид-манно-окт-2-улозоновой кислоты (KDO).

С30. Композиция по любому из п.п. **С23-Ошибка! Источник ссылки не найден.**, где сахарид не содержит липид А.

С31. Композиция по любому из п.п. **С30-Ошибка! Источник ссылки не найден.**30, где полисахарид имеет молекулярную массу от 10 кДа до 2000 кДа или от 50 кДа до 2000 кДа.

С32. Композиция по любому из п.п. **С31-Ошибка! Источник ссылки не найден.**31, где сахарид имеет среднюю молекулярную массу 20-40 кДа.

С33. Композиция по любому из п.п. **С32-Ошибка! Источник ссылки не найден.**, где сахарид имеет среднюю молекулярную массу от 40000 до 60000 кДа.

С34. Композиция по любому из п.п. **С33-Ошибка! Источник ссылки не найден.**33, где *n* представляет собой целое число от 31 до 90.

С35. Композиция, содержащая полипептид, имеющий происхождение из FimH, или его фрагмент; и конъюгат, содержащий сахарид, ковалентно связанный с белком-носителем, где сахарид имеет происхождение из *E. coli*.

С36. Композиция, содержащая полипептид, имеющий происхождение из FimH, или его фрагмент; и конъюгат, содержащий сахарид по любому из п.п. С1 - С34, ковалентно связанный с белком-носителем.

С37. Композиция, содержащая полипептид, имеющий происхождение из FimH, или его фрагмент; и конъюгат по любому из п.п. С35 - С36, где белок-носитель выбран из любого из: поли(L-лизина), CRM₁₉₇, фрагмента В дифтерийного токсина (DTFB), DTFB С8, дифтерийного анатоксина (DT), столбнячного анатоксина (ТТ), фрагмента С из ТТ, коклюшного анатоксина, холерного анатоксина или экзотоксина А из *Pseudomonas aeruginosa*; обезвреженного экзотоксина А из *P. aeruginosa* (ЕРА), мальтозо-связывающего белка (MBP), обезвреженного гемолизина А из *S. aureus*, агглютинирующего фактора А, агглютинирующего фактора В, субъединицы В холерного токсина (СТВ), пневмолизина *Streptococcus pneumoniae* и их обезвреженных вариантов, АсгА *C. jejuni* и естественных гликопротеинов *C. jejuni*.

С38. Композиция по любому из п.п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.-** **Ошибка! Источник ссылки не найден.**37, где белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇.

С39. Композиция по любому из п.п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.-**

Ошибка! Источник ссылки не найден.37, где белок-носитель представляет собой столбнячный анатоксин (ТТ).

С40. Композиция по любому из п.п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**-**Ошибка! Источник ссылки не найден.**37, где белок-носитель представляет собой поли(L-лизин).

С41. Композиция по любому из п.п. С39-**Ошибка! Источник ссылки не найден.**39, где конъюгат получен путем восстановительного аминирования.

С42. Композиция по любому из п.п. С39-**Ошибка! Источник ссылки не найден.**39, где конъюгат получен посредством химии CDAP (1-циано-4-диметиламинопиридиния тетрафторборат).

С43. Композиция по любому из п.п. С39-**Ошибка! Источник ссылки не найден.**39, где конъюгат представляет собой сахарид, конъюгированный по одному концу.

С44. Композиция по любому из п.п. С39-**Ошибка! Источник ссылки не найден.**39, где сахарид конъюгирован с белком-носителем через спейсер (2-((2-оксоэтил)тио)этил)карбамат (еТЕС).

С45. Композиция по п. С44, где сахарид конъюгирован с белком-носителем через спейсер (2-((2-оксоэтил)тио)этил)карбамат (еТЕС), где сахарид ковалентно связан со спейсером еТЕС посредством карбаматной связи, и где белок-носитель ковалентно связан со спейсером еТЕС посредством амидной связи.

С46. Композиция по любому из п.п. С45-**Ошибка! Источник ссылки не найден.**45, где CRM₁₉₇ содержит от 2 до 20 или от 4 до 16 остатков лизина, ковалентно связанных с полисахаридом через спейсер еТЕС.

С47. Композиция по любому из п.п. С46-**Ошибка! Источник ссылки не найден.**46, где соотношение сахарид: белок носитель (масс./масс.) составляет от 0,2 до 4.

С48. Композиция по любому из п.п. С46-**Ошибка! Источник ссылки не найден.**46, где соотношение сахара к белку составляет по меньшей мере 0,5 и самое большее 2.

С49. Композиция по любому из п.п. С46-**Ошибка! Источник ссылки не найден.**46, где соотношение сахара к белку составляет от 0,4 до 1,7.

С50. Композиция по любому из п.п. С49-**Ошибка! Источник ссылки не найден.**49, где сахарид конъюгирован с белком-носителем через остаток 3-дезоксид-

манно-окт-2-улозоновой кислоты (KDO).

C51. Композиция, содержащая полипептид, имеющий происхождение из FimH, или его фрагмент; и конъюгат, содержащий сахарид, ковалентно связанный с белком-носителем, где сахарид содержит структуру, выбранную из Формулы O8, Формулы O9a, Формулы O9, Формулы O20ab, Формулы O20ac, Формулы O52, Формулы O97 и Формулы O101, где *n* представляет собой целое число от 1 до 10.

C52. Композиция, содержащая полипептид, имеющий происхождение из FimH, или его фрагмент; и сахарид по любому из п.п. C1-C34 и фармацевтически приемлемый разбавитель.

C53. Композиция, содержащая полипептид, имеющий происхождение из FimH, или его фрагмент; и конъюгат по любому из п.п. C35-C51 и фармацевтически приемлемый разбавитель.

C54. Композиция по п. C53, содержащая самое большее приблизительно 25% свободного сахара относительно общего количества сахара в композиции.

C55. Композиция по любому из п.п. C53-C513, дополнительно содержащая адъювант.

C56. Композиция по любому из п.п. C53-C513, дополнительно содержащая алюминий.

C57. Композиция по любому из п.п. C53-C513, дополнительно содержащая QS-21.

C58. Композиция по любому из п.п. C53-C513, дополнительно содержащая олигонуклеотид CpG.

C59. Композиция по любому из п.п. C53-C513, где композиция не содержит адъювант.

C60. Композиция, содержащая полипептид, имеющий происхождение из FimH, или его фрагмент; и сахарид, имеющий происхождение из *E. coli*, конъюгированный с белком-носителем через спейсер (2-((2-оксоэтил)тио)этил)карбамат (eTEC), где полисахарид ковалентно связан со спейсером eTEC посредством карбаматной связи, и где белок-носитель ковалентно связан со спейсером eTEC посредством амидной связи.

C61. Композиция по п. C60, где сахарид представляет собой O-антиген, имеющий происхождение из *E. coli*.

C62. Композиция по п. C60, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель.

С63. Композиция по п. С60, где сахарид представляет собой О-антиген, имеющий происхождение из *E. coli*.

С64. Композиция, содержащая полипептид, имеющий происхождение из FimH, или его фрагмент; и сахарид по любому из п.п. С1 - **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, конъюгированный с белком-носителем через спейсер (2-((2-оксоэтил)тио)этил)карбамат (еТЕС), где полисахарид ковалентно связан со спейсером еТЕС посредством карбаматной связи, и где белок-носитель ковалентно связан со спейсером еТЕС посредством амидной связи.

С65. Композиция, содержащая полипептид, имеющий происхождение из FimH, или его фрагмент; и (i) конъюгат антигена O25B *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, (ii) конъюгат антигена O1A *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, (iii) конъюгат антигена O2 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, и (iv) конъюгат антигена O6, ковалентно связанного с белком-носителем, где антиген O25B *E. coli* содержит структуру Формулы O25B, где n представляет собой целое число больше 30.

С66. Композиция по п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, где белок-носитель выбран из любого из поли(L-лизина), CRM₁₉₇, фрагмента В дифтерийного токсина (DTFB), DTFB С8, дифтерийного анатоксина (DT), столбнячного анатоксина (ТТ), фрагмента С из ТТ, коклюшного анатоксина, холерного анатоксина или экзотоксина А из *Pseudomonas aeruginosa*; обезвреженного экзотоксина А из *P. aeruginosa* (ЕРА), мальтозо-связывающего белка (МВР), обезвреженного гемолизина А из *S. aureus*, агглютинирующего фактора А, агглютинирующего фактора В, субъединицы В холерного токсина (СТВ), пневмолизина *Streptococcus pneumoniae* и их обезвреженных вариантов, АсгА *C. jejuni* и естественных гликопротеинов *C. jejuni*.

С67. Композиция, содержащая полипептид, имеющий происхождение из FimH, или его фрагмент; и (i) конъюгат антигена O25B *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, (ii) конъюгат антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, (iii) конъюгат антигена O11 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, и (iv) конъюгат антигена O21, ковалентно связанный с белком-носителем, где антиген O25B *E. coli* содержит структуру Формулы O75, где n представляет собой целое число больше 30.

С68. Композиция по п. С67, где белок-носитель выбран из любого из поли(L-лизина), CRM₁₉₇, фрагмента В дифтерийного токсина (DTFB), DTFB С8, дифтерийного анатоксина (DT), столбнячного анатоксина (ТТ), фрагмента С из ТТ, коклюшного

анатоксина, холерного анатоксина или экзотоксина А из *Pseudomonas aeruginosa*; обезвреженного экзотоксина А из *P. aeruginosa* (ЕРА), мальтозо-связывающего белка (МВР), обезвреженного гемолизина А из *S. aureus*, агглютинирующего фактора А, агглютинирующего фактора В, субъединицы В холерного токсина (СТВ), пневмолизина *Streptococcus pneumoniae* и их обезвреженных вариантов, АсгА *C. jejuni* и естественных гликопротеинов *C. jejuni*.

С69. Способ получения композиции, содержащей полипептид, имеющий происхождение из FimH, или его фрагмент; и конъюгат, содержащий сахарид, конъюгированный с белком-носителем через спейсер (2-((2-оксоэтил)тио)этил)карбамат (еТЕС), включающий стадии а) осуществления реакции сахараида с 1,1'-карбонил-ди-(1,2,4-триазолом) (CDT) или 1,1'-карбонилдиимидазолом (CDI) в органическом растворителе с получением активированного сахараида; б) осуществления реакции активированного сахараида с цистамином или цистеамином или их солью с получением тиолированного сахараида; в) осуществления реакции тиолированного сахараида с восстанавливающим агентом с получением активированного тиолированного сахараида, содержащего один или более свободных сульфгидрильных остатков; г) осуществления реакции активированного тиолированного сахараида с активированным белком-носителем, содержащим одну или более α -галоацетамидных групп, с получением конъюгата тиолированный сахарид-белок-носитель; и д) осуществления реакции конъюгата тиолированный сахарид-белок-носитель с (i) первым кэпирующим реагентом, способным кэпировать неконъюгированные α -галоацетамидные группы активированного белка-носителя; и/или (ii) вторым кэпирующим реагентом, способным кэпировать неконъюгированные свободные сульфгидрильные остатки; в результате чего получают еТЕС-связанный гликоконъюгат, где сахарид имеет происхождение из *E. coli*; дополнительно включающий экспрессирование полинуклеотида, кодирующего полипептид, имеющий происхождение из FimH, или его фрагмент, в рекомбинантной клетке млекопитающего и выделение указанного полипептида или его фрагмента.

С70. Способ по п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, включающий получение композиции по любому из п.п. С1 - С34.

С71. Способ по любому из п.п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.** - С70, где стадия кэпирования д) включает осуществление реакции конъюгата тиолированный сахарид-белок-носитель с (i) N-ацетил-L-цистеином в качестве первого кэпирующего реагента и/или (ii) иодоацетамидом в качестве в качестве второго кэпирующего реагента.

C72. Способ по любому из п.п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.** - **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, дополнительно включающий стадию компаундирования сахара посредством реакции с триазолом или имидазолом с получением компаундированного сахара, где компаундированный сахарид подвергают поверхностному замораживанию, лиофилизации и восстановлению в органическом растворителе перед стадией а).

C73. Способ по любому из п.п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.** - **Ошибка! Источник ссылки не найден.** дополнительно включающий очистку тиолированного полисахарида, полученного на стадии в), где стадия очистки включает диафильтрацию.

C74. Способ по любому из п.п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.** - **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, дополнительно включающий очистку eTEC-связанного гликоконъюгата путем диафильтрации.

C75. Способ по любому из п.п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.** - **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, где органический растворитель на стадии а) представляет собой полярный апротонный растворитель, выбранный из любого из диметилсульфоксида (DMSO), диметилформамида (DMF), диметилацетамида (DMA), N-метил-2-пирролидона (NMP), ацетонитрила, 1,3-диметил-3,4,5,6-тетрагидро-2(1H)-пиримидинона (DMPU) и гексаметилфосфорамида (HMPA) или их смеси.

C76. Среда, содержащая KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, цитрат натрия, Na_2SO_4 , аспарагиновую кислоту, глюкозу, MgSO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 и $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

C77. Среда по п. C76, где указанную среду применяют для культивирования *E. coli*.

C78. Способ получения сахара по любому из п.п. C1-C34, включающий культивирование рекомбинантной *E. coli* в среде; продуцирование указанного сахара путем культивирования указанной клетки в указанной среде; где указанная клетка продуцирует указанный сахарид.

C79. Способ по п. C78, где среда содержит элемент, выбранный из любого из KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, цитрата натрия, Na_2SO_4 , аспарагиновой кислоты, глюкозы, MgSO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 и $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

C80. Способ по п. C78, где среда содержит соевый гидролизат.

- C81. Способ по п. C78, где среда содержит дрожжевой экстракт.
- C82. Способ по п. C78, где среда не содержит дополнительно соевый гидролизат и дрожжевой экстракт.
- C83. Способ по п. C78, где клетка *E. coli* содержит гетерологичный белок семейства wzz, выбранный из любого из wzzB, wzz, wzz_{SF}, wzz_{ST}, fepE, wzz_{fepE}, wzz1 и wzz2.
- C84. Способ по п. C78, где клетка *E. coli* содержит белок семейства wzz *Salmonella enterica*, выбранный из любого из wzzB, wzz, wzz_{SF}, wzz_{ST}, fepE, wzz_{fepE}, wzz1 и wzz2.
- C85. Способ по п. C84, где белок семейства wzz содержит последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19.
- C86. Способ по п. C78, где культивирование обеспечивает выход более 120 OD₆₀₀/мл.
- C87. Способ по п. C78, дополнительно включающий очистку сахара.
- C88. Способ по п. C78, где стадия очистки включает любое из следующего: диализ, операции концентрации, операции диафильтрации, тангенциально-поточную фильтрацию, преципитацию, элюирование, центрифугирование, преципитацию, ультрафильтрацию, глубинную фильтрацию и колоночную хроматографию (ионообменную хроматографию, мультимодальную ионообменную хроматографию, DEAE и хроматографию гидрофобных взаимодействий).
- C89. Способ индуцирования иммунного ответа у млекопитающего, включающий введение субъекту композиции по любому из п.п. C68-C89.
- C90. Способ по п. C89, где иммунный ответ включает индуцирование сывороточного антитела, специфичного к O-полисахариду *E. coli*.
- C91. Способ по п. C89, где иммунный ответ включает индуцирование сывороточного IgG антитела к *E. coli*.
- C92. Способ по п. C89, где иммунный ответ включает индуцирование бактерицидной активности против *E. coli*.
- C93. Способ по п. C89, где иммунный ответ включает индуцирование опсонофагоцитарных антител против *E. coli*.
- C94. Способ по п. C89, где иммунный ответ после первоначального

дозирования имеет средний геометрический титр (GMT) на уровне по меньшей мере от 1000 до 200000.

C95. Способ по п. C89, где композиция содержит сахарид, включающий Формулу O25, где n представляет собой целое число от 40 до 100, где иммунный ответ после первоначального дозирования имеет средний геометрический титр (GMT) на уровне по меньшей мере от 1000 до 200000.

C96. Способ по п. C89, где млекопитающее имеет риск любого из состояний, выбранных из инфекции мочевых путей, холецистита, холангита, диареи, гемолитико-уремического синдрома, неонатального менингита, уросепсиса, внутрибрюшинной инфекции, менингита, осложненной пневмонии, раневой инфекции, инфекции, связанной с биопсией простаты, сепсиса новорожденных и детей грудного возраста, нейтропенической лихорадки и других инфекций кровяного русла; пневмонии, бактериемии и сепсиса.

C97. Способ по п. C89, где млекопитающее имеет одно из состояний, выбранных из инфекции мочевых путей, холецистита, холангита, диареи, гемолитико-уремического синдрома, неонатального менингита, уросепсиса, внутрибрюшинной инфекции, менингита, осложненной пневмонии, раневой инфекции, инфекции, связанной с биопсией простаты, сепсиса новорожденных и детей грудного возраста, нейтропенической лихорадки и других инфекций кровяного русла; пневмонии, бактериемии и сепсиса.

C98. Способ (i) индуцирования иммунного ответа у субъекта против внекишечной патогенной *Escherichia coli*, (ii) индуцирования иммунного ответа у субъекта против внекишечной патогенной *Escherichia coli* или (iii) индуцирования у субъекта выработки опсонофагоцитарных антител, специфичных к внекишечной патогенной *Escherichia coli*, где способ включает введение субъекту эффективного количества композиции по любому из п.п. C1 - C68.

C99. Способ по п. C98, где субъект подвержен риску развития инфекции мочевыводящих путей.

C100. Способ по п. C98, где субъект подвержен риску развития бактериемии.

C101. Способ по п. C98, где субъект подвержен риску развития сепсиса.

C102. Композиция, содержащая полипептид, имеющий происхождение из FimH, или его фрагмент; и (i) конъюгат антигена O25B *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, (ii) конъюгат антигена O1A *E. coli*, ковалентно связанного с белком-

носителем, (iii) конъюгат антигена O2 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, и (iv) конъюгат антигена O6, ковалентно связанного с белком-носителем, где антиген O25B *E. coli* содержит структуру Формулы O25B, где n представляет собой целое число больше 30.

C103. Композиция по п. C102, где белок-носитель выбран из группы, состоящей из поли(L-лизина), обезвреженного экзотоксина A из *P. aeruginosa* (EPA), CRM197, мальтозосвязывающего белка (MBP). дифтерийного анатоксина, столбнячного анатоксина, обезвреженного гемолизина A из *S. aureus*, агглютинирующего фактора A, агглютинирующего фактора B, субъединицы B холерного токсина (CTB), холерного токсина, обезвреженных вариантов холерного токсина, пневмолизина *Streptococcus pneumoniae* и их обезвреженных вариантов, AсгА *C. jejuni* и естественных гликопротеинов *C. jejuni*.

C104. Способ (i) индуцирования иммунного ответа у субъекта против внекишечной патогенной *Escherichia coli*, (ii) индуцирования иммунного ответа у субъекта против внекишечной патогенной *Escherichia coli* или (iii) индуцирования у субъекта выработки опсонофагоцитарных антител, специфических в отношении внекишечной патогенной *Escherichia coli*, где способ включает введение субъекту эффективного количества композиции по п. C1.

C105. Способ по п. C104, где субъект подвержен риску развития инфекции мочевыводящих путей.

C106. Способ по п. C104, где субъект подвержен риску развития бактериемии.

C107. Способ по п. C104, где субъект подвержен риску развития сепсиса.

C108. Композиция, содержащая полипептид, имеющий происхождение из FimH, или его фрагмент; и сахарид, содержащий по меньшей мере на 5 повторяющихся звеньев больше по сравнению с O-полисахаридом *E. coli* дикого типа.

C109. Композиция по п. C108, где сахарид содержит Формулу O25a, и *E. coli* представляет собой *E. coli* серотипа O25a.

C110. Композиция по п. C108, где сахарид содержит Формулу O25b, и *E. coli* представляет собой *E. coli* серотипа O25b.

C111. Композиция по п. C108, где сахарид содержит Формулу O2, и *E. coli* представляет собой *E. coli* серотипа O2.

C112. Композиция по п. C108, где сахарид содержит Формулу O6, и *E. coli* представляет собой *E. coli* серотипа O6.

C113. Композиция по п. C108, где сахарид содержит Формулу O1, и *E. coli* представляет собой *E. coli* серотипа O1.

C114. Композиция по п. C108, где сахарид содержит Формулу O17, и *E. coli* представляет собой *E. coli* серотипа O17.

C115. Композиция по п. C108, где сахарид содержит структуру, выбранную из: Формулы O1, Формулы O2, Формулы O3, Формулы O4, Формулы O5, Формулы O6, Формулы O7, Формулы O8, Формулы O9, Формулы O10, Формулы O11, Формулы O12, Формулы O13, Формулы O14, Формулы O15, Формулы O16, Формулы O17, Формулы O18, Формулы O19, Формулы O20, Формулы O21, Формулы O22, Формулы O23, Формулы O24, Формулы O25, Формулы O25b, Формулы O26, Формулы O27, Формулы O28, Формулы O29, Формулы O30, Формулы O32, Формулы O33, Формулы O34, Формулы O35, Формулы O36, Формулы O37, Формулы O38, Формулы O39, Формулы O40, Формулы O41, Формулы O42, Формулы O43, Формулы O44, Формулы O45, Формулы O46, Формулы O48, Формулы O49, Формулы O50, Формулы O51, Формулы O52, Формулы O53, Формулы O54, Формулы O55, Формулы O56, Формулы O57, Формулы O58, Формулы O59, Формулы O60, Формулы O61, Формулы O62, Формулы O63, Формулы O64, Формулы O65, Формулы O66, Формулы O68, Формулы O69, Формулы O70, Формулы O71, Формулы O73, Формулы O74, Формулы O75, Формулы O76, Формулы O77, Формулы O78, Формулы O79, Формулы O80, Формулы O81, Формулы O82, Формулы O83, Формулы O84, Формулы O85, Формулы O86, Формулы O87, Формулы O88, Формулы O89, Формулы O90, Формулы O91, Формулы O92, Формулы O93, Формулы O95, Формулы O96, Формулы O97, Формулы O98, Формулы O99, Формулы O100, Формулы O101, Формулы O102, Формулы O103, Формулы O104, Формулы O105, Формулы O106, Формулы O107, Формулы O108, Формулы O109, Формулы O110, Формулы O111, Формулы O112, Формулы O113, Формулы O114, Формулы O115, Формулы O116, Формулы O117, Формулы O118, Формулы O119, Формулы O120, Формулы O121, Формулы O123, Формулы O124, Формулы O125, Формулы O126, Формулы O127, Формулы O128, Формулы O129, Формулы O130, Формулы O131, Формулы O132, Формулы O133, Формулы O134, Формулы O135, Формулы O136, Формулы O137, Формулы O138, Формулы O139, Формулы O140, Формулы O141, Формулы O142, Формулы O143, Формулы O144, O145, Формулы O146, Формулы O147, Формулы O148, Формулы O149, Формулы O150, Формулы O151, Формулы O152, Формулы O153, Формулы O154, Формулы O155, Формулы O156,

Формулы O157, Формулы O158, Формулы O159, Формулы O160, Формулы O161, Формулы O162, Формулы O163, Формулы O164, Формулы O165, Формулы O166, Формулы O167, Формулы O168, Формулы O169, Формулы O170, Формулы O171, Формулы O172, Формулы O173, Формулы O174, Формулы O175, Формулы O176, Формулы O177, Формулы O178, Формулы O179, Формулы O180, Формулы O181, Формулы O182, Формулы O183, Формулы O184, Формулы O185, Формулы O186 и Формулы O187, где n представляет собой целое число от 5 до 1000.

C116. Композиция по п. C108, где *E. coli* представляет собой *E. coli* серотипа, выбранного из группы, состоящей из: O1, O2, O3, O4, O5, O6, O7, O8, O9, O10, O11, O12, O13, O14, O15, O16, O17, O18, O19, O20, O21, O22, O23, O24, O25, O25b, O26, O27, O28, O29, O30, O32, O33, O34, O35, O36, O37, O38, O39, O40, O41, O42, O43, O44, O45, O46, O48, O49, O50, O51, O52, O53, O54, O55, O56, O57, O58, O59, O60, O61, O62, O63, O64, O65, O66, O68, O69, O70, O71, O73, O74, O75, O76, O77, O78, O79, O80, O81, O82, O83, O84, O85, O86, O87, O88, O89, O90, O91, O92, O93, O95, O96, O97, O98, O99, O100, O101, O102, O103, O104, O105, O106, O107, O108, O109, O110, O111, O112, O113, O114, O115, O116, O117, O118, O119, O120, O121, O123, O124, O125, O126, O127, O128, O129, O130, O131, O132, O133, O134, O135, O136, O137, O138, O139, O140, O141, O142, O143, O144, O145, O146, O147, O148, O149, O150, O151, O152, O153, O154, O155, O156, O157, O158, O159, O160, O161, O162, O163, O164, O165, O166, O167, O168, O169, O170, O171, O172, O173, O174, O175, O176, O177, O178, O179, O180, O181, O182, O183, O184, O185, O186 и O187.

C117. Композиция по п. C108, где сахарид продуцирован путем увеличения повторяющихся звеньев O-полисахаридов, продуцируемых в культуре грамотрицательной бактерией, сверхэкспрессирующей белки семейства wzz в грамотрицательной бактерии для получения указанного сахара.

C118. Композиция по п. C117, где сверхэкспрессируемый белок семейства wzz выбран из группы, состоящей из wzzB, wzz, wzz_{SF}, wzz_{ST}, ferE, wzz_{ferE}, wzz1 и wzz2.

C119. Композиция по п. C117, где сверхэкспрессируемый белок семейства wzz представляет собой wzzB.

C120. Композиция по п. C117, где сверхэкспрессируемый белок семейства wzz представляет собой ferE.

C121. Композиция по п. C117, где сверхэкспрессируемый белок семейства wzz представляет собой wzzB и ferE.

C122. Композиция по п. C108, где сахарид является искусственно синтезированным.

C123. Композиция, содержащая полипептид, имеющий происхождение из FimH, или его фрагмент; и конъюгат, содержащий сахарид по п. C108, ковалентно связанный с белком-носителем.

C124. Композиция по п. C123, где белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇.

C125. Композиция по п. C123, где сахарид содержит структуру, выбранную из: Формулы O1, Формулы O2, Формулы O3, Формулы O4, Формулы O5, Формулы O6, Формулы O7, Формулы O8, Формулы O9, Формулы O10, Формулы O11, Формулы O12, Формулы O13, Формулы O14, Формулы O15, Формулы O16, Формулы O17, Формулы O18, Формулы O19, Формулы O20, Формулы O21, Формулы O22, Формулы O23, Формулы O24, Формулы O25, Формулы O25b, Формулы O26, Формулы O27, Формулы O28, Формулы O29, Формулы O30, Формулы O32, Формулы O33, Формулы O34, Формулы O35, Формулы O36, Формулы O37, Формулы O38, Формулы O39, Формулы O40, Формулы O41, Формулы O42, Формулы O43, Формулы O44, Формулы O45, Формулы O46, Формулы O48, Формулы O49, Формулы O50, Формулы O51, Формулы O52, Формулы O53, Формулы O54, Формулы O55, Формулы O56, Формулы O57, Формулы O58, Формулы O59, Формулы O60, Формулы O61, Формулы O62, Формулы O63, Формулы O64, Формулы O65, Формулы O66, Формулы O68, Формулы O69, Формулы O70, Формулы O71, Формулы O73, Формулы O74, Формулы O75, Формулы O76, Формулы O77, Формулы O78, Формулы O79, Формулы O80, Формулы O81, Формулы O82, Формулы O83, Формулы O84, Формулы O85, Формулы O86, Формулы O87, Формулы O88, Формулы O89, Формулы O90, Формулы O91, Формулы O92, Формулы O93, Формулы O95, Формулы O96, Формулы O97, Формулы O98, Формулы O99, Формулы O100, Формулы O101, Формулы O102, Формулы O103, Формулы O104, Формулы O105, Формулы O106, Формулы O107, Формулы O108, Формулы O109, Формулы O110, Формулы O111, Формулы O112, Формулы O113, Формулы O114, Формулы O115, Формулы O116, Формулы O117, Формулы O118, Формулы O119, Формулы O120, Формулы O121, Формулы O123, Формулы O124, Формулы O125, Формулы O126, Формулы O127, Формулы O128, Формулы O129, Формулы O130, Формулы O131, Формулы O132, Формулы O133, Формулы O134, Формулы O135, Формулы O136, Формулы O137, Формулы O138, Формулы O139, Формулы O140, Формулы O141, Формулы O142, Формулы O143, Формулы O144, O145, Формулы O146,

Формулы O147, Формулы O148, Формулы O149, Формулы O150, Формулы O151, Формулы O152, Формулы O153, Формулы O154, Формулы O155, Формулы O156, Формулы O157, Формулы O158, Формулы O159, Формулы O160, Формулы O161, Формулы O162, Формулы O163, Формулы O164, Формулы O165, Формулы O166, Формулы O167, Формулы O168, Формулы O169, Формулы O170, Формулы O171, Формулы O172, Формулы O173, Формулы O174, Формулы O175, Формулы O176, Формулы O177, Формулы O178, Формулы O179, Формулы O180, Формулы O181, Формулы O182, Формулы O183, Формулы O184, Формулы O185, Формулы O186 и Формулы O187, где n представляет собой целое число от 5 до 1000.

C126. Композиция по п. C123, где указанный сахарид содержит по меньшей мере на 5 повторяющихся звеньев больше по сравнению с O-полисахаридом дикого типа.

C127. Композиция по п.С1, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый разбавитель.

C128. Композиция по п. C123, дополнительно содержащая адъювант.

C129. Композиция по п. C123, дополнительно содержащая алюминий.

C130. Композиция по п. C123, дополнительно содержащая QS-21.

C131. Композиция по п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, где композиция не содержит адъювант.

C132. Способ индуцирования иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту композиции по п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**

C133. Композиция по п.С123, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый разбавитель.

C134. Способ индуцирования иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту композиции по п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**

C135. Способ по п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.** или **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, где иммунный ответ включает индуцирование сывороточного антитела, специфичного к O-полисахариду *E. coli*.

C136. Способ по п. C135, где сывороточное антитело, специфичное к O-полисахариду *E. coli*, представляет собой антитело IgG.

C137. Способ по п. C135, где сывороточное антитело, специфичное к O-полисахариду *E. coli*, представляет собой антитело IgG, обладающее бактерицидной активностью против *E. coli*.

C138. Иммуногенная композиция, содержащая полипептид, имеющий

происхождение из FimH, или его фрагмент; и сахарид, имеющий происхождение из *E. coli*, конъюгированный с белком-носителем через спейсер (2-((2-оксоэтил)тио)этил)карбамат (eTEC), где полисахарид ковалентно связан со спейсером eTEC посредством карбаматной связи, и где белок-носитель ковалентно связан со спейсером eTEC посредством амидной связи.

C139. Иммуногенная композиция по п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель.

C140. Иммуногенная композиция по п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, где сахарид представляет собой O-антиген, имеющий происхождение из *E. coli*.

C141. Композиция по п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, где сахарид содержит структуру, выбранную из: Формулы O1, Формулы O2, Формулы O3, Формулы O4, Формулы O5, Формулы O6, Формулы O7, Формулы O8, Формулы O9, Формулы O10, Формулы O11, Формулы O12, Формулы O13, Формулы O14, Формулы O15, Формулы O16, Формулы O17, Формулы O18, Формулы O19, Формулы O20, Формулы O21, Формулы O22, Формулы O23, Формулы O24, Формулы O25, Формулы O25b, Формулы O26, Формулы O27, Формулы O28, Формулы O29, Формулы O30, Формулы O32, Формулы O33, Формулы O34, Формулы O35, Формулы O36, Формулы O37, Формулы O38, Формулы O39, Формулы O40, Формулы O41, Формулы O42, Формулы O43, Формулы O44, Формулы O45, Формулы O46, Формулы O48, Формулы O49, Формулы O50, Формулы O51, Формулы O52, Формулы O53, Формулы O54, Формулы O55, Формулы O56, Формулы O57, Формулы O58, Формулы O59, Формулы O60, Формулы O61, Формулы O62, Формулы O63, Формулы O64, Формулы O65, Формулы O66, Формулы O68, Формулы O69, Формулы O70, Формулы O71, Формулы O73, Формулы O74, Формулы O75, Формулы O76, Формулы O77, Формулы O78, Формулы O79, Формулы O80, Формулы O81, Формулы O82, Формулы O83, Формулы O84, Формулы O85, Формулы O86, Формулы O87, Формулы O88, Формулы O89, Формулы O90, Формулы O91, Формулы O92, Формулы O93, Формулы O95, Формулы O96, Формулы O97, Формулы O98, Формулы O99, Формулы O100, Формулы O101, Формулы O102, Формулы O103, Формулы O104, Формулы O105, Формулы O106, Формулы O107, Формулы O108, Формулы O109, Формулы O110, Формулы O111, Формулы O112, Формулы O113, Формулы O114, Формулы O115, Формулы O116, Формулы O117, Формулы O118, Формулы O119, Формулы O120, Формулы O121, Формулы O123,

Формулы O124, Формулы O125, Формулы O126, Формулы O127, Формулы O128, Формулы O129, Формулы O130, Формулы O131, Формулы O132, Формулы O133, Формулы O134, Формулы O135, Формулы O136, Формулы O137, Формулы O138, Формулы O139, Формулы O140, Формулы O141, Формулы O142, Формулы O143, Формулы O144, O145, Формулы O146, Формулы O147, Формулы O148, Формулы O149, Формулы O150, Формулы O151, Формулы O152, Формулы O153, Формулы O154, Формулы O155, Формулы O156, Формулы O157, Формулы O158, Формулы O159, Формулы O160, Формулы O161, Формулы O162, Формулы O163, Формулы O164, Формулы O165, Формулы O166, Формулы O167, Формулы O168, Формулы O169, Формулы O170, Формулы O171, Формулы O172, Формулы O173, Формулы O174, Формулы O175, Формулы O176, Формулы O177, Формулы O178, Формулы O179, Формулы O180, Формулы O181, Формулы O182, Формулы O183, Формулы O184, Формулы O185, Формулы O186 и Формулы O187, где n представляет собой целое число от 5 до 1000.

C142. Иммуногенная композиция по п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, где сахарид имеет степень O-ацетилирования от 75 до 100%.

C143. Иммуногенная композиция по п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, где белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇.

C144. Иммуногенная композиция по п. C143, где CRM₁₉₇ содержит от 2 до 20 остатков лизина, ковалентно связанных с полисахаридом через спейсер eTEC.

C145. Иммуногенная композиция по п. C143, где CRM₁₉₇ содержит от 4 до 16 остатков лизина, ковалентно связанных с полисахаридом через спейсер eTEC.

C146. Иммуногенная композиция по п. C14338, дополнительно содержащая дополнительный антиген.

C147. Иммуногенная композиция по п. C14338, дополнительно содержащая адъювант.

C148. Иммуногенная композиция по п. C147, где адъювант представляет собой адъювант на основе алюминия, выбранный из группы, состоящей из фосфата алюминия, сульфата алюминия и гидроксида алюминия.

C149. Иммуногенная композиция по п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, где композиция не содержит адъювант.

C150. Иммуногенная композиция, содержащая полипептид, имеющий происхождение из FimH, или его фрагмент; и гликоконъюгат, содержащий сахарид,

имеющий происхождение из *E. coli*, конъюгированный с белком-носителем, где гликоконъюгат получен с использованием восстановительного аминирования.

C151. Иммуногенная композиция по п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель.

C152. Иммуногенная композиция по п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, где сахарид представляет собой O-антиген, имеющий происхождение из *E. coli*.

C153. Иммуногенная композиция по п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, где сахарид содержит структуру, выбранную из: Формулы O1, Формулы O2, Формулы O3, Формулы O4, Формулы O5, Формулы O6, Формулы O7, Формулы O8, Формулы O9, Формулы O10, Формулы O11, Формулы O12, Формулы O13, Формулы O14, Формулы O15, Формулы O16, Формулы O17, Формулы O18, Формулы O19, Формулы O20, Формулы O21, Формулы O22, Формулы O23, Формулы O24, Формулы O25, Формулы O25b, Формулы O26, Формулы O27, Формулы O28, Формулы O29, Формулы O30, Формулы O32, Формулы O33, Формулы O34, Формулы O35, Формулы O36, Формулы O37, Формулы O38, Формулы O39, Формулы O40, Формулы O41, Формулы O42, Формулы O43, Формулы O44, Формулы O45, Формулы O46, Формулы O48, Формулы O49, Формулы O50, Формулы O51, Формулы O52, Формулы O53, Формулы O54, Формулы O55, Формулы O56, Формулы O57, Формулы O58, Формулы O59, Формулы O60, Формулы O61, Формулы O62, Формулы O63, Формулы O64, Формулы O65, Формулы O66, Формулы O68, Формулы O69, Формулы O70, Формулы O71, Формулы O73, Формулы O74, Формулы O75, Формулы O76, Формулы O77, Формулы O78, Формулы O79, Формулы O80, Формулы O81, Формулы O82, Формулы O83, Формулы O84, Формулы O85, Формулы O86, Формулы O87, Формулы O88, Формулы O89, Формулы O90, Формулы O91, Формулы O92, Формулы O93, Формулы O95, Формулы O96, Формулы O97, Формулы O98, Формулы O99, Формулы O100, Формулы O101, Формулы O102, Формулы O103, Формулы O104, Формулы O105, Формулы O106, Формулы O107, Формулы O108, Формулы O109, Формулы O110, Формулы O111, Формулы O112, Формулы O113, Формулы O114, Формулы O115, Формулы O116, Формулы O117, Формулы O118, Формулы O119, Формулы O120, Формулы O121, Формулы O123, Формулы O124, Формулы O125, Формулы O126, Формулы O127, Формулы O128, Формулы O129, Формулы O130, Формулы O131, Формулы O132, Формулы O133, Формулы O134, Формулы O135, Формулы O136, Формулы O137,

Формулы O138, Формулы O139, Формулы O140, Формулы O141, Формулы O142, Формулы O143, Формулы O144, O145, Формулы O146, Формулы O147, Формулы O148, Формулы O149, Формулы O150, Формулы O151, Формулы O152, Формулы O153, Формулы O154, Формулы O155, Формулы O156, Формулы O157, Формулы O158, Формулы O159, Формулы O160, Формулы O161, Формулы O162, Формулы O163, Формулы O164, Формулы O165, Формулы O166, Формулы O167, Формулы O168, Формулы O169, Формулы O170, Формулы O171, Формулы O172, Формулы O173, Формулы O174, Формулы O175, Формулы O176, Формулы O177, Формулы O178, Формулы O179, Формулы O180, Формулы O181, Формулы O182, Формулы O183, Формулы O184, Формулы O185, Формулы O186 и Формулы O187, где *n* представляет собой целое число от 5 до 1000.

C154. Иммуногенная композиция по п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, где сахарид имеет степень O-ацетилирования от 75 до 100%.

C155. Иммуногенная композиция по п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, где белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇.

C156. Иммуногенная композиция по п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, дополнительно содержащая дополнительный антиген.

C157. Иммуногенная композиция по п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, дополнительно содержащая адъювант.

C158. Иммуногенная композиция по п. C157, где адъювант представляет собой адъювант на основе алюминия, выбранный из группы, состоящей из фосфата алюминия, сульфата алюминия и гидроксида алюминия.

C159. Иммуногенная композиция по п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, где композиция не содержит адъювант.

C160. Способ индуцирования иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту композиции по любому из п.п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**-C159.

C161. Способ по п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, где иммунный ответ включает индуцирование сывороточного антитела, специфичного к O-полисахариду *E. coli*.

C162. Способ по п. C135, где сывороточное антитело, специфичное к O-полисахариду *E. coli*, представляет собой антитело IgG.

C163. Способ по п. C135, где сывороточное антитело, специфичное к O-

полисахариду *E. coli*, представляет собой антитело IgG, обладающее бактерицидной активностью против *E. coli*.

C164. Композиция, содержащая полипептид, имеющий происхождение из FimH, или его фрагмент; и сахарид, содержащий структуру, выбранную из любой из: Формулы O1, Формулы O1A, Формулы O1B, Формулы O1C, Формулы O2, Формулы O3, Формулы O4, Формулы O4:K52, Формулы O4:K6, Формулы O5, Формулы O5ab, Формулы O5ac, Формулы O6, Формулы O6:K2; K13; K15, Формулы O6:K54, Формулы O7, Формулы O8, Формулы O9, Формулы O10, Формулы O11, Формулы O12, Формулы O13, Формулы O14, Формулы O15, Формулы O16, Формулы O17, Формулы O18, Формулы O18A, Формулы O18ac, Формулы O18A1, Формулы O18B, Формулы O18B1, Формулы O19, Формулы O20, Формулы O21, Формулы O22, Формулы O23, Формулы O23A, Формулы O24, Формулы O25, Формулы O25a, Формулы O25b, Формулы O26, Формулы O27, Формулы O28, Формулы O29, Формулы O30, Формулы O32, Формулы O33, Формулы O34, Формулы O35, Формулы O36, Формулы O37, Формулы O38, Формулы O39, Формулы O40, Формулы O41, Формулы O42, Формулы O43, Формулы O44, Формулы O45, Формулы O45, Формулы O45rel, Формулы O46, Формулы O48, Формулы O49, Формулы O50, Формулы O51, Формулы O52, Формулы O53, Формулы O54, Формулы O55, Формулы O56, Формулы O57, Формулы O58, Формулы O59, Формулы O60, Формулы O61, Формулы O62, Формулы O62D₁, Формулы O63, Формулы O64, Формулы O65, Формулы O66, Формулы O68, Формулы O69, Формулы O70, Формулы O71, Формулы O73, Формулы O73, Формулы O74, Формулы O75, Формулы O76, Формулы O77, Формулы O78, Формулы O79, Формулы O80, Формулы O81, Формулы O82, Формулы O83, Формулы O84, Формулы O85, Формулы O86, Формулы O87, Формулы O88, Формулы O89, Формулы O90, Формулы O91, Формулы O92, Формулы O93, Формулы O95, Формулы O96, Формулы O97, Формулы O98, Формулы O99, Формулы O100, Формулы O101, Формулы O102, Формулы O103, Формулы O104, Формулы O105, Формулы O106, Формулы O107, Формулы O108, Формулы O109, Формулы O110, Формулы O111, Формулы O112, Формулы O113, Формулы O114, Формулы O115, Формулы O116, Формулы O117, Формулы O118, Формулы O119, Формулы O120, Формулы O121, Формулы O123, Формулы O124, Формулы O125, Формулы O126, Формулы O127, Формулы O128, Формулы O129, Формулы O130, Формулы O131, Формулы O132, Формулы O133, Формулы O134, Формулы O135, Формулы O136, Формулы O137, Формулы O138, Формулы O139, Формулы O140, Формулы O141,

Формулы O142, Формулы O143, Формулы O144, Формулы O145, Формулы O146, Формулы O147, Формулы O148, Формулы O149, Формулы O150, Формулы O151, Формулы O152, Формулы O153, Формулы O154, Формулы O155, Формулы O156, Формулы O157, Формулы O158, Формулы O159, Формулы O160, Формулы O161, Формулы O162, Формулы O163, Формулы O164, Формулы O165, Формулы O166, Формулы O167, Формулы O168, Формулы O169, Формулы O170, Формулы O171, Формулы O172, Формулы O173, Формулы O174, Формулы O175, Формулы O176, Формулы O177, Формулы O178, Формулы O179, Формулы O180, Формулы O181, Формулы O182, Формулы O183, Формулы O184, Формулы O185, Формулы O186, Формулы O187, где *n* превышает количество повторяющихся звеньев в соответствующем полисахариде *E. coli* дикого типа.

C165. Композиция по п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, где *n* представляет собой целое число от 31 до 100.

C166. Композиция по п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, где сахарид содержит структуру по любой из Формулы O1A, Формулы O1B и Формулы O1C, Формулы O2, Формулы O6 и Формулы O25B.

C167. Композиция по п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, где сахарид продуцирован в рекомбинантной клетке-хозяине, экспрессирующей белок семейства wzz, последовательность которого обладает идентичностью по меньшей мере 90% с любой из SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 39.

C168. Композиция по п. C167, где белок содержит любую из SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34.

C169. Сахарид по п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, где сахарид является искусственно синтезированным.

C170. Композиция, содержащая полипептид, имеющий происхождение из FimH, или его фрагмент; и конъюгат, содержащий белок-носитель, ковалентно связанный с сахаридом, где указанный сахарид содержит структуру, выбранную из любой из: Формулы O1, Формулы O1A, Формулы O1B, Формулы O1C, Формулы O2, Формулы O3, Формулы O4, Формулы O4:K52, Формулы O4:K6, Формулы O5, Формулы O5ab, Формулы O5ac, Формулы O6, Формулы O6:K2; K13; K15, Формулы O6:K54, Формулы O7, Формулы O8, Формулы O9, Формулы O10, Формулы O11, Формулы O12, Формулы O13, Формулы O14, Формулы O15, Формулы O16, Формулы O17, Формулы O18,

Формулы O186, Формулы O187, где n представляет собой целое число от 1 до 100.

C171. Композиция по п. C170, где сахарид содержит любую из: Формулы O25b, Формулы O1A, Формулы O2 и Формулы O6.

C172. Композиция по п. C170, где сахарид дополнительно содержит любую из группировки R1 *E. coli*, группировки R2 *E. coli*, группировки R3 *E. coli*, группировки R4 *E. coli* и группировки K-12 *E. coli*.

C173. Композиция по п. C170, где сахарид не содержит дополнительно любую из группировки R1 *E. coli*, группировки R2 *E. coli*, группировки R3 *E. coli*, группировки R4 *E. coli* и группировки K-12 *E. coli*. Композиция по п. C170, где сахарид не содержит дополнительно группировку R2 *E. coli*.

C174. Композиция по п. C170, где сахарид дополнительно содержит группировку 3-дезоксид-*D*-манно-окт-2-улозоновой кислоты (KDO).

C175. Композиция по п. C170, где белок-носитель выбран из любого из поли(L-лизина), CRM₁₉₇, фрагмента В дифтерийного токсина (DTFB), DTFB C8, дифтерийного анатоксина (DT), столбнячного анатоксина (TT), фрагмента С из TT, коклюшного анатоксина, холерного анатоксина или экзотоксина А из *Pseudomonas aeruginosa*; обезвреженного экзотоксина А из *P. aeruginosa* (EPA), мальтозо-связывающего белка (MBP), обезвреженного гемолизина А из *S. aureus*, агглютинирующего фактора А, агглютинирующего фактора В, субъединицы В холерного токсина (CTB), пневмолизина *Streptococcus pneumoniae* и их обезвреженных вариантов, ActA *C. jejuni* и естественных гликопротеинов *C. jejuni*.

C176. Композиция по п. C170, где белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇.

C177. Композиция по п. C170, где белок-носитель представляет собой столбнячный анатоксин.

C178. Композиция по п. C170, где соотношение сахара к белку составляет по меньшей мере 0,5 и самое большее 2.

C179. Композиция по п. C170, где конъюгат получен путем восстановительного аминирования.

C180. Композиция по п. C170, где сахарид конъюгирован с белком-носителем через спейсер (2-((2-оксоэтил)тио)этил)карбамат (eTEC).

C181. Композиция по п. C170, где сахарид представляет собой сахарид, конъюгированный по одному концу.

C182. Композиция по п. C170, где сахарид конъюгирован с белком-носителем

через остаток 3-дезоксид-манно-окт-2-улозоновой кислоты (KDO).

C183. Композиция по п. C170, где конъюгат получен посредством химии CDAP.

C184. Композиция, содержащая полипептид, имеющий происхождение из FimH, или его фрагмент; и (а) конъюгат, содержащий белок-носитель, ковалентно связанный с сахаридом, содержащим Формулу O25b, где n представляет собой целое число от 31 до 90, (б) конъюгат, содержащий белок-носитель ковалентно связанный с сахаридом, содержащим Формулу O1A, где n представляет собой целое число от 31 до 90, (в) конъюгат, содержащий белок-носитель, ковалентно связанный с сахаридом, содержащим Формулу O2, где n представляет собой целое число от 31 до 90, и (г) конъюгат, содержащий белок-носитель, ковалентно связанный с сахаридом, содержащим Формулу O6, где n представляет собой целое число от 31 до 90.

C185. Композиция по п. C184, дополнительно содержащая конъюгат, содержащий белок-носитель, ковалентно связанный с сахаридом, содержащим структуру, выбранную из любой из следующих: Формула O15, Формула O16, Формула O17, Формула O18 и Формула O75, где n представляет собой целое число от 31 до 90.

C186. Композиция по п. C184, содержащая самое большее приблизительно 25% свободного сахара относительно общего количества сахара в композиции.

C187. Способ индуцирования иммунного ответа против *Escherichia coli* у млекопитающего, включающий введение указанному млекопитающему эффективного количества композиции по любому из п.п. **Ошибка! Источник ссылки не найден.-**
Ошибка! Источник ссылки не найден.б.

C188. Способ по п. C187, где иммунный ответ включает опсонофагоцитарные антитела против *E. coli*.

C189. Способ по п. C187, где иммунный ответ защищает млекопитающего от инфекции *E. coli*.

C190. Клетка млекопитающего, содержащая (а) первый ген, представляющий интерес, кодирующий полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент, где ген интегрирован между по меньшей мере двумя целевыми сайтами рекомбинации (RTS).

C191. Воплощение по п. C190, где два RTS интегрированы в хромосому в локусе NL1 или локусе NL2.

C192. Воплощение по п. C190, где первый ген, представляющий интерес, дополнительно содержит репортерный ген, ген, кодирующий трудно экспрессируемый

белок, и вспомогательный ген или их комбинацию.

С193. Воплощение по п. С190, дополнительно включающее второй ген, представляющий интерес, интегрированный во второй хромосомный локус, отличный от локуса (а), где второй ген, представляющий интерес, содержит репортерный ген, ген, кодирующий трудно экспрессируемый белок, и вспомогательный ген или их комбинацию.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантная клетка млекопитающего, содержащая полинуклеотид, кодирующий полипептид, имеющий происхождение из *E. coli*, или его фрагмент.
2. Рекомбинантная клетка по п. 1, где указанный полипептид имеет происхождение из антигена Н фимбрий (FimH) *E. coli*.
3. Рекомбинантная клетка по п. 2, где указанный полипептид содержит остаток фенилаланина на N-конце полипептида.
4. Рекомбинантная клетка по п. 2, где указанный полипептид содержит остаток фенилаланина в пределах первых 20 положений остатков с N-конца.
5. Рекомбинантная клетка по п. 2, где указанный полипептид содержит остаток фенилаланина в положении 1 полипептида.
6. Рекомбинантная клетка по п. 5, где указанный полипептид не содержит остаток глицина непосредственно перед остатком фенилаланина в положении 1 полипептида.
7. Рекомбинантная клетка по п. 2, где указанный полипептид не содержит сайт N-гликозилирования в положении 7 полипептида.
8. Рекомбинантная клетка по п. 6, где указанный полипептид не содержит остаток Asn в положении 7 полипептида.
9. Рекомбинантная клетка по п. 8, где указанный полипептид содержит остаток, выбранный из группы, состоящей из Ser, Asp, Thr и Gln, в положении 7.
10. Рекомбинантная клетка по п. 5, где указанный полипептид не содержит сайт N-гликозилирования в положении 70 полипептида.
11. Рекомбинантная клетка по п. 10, где указанный полипептид не содержит остаток Asn в положении 70 полипептида.
12. Рекомбинантная клетка по п. 10, где указанный полипептид не содержит остаток Ser в положении 70 полипептида.
13. Рекомбинантная клетка по п. 1, где указанный полипептид содержит замену остатка, выбранного из группы, состоящей из Ser, Asp, Thr и Gln, в сайте N-гликозилирования полипептида.
14. Рекомбинантная клетка по п. 13, где сайт N-гликозилирования содержит положение N235 полипептида.
15. Рекомбинантная клетка по п. 13, где сайт N-гликозилирования содержит

положение N228 полипептида.

16. Рекомбинантная клетка по п. 13, где сайт N-гликозилирования содержит положение N235 и положение N228 полипептида.

17. Рекомбинантная клетка по п. 2, где указанный полипептид содержит SEQ ID NO: 3.

18. Рекомбинантная клетка по п. 2, где указанный полипептид содержит SEQ ID NO: 2.

19. Рекомбинантная клетка по п. 1, где указанный полипептид содержит остаток алифатической гидрофобной аминокислоты в положении 1 полипептида.

20. Рекомбинантная клетка по п. 19, где остаток алифатической гидрофобной аминокислоты выбран из группы, состоящей из Ile, Leu и Val.

21. Рекомбинантная клетка по п. 1, где указанный полипептид содержит фрагмент FimH.

22. Рекомбинантная клетка по п. 21, где указанный полипептид содержит лектиновый домен FimH.

23. Рекомбинантная клетка по п. 22, где лектиновый домен имеет массу приблизительно 17022 Дальтон.

24. Рекомбинантная клетка по п. 1, где указанный полипептид находится в комплексе с полипептидом FimC или его фрагментом.

25. Рекомбинантная клетка по п. 24, где указанный полипептид FimC или его фрагмент содержит остаток глицина в положении 37 полипептида FimC или его фрагмента.

26. Рекомбинантная клетка по п. 2, где указанный полипептид находится в низкоаффинной конформации.

27. Рекомбинантная клетка по п. 2, где указанный полипептид стабилизирован посредством FimG.

28. Рекомбинантная клетка по п. 2, где указанный полипептид стабилизирован пептидом донорской цепи FimG (DsG).

29. Рекомбинантная клетка по п. 28, где полинуклеотидная последовательность дополнительно кодирует линкерную последовательность.

30. Рекомбинантная клетка по п. 29, где линкер содержит по меньшей мере 4

аминокислотных остатка и самое большее 15 аминокислотных остатков.

31. Рекомбинантная клетка по п. 29, где линкер содержит по меньшей мере 5 аминокислотных остатков и самое большее 10 аминокислотных остатков.

32. Рекомбинантная клетка по п. 29, где линкер содержит 7 аминокислотных остатков.

33. Рекомбинантная клетка по п. 1, где указанный полипептид не содержит сигнальный пептид, выбранный из группы, состоящей из нативного лидерного пептида FimH, сигнального пептида гемагглютинаина гриппа и сигнального пептида слитого гликопротеина F0 респираторного синцитиального вируса А человека (штамм А2).

34. Рекомбинантная клетка по п. 1, где указанный полипептид содержит последовательность сигнального пептида IgK мышцы.

35. Рекомбинантная клетка по п. 1, где указанный полипептид содержит любую последовательность сигнального пептида, выбранную из сигнального пептида большой субъединицы p51 рецептора FcRn к человеческому IgG и сигнального пептида человеческого белка IL10.

36. Рекомбинантная клетка по п. 2, где указанный полипептид содержит мутацию аргинина на пролин в аминокислотном положении 60 (R60P) согласно нумерации SEQ ID NO: 3.

37. Рекомбинантная клетка по п. 1, где уровень экспрессии указанного полипептида выше, чем уровень экспрессии соответствующего полипептида дикого типа, экспрессируемого в периплазме клетки *E. coli* дикого типа.

38. Рекомбинантная клетка по п. 1, где уровень экспрессии указанного полипептида выше 10 мг/л.

39. Рекомбинантная клетка по п. 1, где полинуклеотидная последовательность интегрирована в геномную ДНК указанной клетки млекопитающего.

40. Рекомбинантная клетка по п. 1, где кодонный состав полинуклеотидной последовательности оптимизирован для экспрессии в клетке.

41. Рекомбинантная клетка по п. 1, где клетка представляет собой эмбриональную клетку почки человека.

42. Рекомбинантная клетка по п. 40, где эмбриональная клетка почки человека включает клетку HEK293.

43. Рекомбинантная клетка по п. 42, где клетка HEK293 выбрана из любой из клеток HEK293T, клеток HEK293TS и клеток HEK293E.

44. Рекомбинантная клетка по п. 1, где клетка представляет собой клетку CHO (клетку яичника китайского хомячка).

45. Рекомбинантная клетка по п. 44, где указанная клетка CHO представляет собой клетку CHO-K1, CHO-DUXB11, клетку CHO-DG44 или клетку CHO-S.

46. Рекомбинантная клетка по п. 1, где указанный полипептид является растворимым.

47. Рекомбинантная клетка по п. 1, где указанный полипептид секретируется из клетки.

48. Рекомбинантная клетка по п. 2, где указанный полипептид содержит замену N28Q согласно нумерации SEQ ID NO: 1.

49. Рекомбинантная клетка по п. 2, где указанный полипептид содержит замену N28D согласно нумерации SEQ ID NO: 1.

50. Рекомбинантная клетка по п. 2, где указанный полипептид содержит замену N28S согласно нумерации SEQ ID NO: 1.

51. Рекомбинантная клетка по п. 2, где указанный полипептид содержит замену, выбранную из любой из N28Q, V48C и L55C согласно нумерации SEQ ID NO: 1.

52. Рекомбинантная клетка по п. 2, где указанный полипептид содержит замену N92S согласно нумерации SEQ ID NO: 1.

53. Рекомбинантная клетка по п. 1, где указанный полипептид, имеющий происхождение из FimH, или его фрагмент содержит замену, выбранную из любой из V48C и L55C согласно нумерации SEQ ID NO: 1.

54. Культура, содержащая рекомбинантную клетку по п. 1, где указанная культура имеет размер по меньшей мере 5 литров.

55. Культура по п. 49, где выход полипептида или его фрагмента составляет по меньшей мере 0,05 г/л.

56. Культура по п. 55, где выход полипептида или его фрагмента составляет по меньшей мере 0,10 г/л.

57. Способ получения полипептида, имеющего происхождение из *E. coli*, или его фрагмента, включающий культивирование рекомбинантной клетки млекопитающего по

п. 1 в подходящих условиях, тем самым экспрессируя полипептид или его фрагмент; и сбор полипептида или его фрагмента.

58. Способ по п. 57, дополнительно включающий очистку полипептида или его фрагмента.

59. Способ по п. 57, где клетка содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую любую из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 27.

60. Способ по п. 57, где выход полипептида или его фрагмента составляет по меньшей мере 0,05 г/л.

61. Способ по п. 57, где выход полипептида или его фрагмента составляет по меньшей мере 0,10 г/л.

62. Композиция, содержащая полипептид, идентичный по меньшей мере на 70% любой из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29.

63. Композиция по п. 62, дополнительно содержащая сахарид, содержащий структуру, выбранную из любой Формулы в Таблице 1.

64. Композиция по п. 63, где сахарид ковалентно связан с белком-носителем.

65. Композиция по п. 64, где белок-носитель выбран из любого из: поли(L-лизина), CRM₁₉₇, фрагмента В дифтерийного токсина (DTFB), DTFB C8, дифтерийного анатоксина (DT), столбнячного анатоксина (TT), фрагмента С из TT, коклюшного анатоксина, холерного анатоксина или экзотоксина А из *Pseudomonas aeruginosa*, обезвреженного экзотоксина А из *P. aeruginosa* (EPA), связывающего мальтозу белка (MBP), обезвреженного гемолизина А из *S. aureus*, агглютинирующего фактора А, агглютинирующего фактора В, субъединицы В холерного токсина (СТВ), пневмолизина *Streptococcus pneumoniae* и их обезвреженных вариантов, *C. jejuni* AcгА и естественных гликопротеинов *C. jejuni*.

66. Композиция по п. 64, где белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇.

67. Композиция по п. 64, где белок-носитель представляет собой столбнячный анатоксин (TT).

68. Композиция по п. 64, где белок-носитель представляет собой поли(L-лизин).

69. Композиция по п. 64, где сахарид ковалентно связан с белком-носителем посредством восстановительного аминирования.

70. Композиция по п. 64, где сахарид ковалентно связан с белком-носителем посредством химии CDAР (1-циано-4-диметиламинопиридиния тетрафторборат).

71. Композиция по п. 64, где сахарид ковалентно связан с белком-носителем посредством конъюгирования по одному концу.

72. Композиция по п. 64, где сахарид ковалентно связан с белком-носителем через спейсер (2-((2-оксоэтил)тио)этил)карбамат (eTEC).

73. Полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 27.

Фиг. 1А

Специфичный к D-маннозе адгезин фимбрий типа 1 [*Escherichia coli* FimH J96 ELL41155.1 [*E.coli* J96]; 300 ак

```

1 MKRVITLFAV LLMGWSVNAW SFACKTANGT AIPIGGGSAN VYVNLAPVVN
  51 VGQNLVVDLS TQIFCHNDYP ETITDYVTLQ RGSAYGGVLS NFSGTVKYSG
 101 SSYPFPTTSE TPRVVYNSRT DKPWPVALYL TPVSSAGGVA IKAGSLIAVL
 151 ILRQTNNYNS DDFQFVWNIY ANNDVVVPTG GCDVSARDVT VTLPDYPGSV
 201 PIPLTVYCAK SQNLGYLSG TTADAGNSIF TNTASFSPAQ GVGVQLTRNG
 251 TIIPANNTVS LGAVGTSAVS LGLTANYART GGQVTAGNVQ SIIGVTFVYQ
(SEQ ID NO: 1)

```

Последовательность FimH J96

```

1 MKRVITLFAV LLMGWSVNAW SFACKTANGT AIPIGGGSAN VYVNLAPVVN
 51 VGQNLVVDLS TQIFCHNDYP ETITDYVTLQ RGSAYGGVLS NFSGTVKYSG
 101 SSYPFPTTSE TPRVVYNSRT DKPWPVALYL TPVSSAGGVA IKAGSLIAVL
 151 ILRQTNNYNS DDFQFVWNIY ANNDVVVPTG GCDVSARDVT VTLPDYPGSV
 201 PIPLTVYCAK SQNLGYLSG TTADAGNSIF TNTASFSPAQ GVGVQLTRNG
 251 TIIPANNTVS LGAVGTSAVS LGLTANYART GGQVTAGNVQ SIIGVTFVYQ (SEQ ID
NO: 1)

```

Фрагмент FimH, соответствующий ак остаткам 22-300 SEQ ID NO: 1 [зрелый белок FimH];

```

1 facktangt aipigggsan vyvnlapvvn vgqnlvvdls tqifchndyp etitdyvtlq
rgsayggvls nfsgtvkysg ssypfpttse tprvvynsrt dkpwpvalyl tpvssaggva
ikagsliavl ilrqtnnyns ddfqfvwniy anndvvvptg gcdvsardvt vtlpdypgsv
pipltvycak sqnlgylsg ttadagnsif tntasfspaq gvgvvqltrng tiipanntvs
lgavgtsavs lgltanyart ggqvtagnvq siigvtfvyq 279 (SEQ ID NO: 2)

```

Лектиновый домен FimH (SEQ ID NO: 3, соответствующая ак остаткам 1-158 SEQ ID NO: 2)

```

1 facktangt aipigggsan vyvnlapvvn vgqnlvvdls tqifchndyp etitdyvtlq
rgsayggvls nfsgtvkysg ssypfpttse tprvvynsrt dkpwpvalyl tpvssaggva
ikagsliavl ilrqtnnyns ddfqfvwniy anndvvv 158 (SEQ ID NO: 3)

```

Фиг. 1А продолжение

Пилиновый домен FimH (SEQ ID NO: 4, соответствующая ак остаткам 160-279 SEQ ID NO: 2)

160 gcdvsardvt vtlpdypgsv pipltvycak sqnlgyylsg ttadagnsif tntasfspaç
gvgvqltrng tiipanntvs lgavgtsavs lgltanyart ggqvtagnvq siigvtfvyq 279
(SEQ ID NO: 4)

pSB02198 -Сигн. пептид mIgK FimH/ F22..Q300 J96 FimH N28S V48C L55C N91S N249Q /
7 AA линкер/ FimG A1..K14 / GGHis8 в pcDNA3.1(+)

VETDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTASGTAIPIGGGSANVYVNLAPCVNVGQNCVVDLSTQI
FCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSSFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPW
PVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSA
RDVTVTLDPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGGVGVQLTR
QGIIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQGGSSGGGAD
VTITVNGKVVAKGGHHHHHHHH (SEQ ID NO: 5)

pSB02307 -Сигн. пептид mIgK FimH/ F22..Q300 J96 FimH N28S N91S N249Q / His8 в
pcDNA3.1(+)

METDT LLLWV LLLWV PGSTG FACKT ASGTA IPIGG GSANV YVNLA PVVNV GQNLV
VDLST QIFCH NDYPE TITDY VTLQR GSAYG GVLSS FSGTV KYSGS SYPFP TTSET
PRVVY NSRTD KPWPV ALYLT PVSSA GGVAI KAGSL IAVLI LRQTN NYNSD DFQFV
WNIYA NNDVV VPTGG CDVSA RDVTV TLPDY PGSVP IPLTV YCAKS QNLGY YLSGT
TADAG NSIFT NTASF SPAQG VGVQL TRQGT IIPAN NTVSL GAVGT SAVSL GLTAN
YARTG GQVTA GNVQS IIGVT FVYQG GSSGG GADVT ITVNG KVVAK GGHHH HHHHH
(SEQ ID NO: 6)

Количество аминокислот: 310 Молекулярная масса: 32095,80 Расчетное значение pI: 7,25

pSB02083 Конструкция лектинового домена FimH дикого типа

METDT LLLWV LLLWV PGSTG FACKT ASGTA IPIGG GSANV YVNLA PVVNV GQNLV
VDLST QIFCH NDYPE TITDY VTLQR GSAYG GVLSS FSGTV KYSGS SYPFP TTSET
PRVVY NSRTD KPWPV ALYLT PVSSA GGVAI KAGSL IAVLI LRQTN NYNSD DFQFV
WNIYA NNDVV VPTGG HHHHHHHH (SEQ ID NO: 7)

pSB02158 Конструкция закрепленного мутанта лектинового домена FimH

METDTLLLWVLLLWVPGSTG FACKT ASGTA IPIGG GSANV YVNLA PCVNV GQNCV
VDLST QIFCH NDYPE TITDY VTLQR GSAYG GVLSS FSGTV KYSGS SYPFP TTSET

Фиг. 1А продолжение

PRVVY NSRTD KPWPV ALYLT PVSSA GGVAI KAGSL IAVLI LRQTN NYNSD DFQFV
WNIYA NNDVV VPTGG HHHHHHHH (SEQ ID NO: 8)

Фиг. 1В

Последовательность FimG A1..K14

ADVTI TVNGK VVAK (SEQ ID NO: 9)

ADVT ITVNG KVVAK GGHHH HHHHH (SEQ ID NO: 21)

Фиг. 1С

Последовательность FimC

1 MSNKNVNVVK SQEITFCLLA GILMFMMAMV AGRAEAGVAL GATRVIPAG
51 QKQVQLAVTN NDENSTYLIQ SWVENADGVK DGRFIVTPPL FAMKGKENT
101 LRILDATNNQ LPQDRESLEW MNVKAIPSMK KSKLTENTLQ LAIISRIKLY
151 YRPAKLALPP DQAAEKLRFK RSANSLTLIN PTPYYLTVTE LNAGTRVLEN
201 ALVPPMGEST VKLPSDAGSN ITYRTINDYG ALTPKMTGVM E (SEQ ID NO: 10)

Фиг. 1D

DNKQ	4 ак	(SEQ ID NO: 11)
GGSGG	5 ак	(SEQ ID NO: 12)
GGSSG G	6 ак	(SEQ ID NO: 13)
GGSSG GG	7 ак	(SEQ ID NO: 14)
GGGSS GGG	8 ак	(SEQ ID NO: 15)
GGGSG SGGG	9 ак	(SEQ ID NO: 16)
GGGSG GSGGG	10 ак	(SEQ ID NO: 17)

Фиг. 1Е

Сигнальная последовательность FimH J96

MKRVI TLFV LLMGW SVNAW S (SEQ ID NO: 18)

pSB02198 - Сигн. пептид mIgK FimH / F22..Q300 J96 FimH N28S V48C L55C N91S N249Q /
7 AA-линкер / FimG A1..K14 / GGH8 в pcDNA3.1(+) [Кол-во аминокислот: 310
[Молекулярная масса: 32089,79. Расчетное значение pI: 7,23]

VETDT LLLWV LLLWV PGSTG (**SEQ ID NO: 19**) FACKT ASGTA IPIGG
GSANV YVNLA PCVNV GQNCV VDLST QIFCH NDYPE TITDY VTLQR
GSAYG GVLSS FSGTV KYSGS SYPFP TTSET PRVYV NSRTD KPWPV
ALYLT PVSSA GGVAI KAGSL IAVLI LRQTN NYNSD DFQFV WNIYA
NNDVV VPTGG CDVSA RDVTV TLPDY PGSVP IPLTV YCAKS QNLGY
YLSGT TADAG NSIFT NTASF SPAQG VGVQL TRQGT IIPAN NTVSL
GAVGT SAVSL GLTAN YARTG GQVTA GNVQS IIGVT FVYQ (**SEQ ID NO:**
20) GGSSG GG (**SEQ ID NO: 14**) ADVTI TVNGK VVAK GGHHH HHHHH
(**SEQ ID NO: 21**)

pSB02307 - Сигн. пептид mIgK FimH / F22..Q300 J96 FimH N28S N91S N249Q / His8 в
pcDNA3.1(+)

METDT LLLWV LLLWV PGSTG (**SEQ ID NO: 22**)
FACKT ASGTA IPIGG GSANV YVNLA PVVNV GQNLV VDLST QIFCH
NDYPE TITDY VTLQR GSAYG GVLSS FSGTV KYSGS SYPFP TTSET
PRVYV NSRTD KPWPV ALYLT PVSSA GGVAI KAGSL IAVLI LRQTN
NYNSD DFQFV WNIYA NNDVV VPTGG CDVSA RDVTV TLPDY PGSVP
IPLTV YCAKS QNLGY YLSGT TADAG NSIFT NTASF SPAQG VGVQL
TRQGT IIPAN NTVSL GAVGT SAVSL GLTAN YARTG GQVTA GNVQS
IIGVT FVYQ (**SEQ ID NO: 23**) GGSSG GG (**SEQ ID NO: 14**)
ADVITVNG KVVAK GGHHH HHHHH (**SEQ ID NO: 21**)

Фиг. 1Е продолж.**pSB02083** Конструкция лектинового домена FimH дикого типа

METDT LLLWV LLLWV PGSTG (SEQ ID NO: 22)
 FACKT ASGTA IPIGG GSANV YVNLA PVVNV GQNLV VDLST QIFCH
 NDYPE TITDY VTLQR GSAYG GVLSS FSGTV KYSGS SYPFP TTSET
 PRVYV NSRTD KPWPV ALYLT PVSSA GGVAI KAGSL IAVLI LRQTN
 NYNSD DFQFV WNIYA NNDVV VPTGG (SEQ ID NO: 24) HHHHH HHH
 (SEQ ID NO: 25)

pSB02158 Конструкция закрепленного мутанта лектинового домена FimH

METDT LLLWV LLLWV PGSTG (SEQ ID NO: 22)
 FACKT ASGTA IPIGG GSANV YVNLA PCVNV GQNCV VDLST QIFCH
 NDYPE TITDY VTLQR GSAYG GVLSS FSGTV KYSGS SYPFP TTSET
 PRVYV NSRTD KPWPV ALYLT PVSSA GGVAI KAGSL IAVLI LRQTN
 NYNSD DFQFV WNIYA NNDVV VPTGG (SEQ ID NO: 26) HHHHHHHH
 (SEQ ID NO: 25)

Фиг. 1F**pSB01878** Прошедшая процессинг последовательность

FACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYP
 ETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPPTTSETPRVYVNSRTD
 KPWPVALYLTVPSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDDFQFVWNIYA
 NNDVVVPTGGHHHHHHHHH (SEQ ID NO: 27)

Потенциально гликозилированные сайты NXS/T указаны жирным шрифтом

pSB02083 Лектиновый домен FimH дикого типа с сигнальным пептидом IgK мыши

METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTASGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYP
 ETITDYVTLQRGSAYGGVLSFSFGTVKYSGSSYPFPPTTSETPRVYVNSRTDKPWPVALYLTVPSSAGGVAIK
 AGSLIAVLILRQTNNYNSDDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGHHHHHHHHH (SEQ ID NO: 7)

Фиг. 1F продолжение

p5802158 Закрепленный мутант лектинового домена FimH с сигнальным пептидом IgK мыши

METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTASGTAIPIGGGSANVYVNLAPCVNVGQNCVVDLSTQIFCHNDYPE
TITDYVTLQRGSAYGGVLSFSFGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAG
SLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGHHHHHHHHH (SEQ ID NO: 8)

Фиг. 1G

Аминокислотная последовательность FimH K12

FACKTANGTAIPIGGGSANV YVNLAPVNVGQNLVVDLST QIFCHNDYPETITDYVTLQR
GSAYGGVLSNFSFGTVKYSGS SYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAI
KAGSLIAVLILRQTNNYNSD DFQFVWNIYANNDVVVPTGG CDVSARDVTVTLPDYPGSVP
IPLTVYCAKSQNLGYYLSGT TADAGNSIFTNTASFSPAQG VGVQLTRNGTIIPANNTVSL
GAVGTSAVSLGLTANYARTG GQVTAGNVQSIIGVTFVYQ* (SEQ ID NO: 28)

Аминокислотная последовательность FimH UTI89, отличающегося от FimH K12

FACKTANGTAIPIGGGSANV YVNLAPAVNVGQNLVVDLST QIFCHNDYPETITDYVTLQR
GAAAYGGVLSFSFGTVKYNGS SYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAI
KAGSLIAVLILRQTNNYNSD DFQFVWNIYANNDVVVPTGG CDVSARDVTVTLPDYPGSVP
IPLTVYCAKSQNLGYYLSGT TADAGNSIFTNTASFSPAQG VGVQLTRNGTIIPANNTVSL
GAVGTSAVSLGLTANYARTG GQVTAGNVQSIIGVTFVYQ* (SEQ ID NO: 29)

Фиг. 1H

Примеры последовательностей wzzB включают:

>O25b 2401 WzzB

MRVENNNVSGQNHDPEQIDLIDLLVQLWRGKMTIIISVIVAIALAIGYLAVAKEKWTSTAITQP
DVGQIAGYNNAMNVIYGQAAPKVSDLQETLIGRFSSAFSALAETLDNQEEPEKLTIEPSVKN
QQLPLTVSYVGQTAEGAQMKLAQYIQQVDDKVNQELEKDLKDNIALGRKNLQDSLRTQEVV
AQEQKDLRIRQIQEALQYANQEQVTKPQVQQTEDVTQDTLFLLGSEALESMIKHEATRPLVF
SSNYQTRQNLLDIESLKVDDLDIHAYRYVMKPTLPIRRDSPKKAITLILAVLLGGMVAGIVL
GRNALRNYNAK (SEQ ID NO: 30)

>O25a:K5:H1 WzzB

MRVENNNVSGQNNNDPEQIDLIDLLVQLWRGKMTIIISVIVAIALAIGYLAVAKEKWTSTAITQP
DVGQIAGYNNAMNVIYGQAAPKVSDLQETLIGRFSSAFSALAETLDNQDEPEKLTIEPSVKN
QQLPLTVSYVGQTAEGAQMKLAQYIQQVDDKVNQELEKDLKDNIALGRKNLQDSLRTQEVV

Фиг. 1Н продолж.

AQEQKDLRIRQIQEALQYANQAQVTKPQIQQTGEDITQDTLFLLGSEALESMIKHEATRPLVF
 SPNYYQTRQNLLDIESLKVDDLDIHAYRYVMKPTLPIRRDSPKKAITLILAVLLGGMVGAGIVL
 GRNALRNYNAK (SEQ ID NO: 31)

>O25a ETEC ATCC WzzB

MRVENNNVSGQNHDPEQIDLIDLLVQLWRGKMTIIISVVVAIALAIGYLAVAKEKWTSTAITQ
 PDVGQIAGYNNAMNVIYGQAAPKVSDLQETLIGRFSSAFSALAETLDNQEPEKLTIEPSVK
 NQQLPLTVSYVGQTAEDAQMKLAQYIQQVDDKVNQELEKDLKDNLALGRKNLQDSLRTQE
 VVAQEQKDLRIRQIQEALQYANQAQVTKPQIQQTGEDITQDTLFLLGSEALESMIKHEATRPL
 VFSPNYYQTRQNLLDIENLKVDDLDIHAYRYVMKPTLPIRRDSPKKAITLILAVLLGGMVGAGI
 VLGRNALRNYNSK (SEQ ID NO: 32)

>K12 W3110 WzzB

MRVENNNVSGQNHDPEQIDLIDLLVQLWRGKMTIIISVIVAIALAIGYLAVAKEKWTSTAITQP
 DVGQIAGYNNAMNVIYGQAAPKVSDLQETLIGRFSSAFSALAETLDNQEEREKLTIEPSVKN
 QQLPLTVSYVGQTAEGAQMKLAQYIQQVDDKVNQELEKDLKDNIALGRKNLQDSLRTQEVV
 AQEQKDLRIRQIQEALQYANQAQVTKPQIQQTGEDITQDTLFLLGSEALESMIKHEATRPLVF
 SPNYYQTRQNLLDIESLKVDDLDIHAYRYVMKPMPLPIRRDSPKKAITLILAVLLGGMVGAGIVL
 GRNALRNYNAK (SEQ ID NO: 33)

>Salmonella LT2 WzzB

MTVDSNTSSGRGNDPEQIDLIELLLQLWRGKMTIIVAVIIAILLAVGYLMIAKEKWTSTAITQP
 DAAQVATYTNALNVLYGGNAPKISEVQANFISRFSSAFSALSEVLDNQKEREKLTIEQSVKG
 QALPLSVSYVSTTAEGAQRRLAEYIQQVDEEVAKELEVLDKDNITLQTKTLQESLETQEVVA
 QEQKDLRIKQIEEALRYADEAKITQPQIQQTQDVTQDTMFLGSDALKSMIQNEATRPLVFS
 PAYYQTKQTLDDIKNLKVTADTVHVYRYVMKPTLPVRRDSPKTAITLVAVLLGGMIGAGIVL
 GRNALRSYKPKAL (SEQ ID NO: 34)

Примеры последовательностей FepE включают:

>O25b GAR2401 FepE

MSSLNIKQGSDAHFPDYPLASPSNNEIDLLNLISVLWRAKKTVMVVFACAGLLISFILPQ
 KWTSAAVVTPEPVQWQELEKSFTKLRVLDLDIKIDRTEAFNLFIKKFQSVSLLEEYLRSSPY
 VMDQLKEAKIDELDLHRAIVALSEKMKAVDDNASKKKDEPSLYTSWTLSTAPTSEEQAQTVL
 SGYIDYISTLVVKESLENVRNKLEIKTQFEKEKLAQDRIKTKNQLDANIQRNLNYSLDIANAAGIK
 KPVYSNGQAVKDDPDFSISLGADGIERKLEIEKAVTDVAELNGELRNRQYLVEQLTKAHVND
 VNFTPFKYQLSPSLPVKKDGPVKAIIVILSALIGGMVACGGVLLRYAMASRKQDAMMADHLV
 (SEQ ID NO: 35)

Фиг. 1Н продолж.

>O25a:K5:H1 FepE

MSSLNIKQGSEAHFPEYPLASPSNNEIDLLNLIIEVLWRAKKTVMVVFACAGLLISFILPQK
 WTSAAVVTPEPVQWQELEKTFTKLRVLDLDIKIDRTEAFNLFIKKFQSVSLLEEYLRSSPYV
 MDQLKEAKIDPLDLHRAIVALSEKMKAVDDNASKKKDESALYTSWTLSFTAPTSEEQAQVLA
 GYIDYISALVVKESIENVRNKLEIKTQFEKEKLAQDRIKTKNQLDANIQRNLNYSLDIANAAGIKK
 PVYSNGQAVKDDPDFSISLGADGIERKLEIEKAVTDVAELNGELRNRQYLVEQLTKTNINDV
 NFTPFPKYQLRPSLPVKKDGGQKAIIVILSALVGGMVACGGVLLRHAMASRKQDAMMADHLV
 (SEQ ID NO: 36)

> O25a ETEC ATCC FepE

MSSLNIKQGSDAHFPDYPLASPSNNEIDLLNLISVLWRAKKTVMVVFACAGLLISFILPQ
 KWTSAAVVTPEPVQWQELEKSFTKLRVLDLDIKIDRTEAFNLFIKKFQSVSLLEEYLRSSPY
 VMDQLKEAKIDELDLHRAIVALSEKMKAVDDNASKKKDEPSLYTSWTLSFTAPTSEEQAQTVL
 SGYIDYISTLVVKESELENVRNKLEIKTQFEKEKLAQDRIKTKNQLDANIQRNLNYSLDIANAAGIK
 KPVYSNGQAVKDDPDFSISLGADGIERKLEIEKAVTDVAELNGELRNRQYLVEQLTKAHVND
 VNFTPFPKYQLSPSLPVKKDGGPGKAIIVILSALIGGMVACGGVLLRYAMASRKQDAMMADHLV
 (SEQ ID NO: 37)

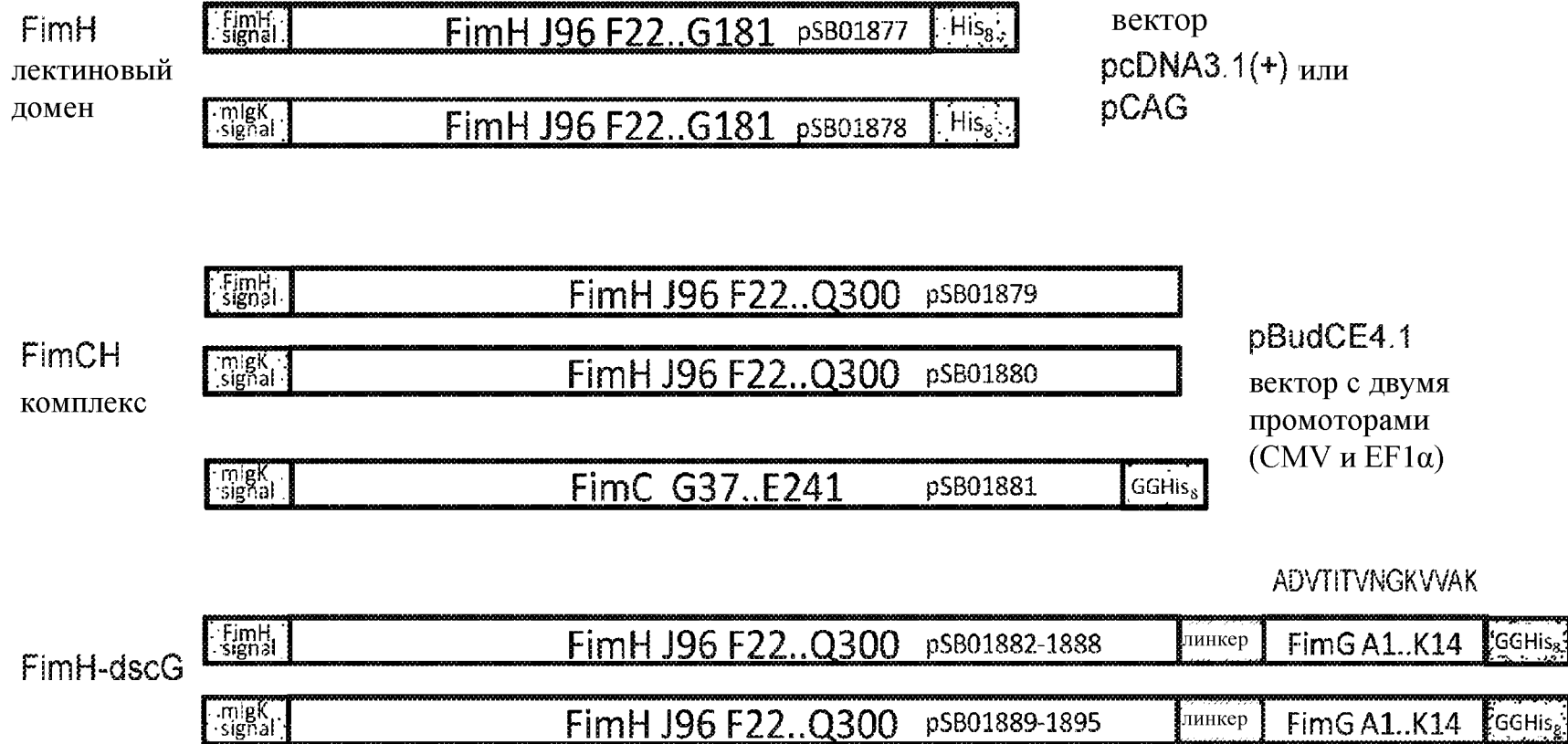
> O157 FepE

MSSLNIKQGSDAHFPDYPLASPSNNEIDLLNLISVLWRAKKTVMVVFACAGLLISFILPQ
 KWTSAAVVTPEPVQWQELEKTFTKLRVLDLDIKIDRTEAFNLFIKKFQSVSLLEEYLRSSPY
 VMDQLKEAKIDELDLHRAIVALSEKMKAVDDNASKKKDEPSLYTSWTLSFTAPTSEEQAQTVL
 SGYIDYISALVVKESIENVRNKLEIKTQFEKEKLAQDRIKMKNQLDANIQRNLNYSLDIANAAGIK
 KPVYSNGQAVKDDPDFSISLGADGIERKLEIEKAVTDVAELNGELRNRQYLVEQLTKANIND
 VNFTPFPKYQLSPSLPVKKDGGPGKAIIVILSALIGGMVACGSVLLRYAMASRKQDAMMADHLV
 (SEQ ID NO: 38)

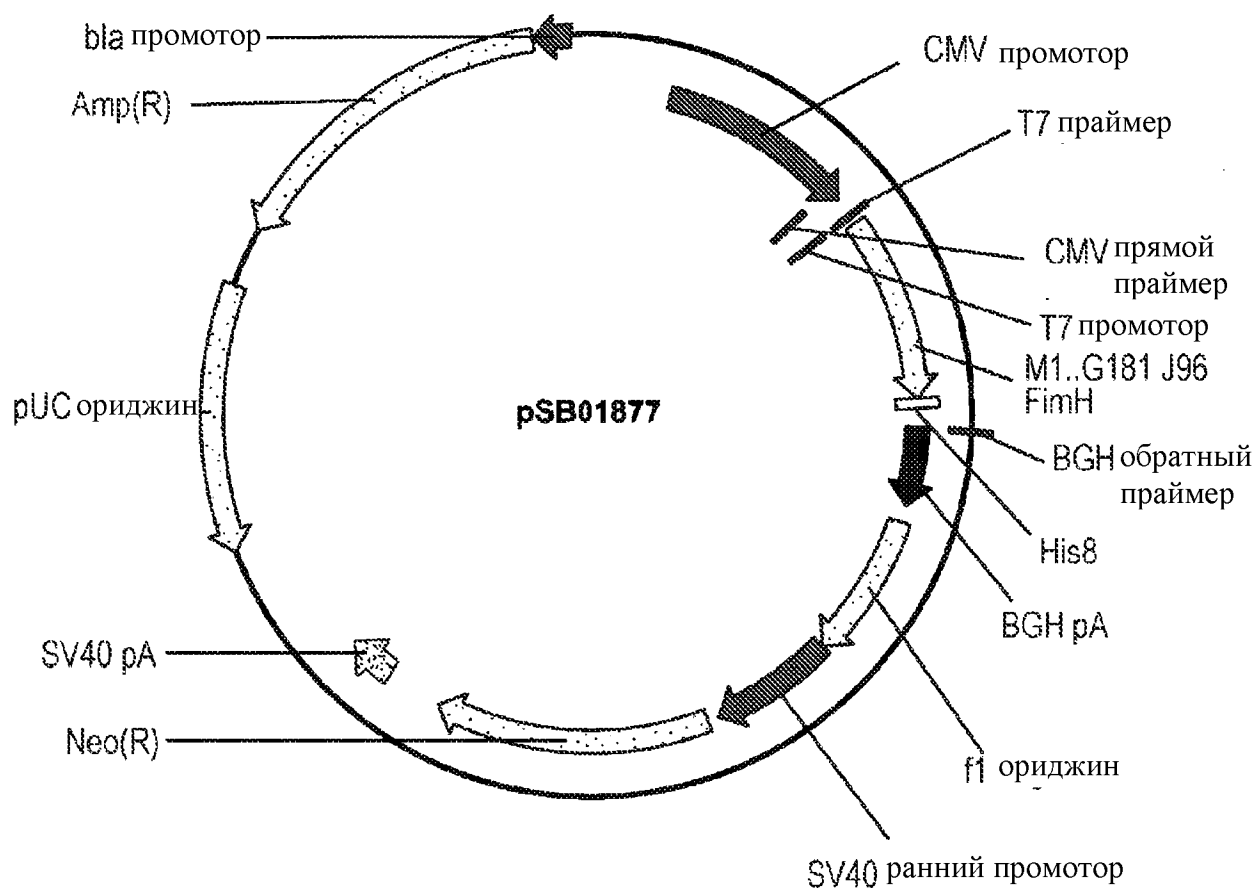
>Salmonella LT2 FepE

MPSLNVKQEKNSFAGYSLPPANSHEIDLFSLIEVLWQAKRRILATVFAFACVGLLLSFLLPQ
 KWTSQAIVTPAESVQWQGLERTLTALRVLDMEVSVDRGSVFNLFIKKFSSPSLLEEYLRSSP
 YVMDQLKGAQIDEQDLHRAIVLLSEKMKAVDSNVGKKNETSLFTSWTLSFTAPTREEAQKV
 LAGYIQYISDIVKETLENIRNQLLEIKTRYEQEKLAMDRVRLKNQLDANIQRNLHYSLEIANAAGI
 KRPVYSNGQAVKDDPDFSISLGADGISRKLEIEKGVTDVAEIDGDLRNRQYHVEQLAAMNV
 SDVKFTPFPKYQLSPSLPVKKDGGPGKAIIVILSALIGGMMACGGVLLRHAMVSRKMENALAIDE
 RLV (SEQ ID NO: 39)

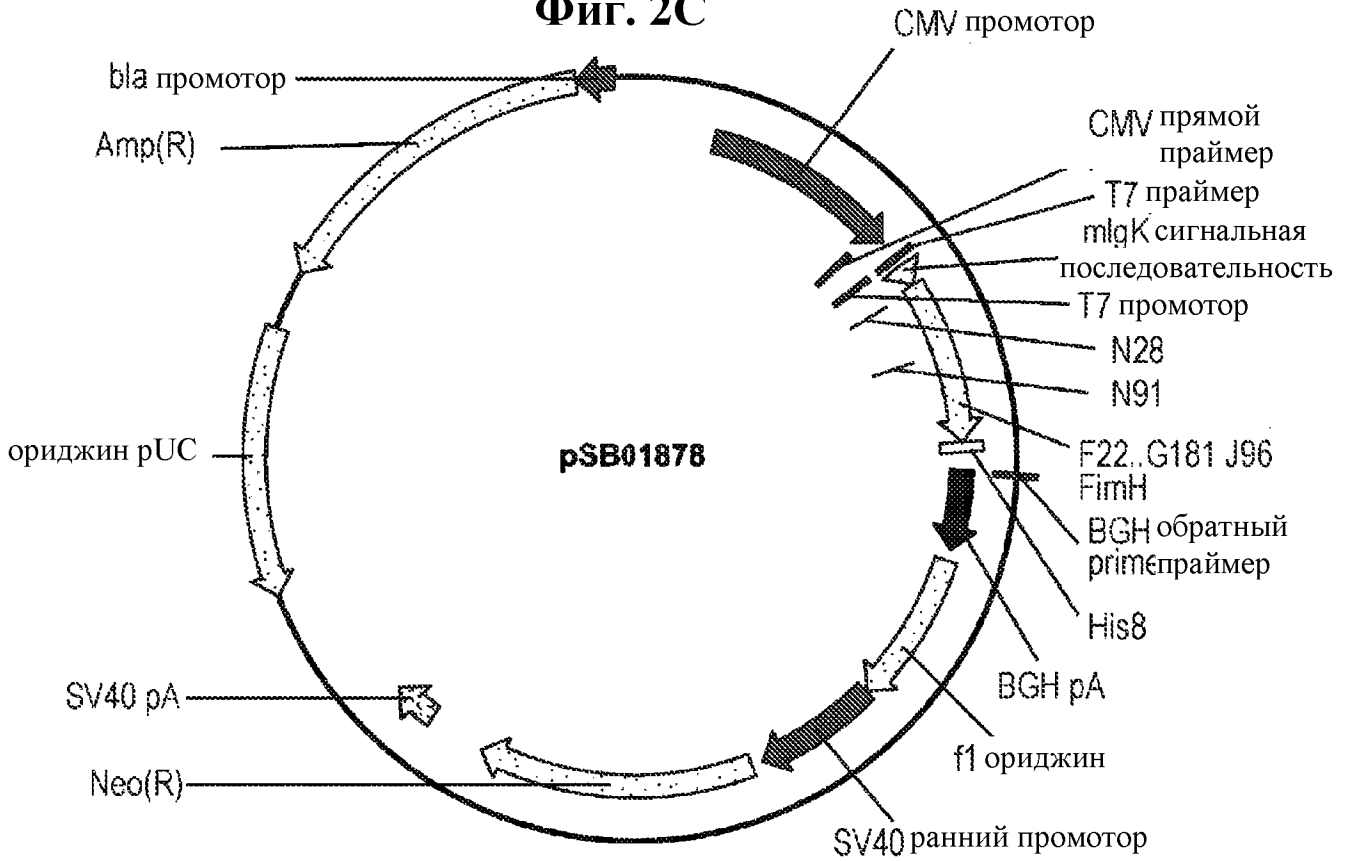
Фиг. 2А



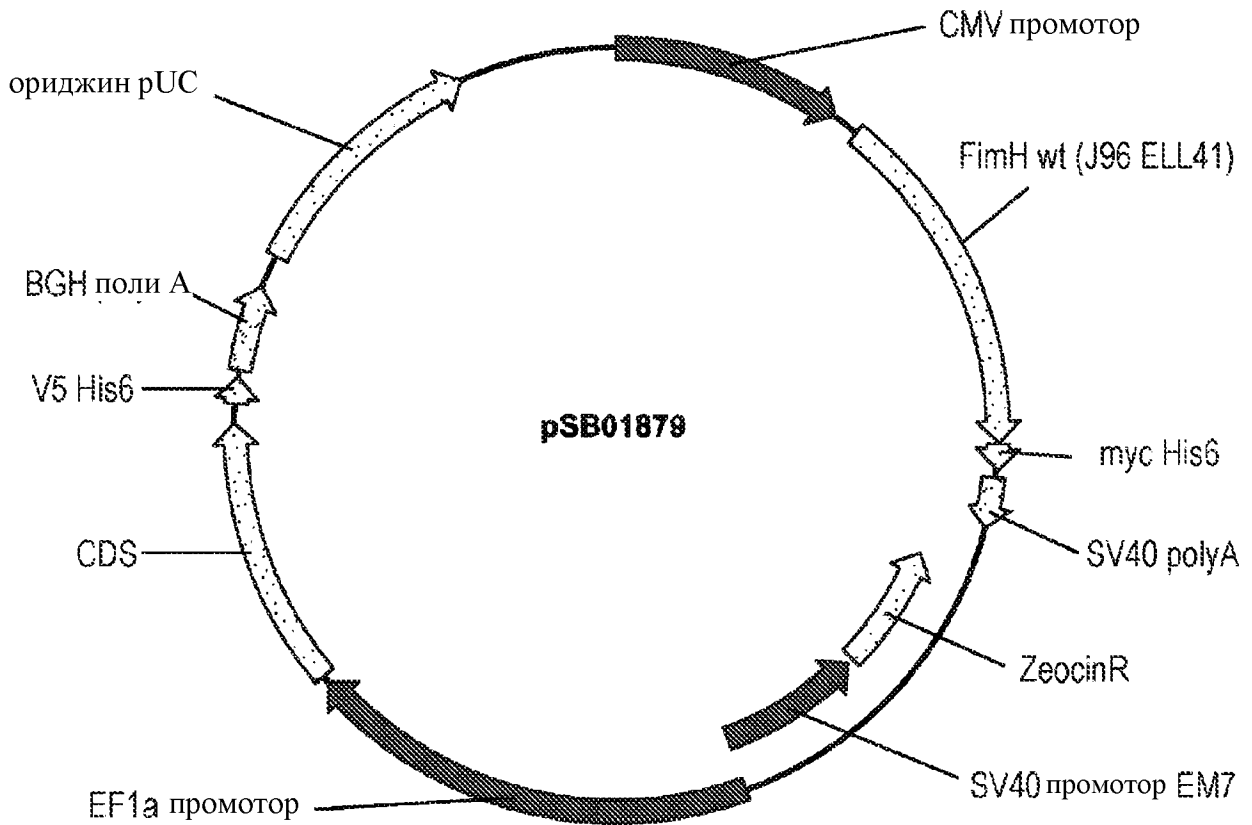
Фиг. 2В



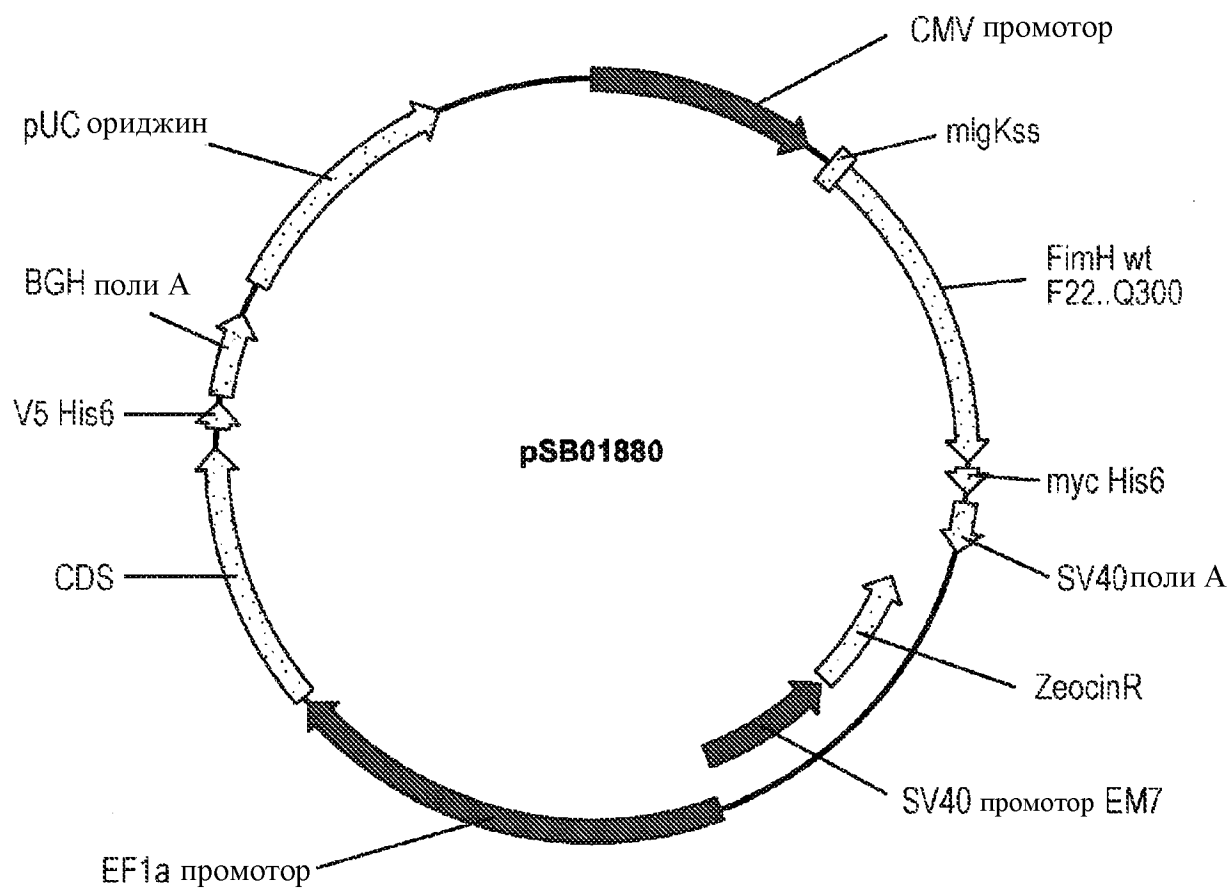
Фиг. 2С



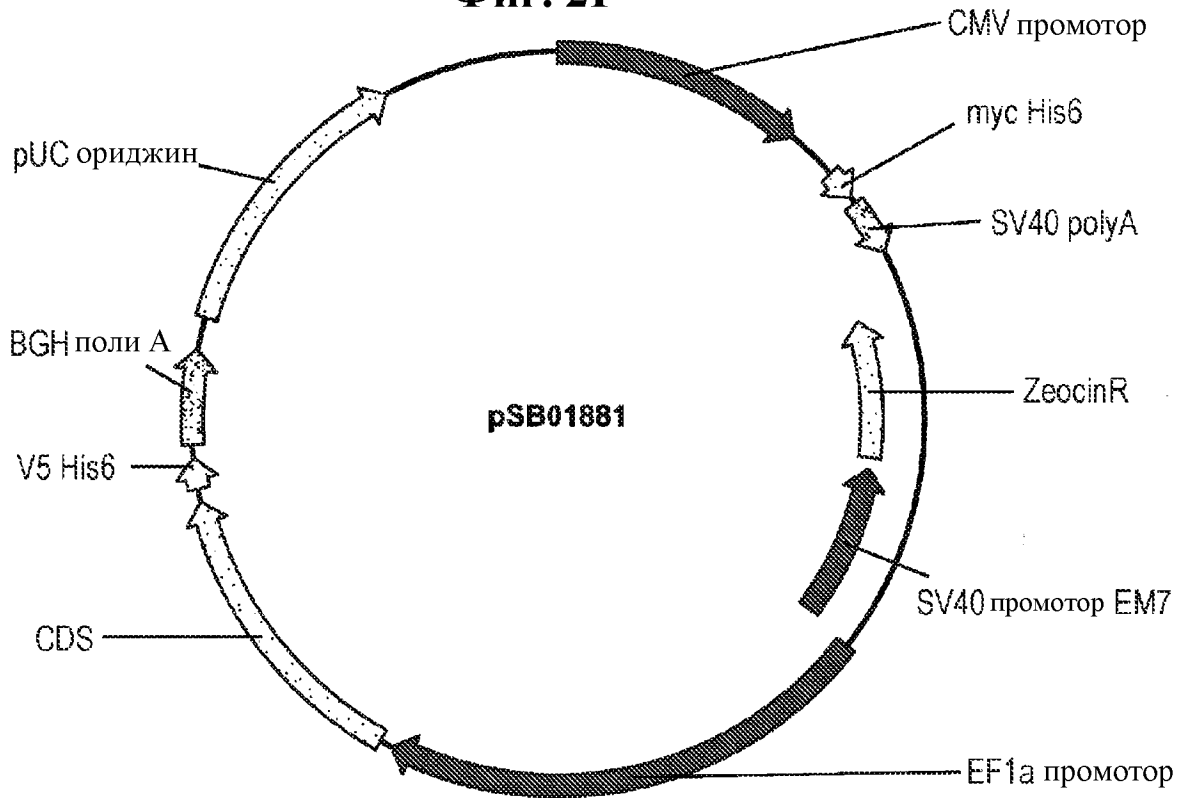
Фиг. 2D



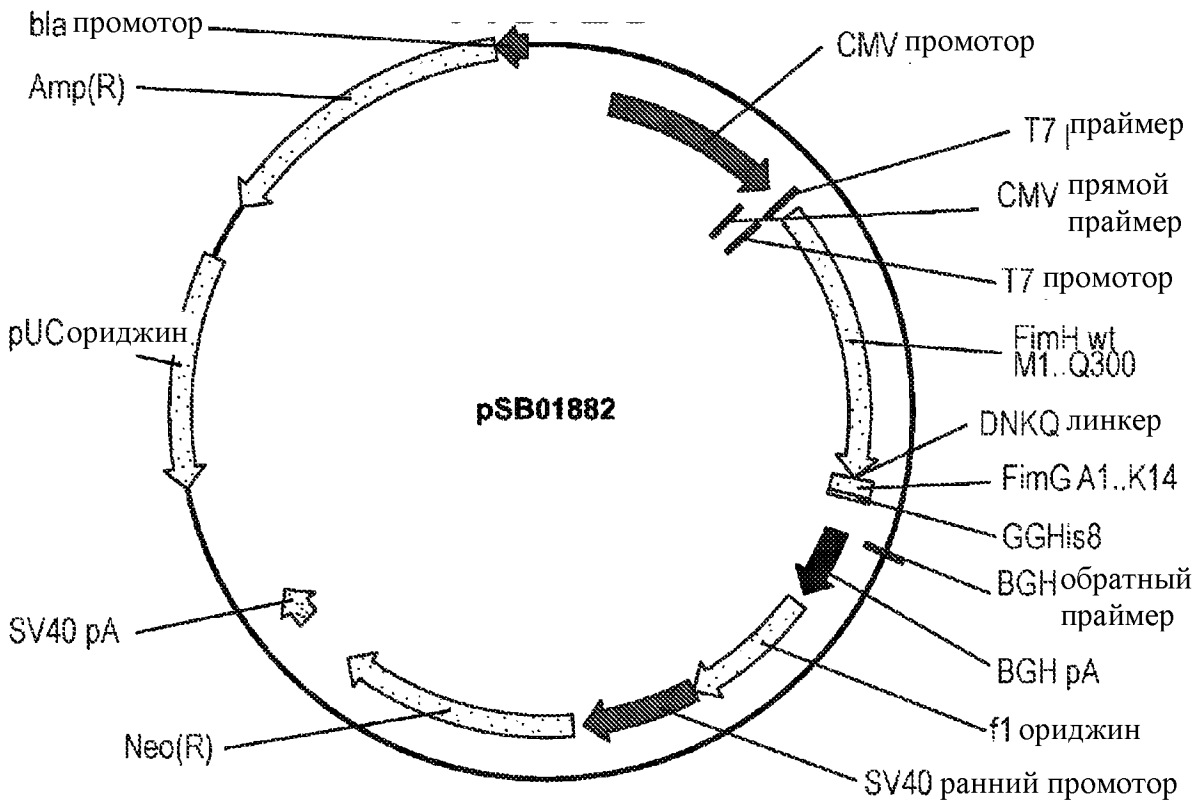
Фиг. 2Е



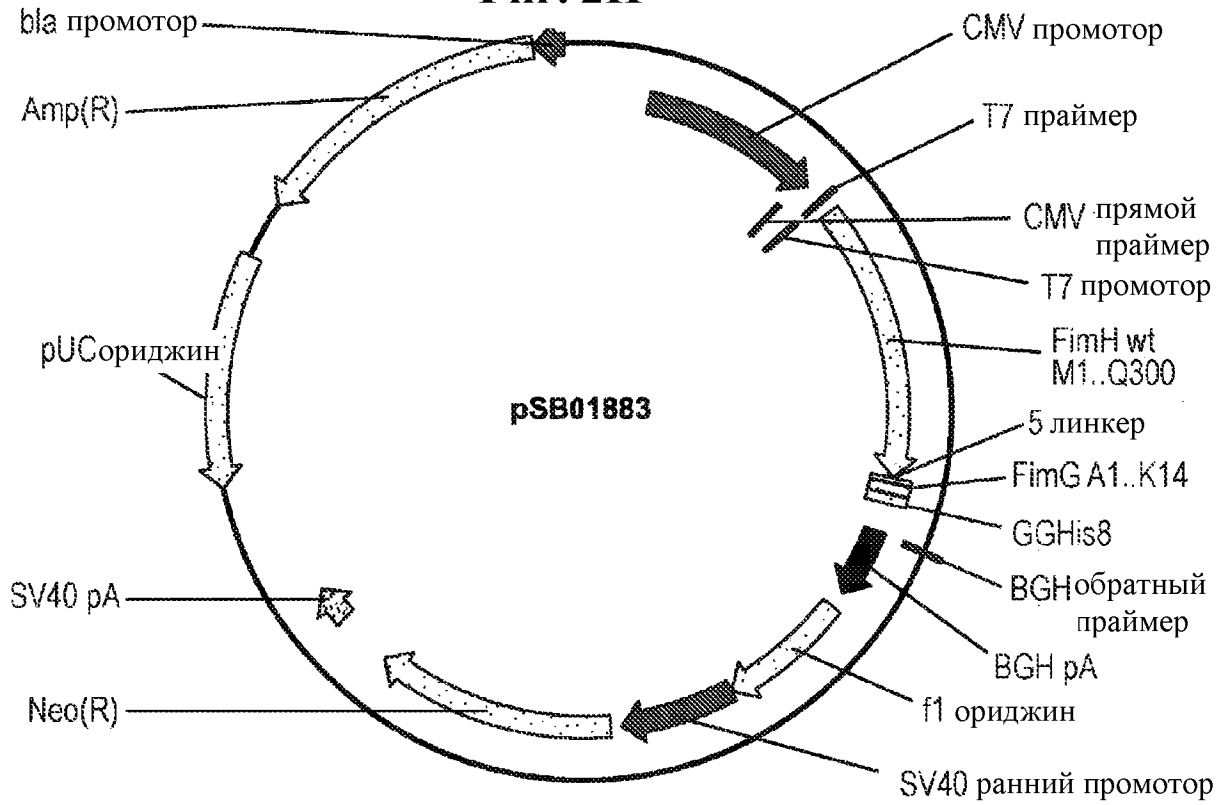
Фиг. 2F



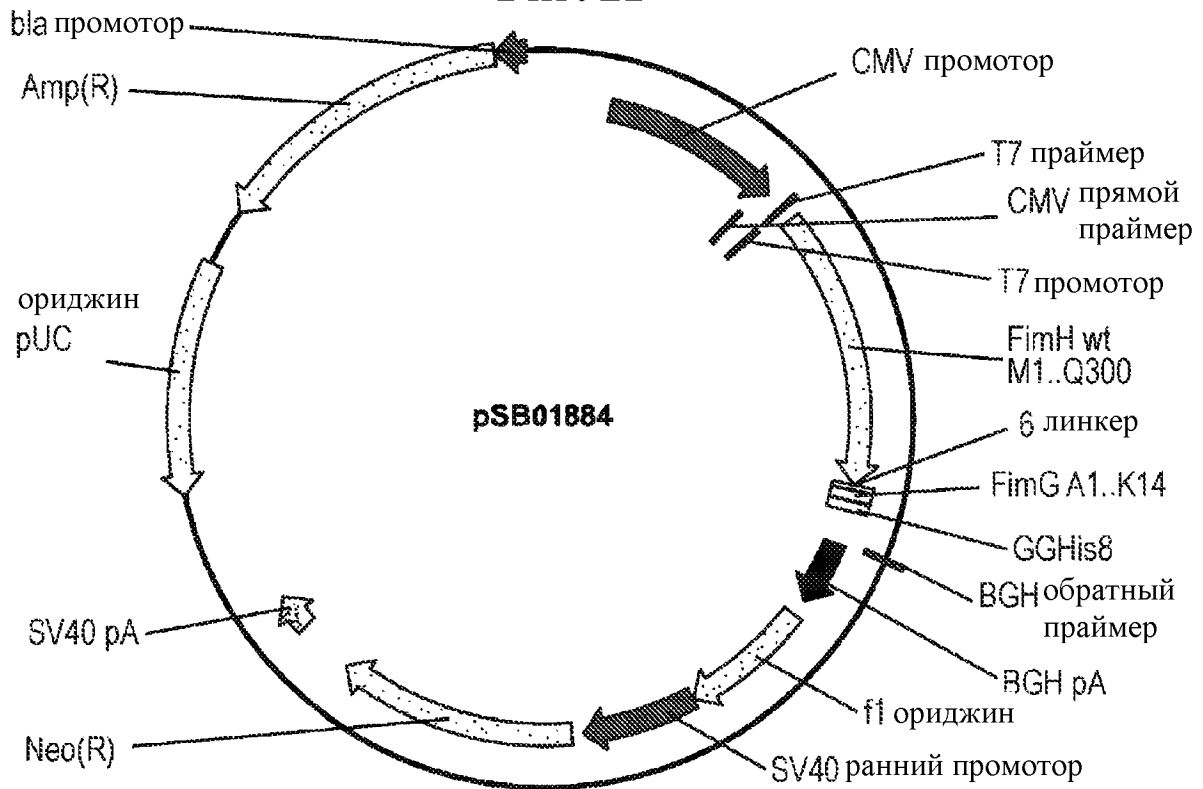
Фиг. 2G



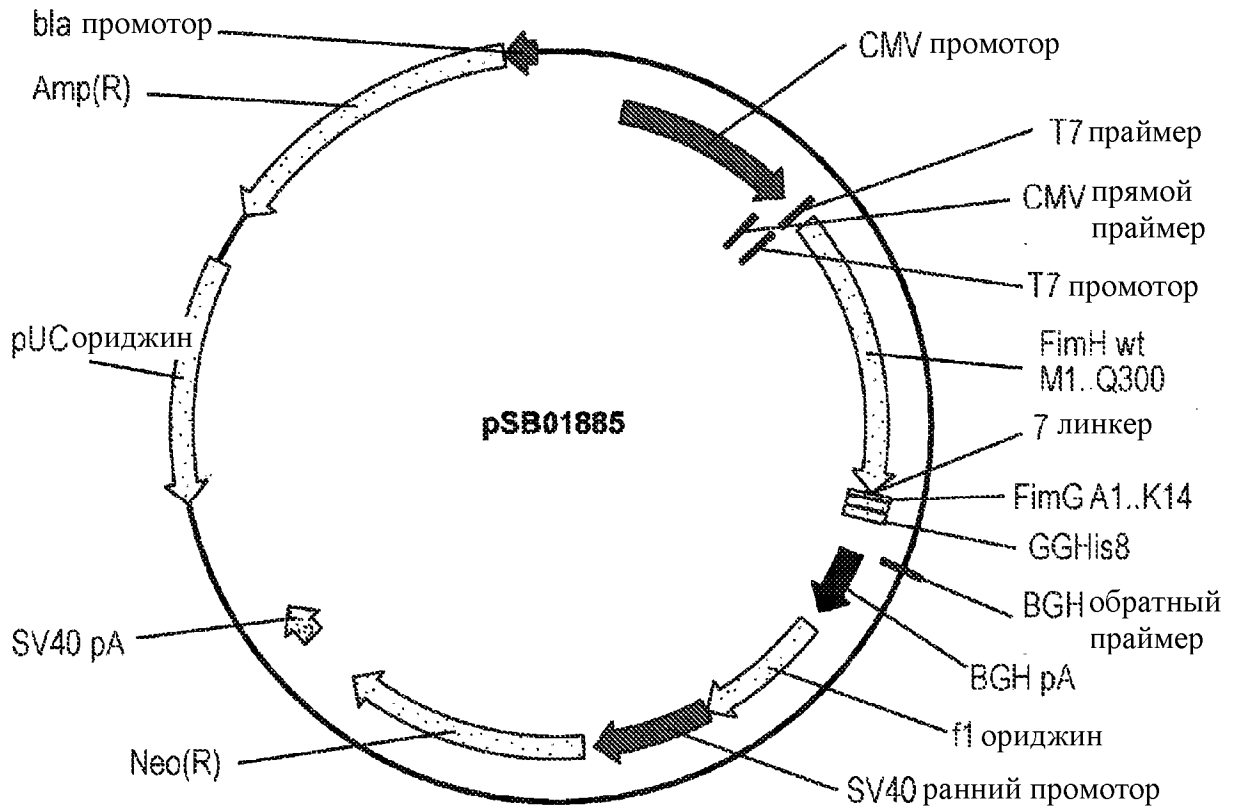
Фиг. 2Н



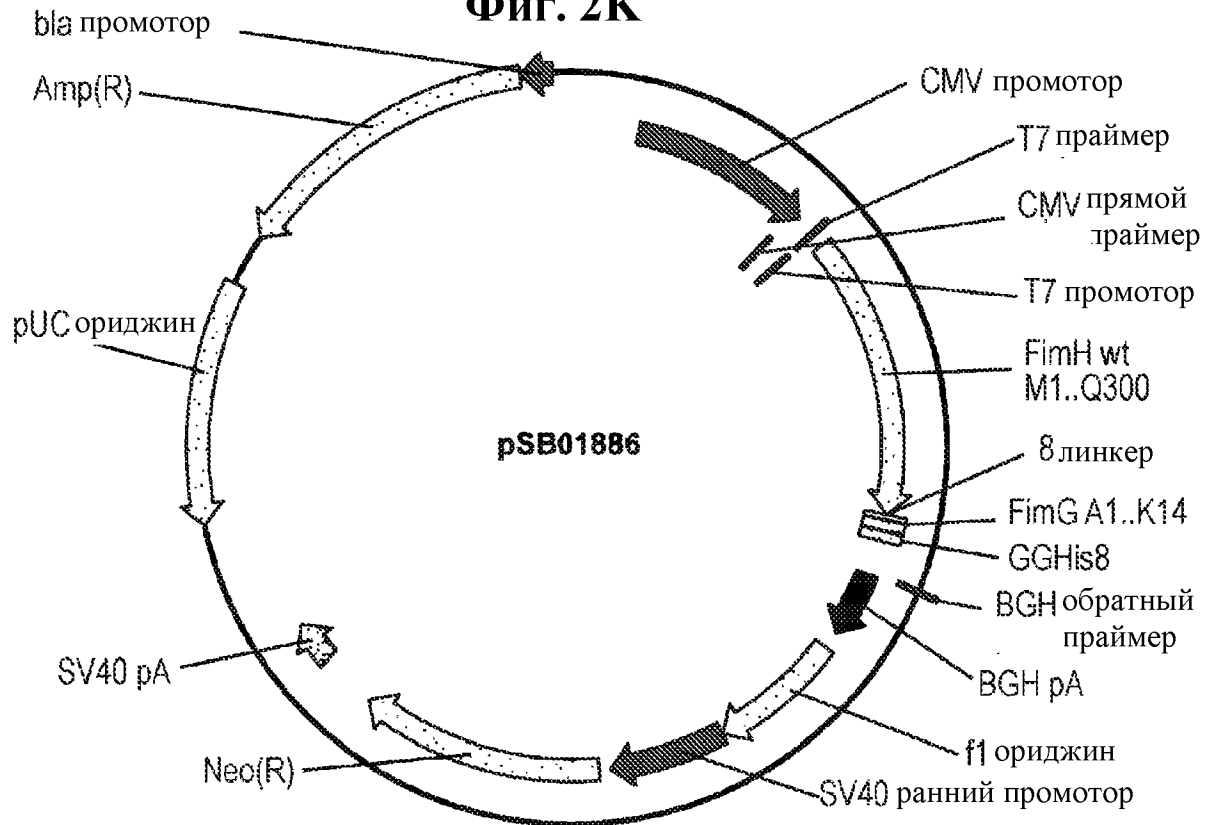
Фиг. 2И



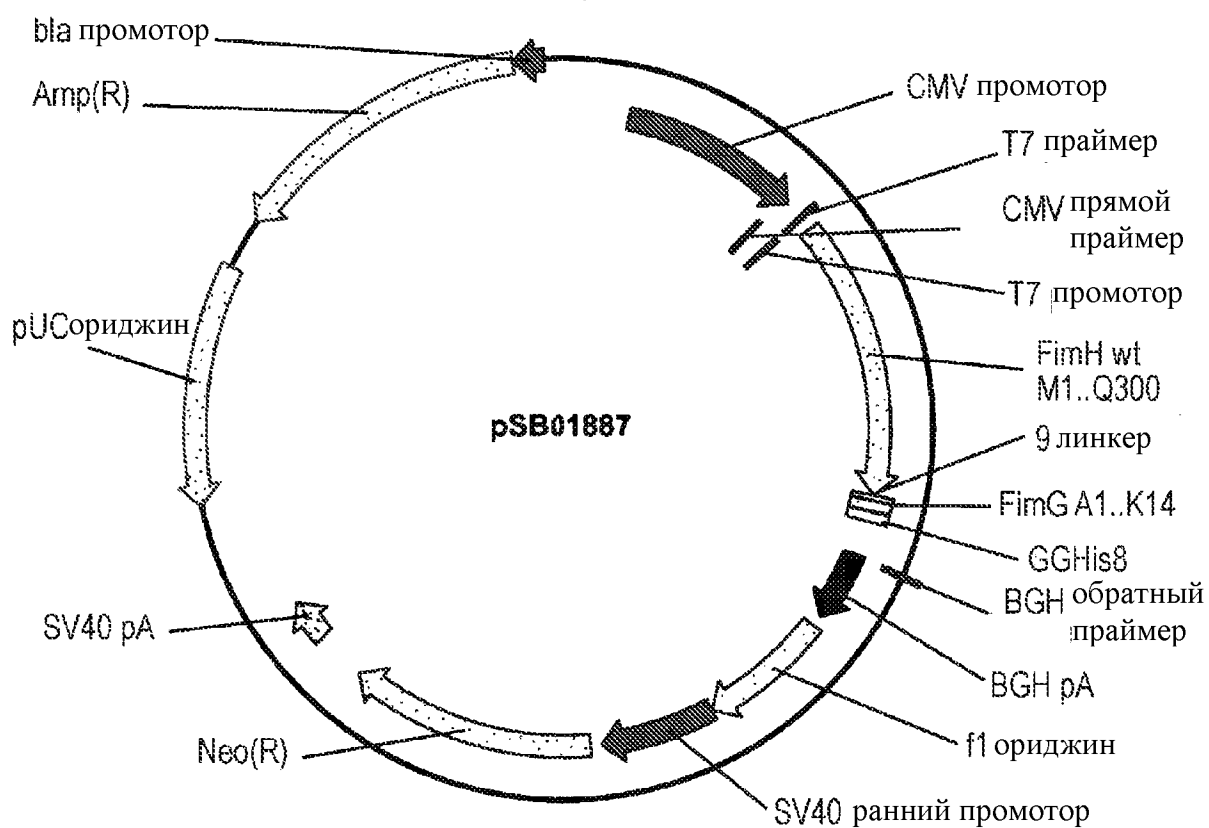
Фиг. 2J



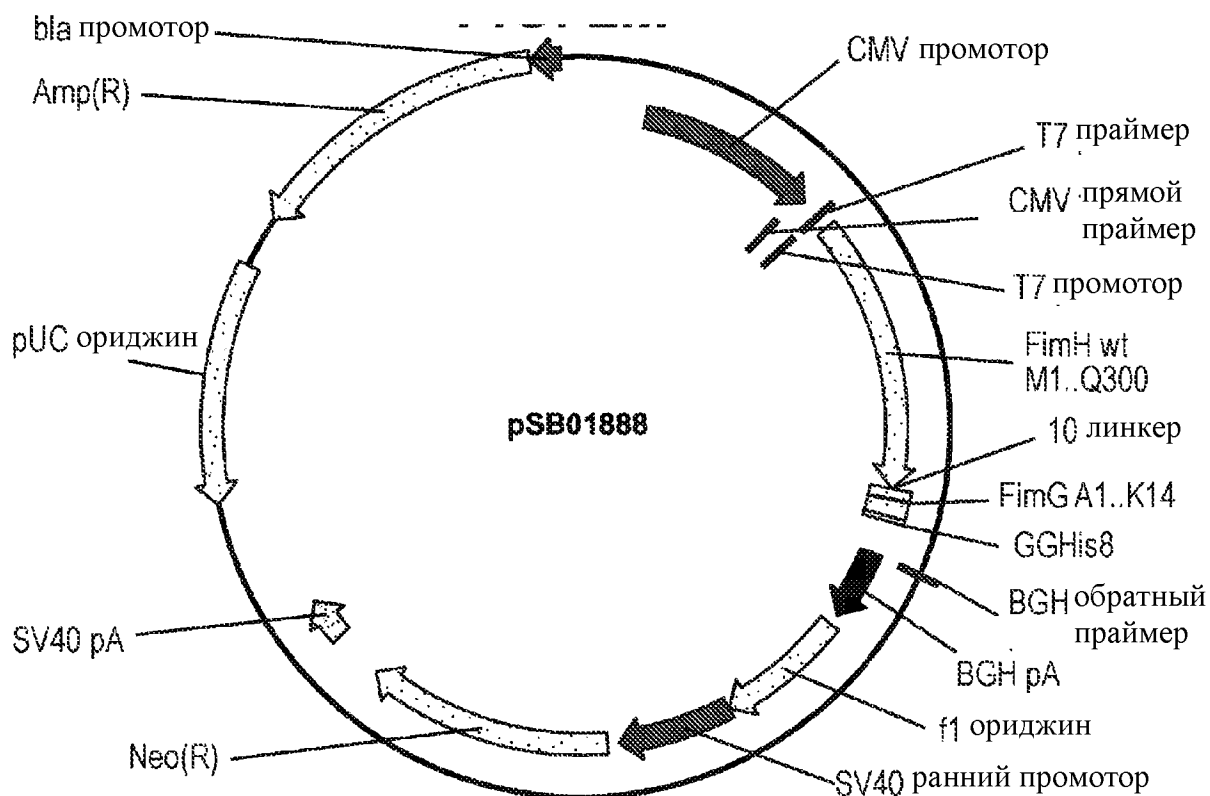
Фиг. 2K



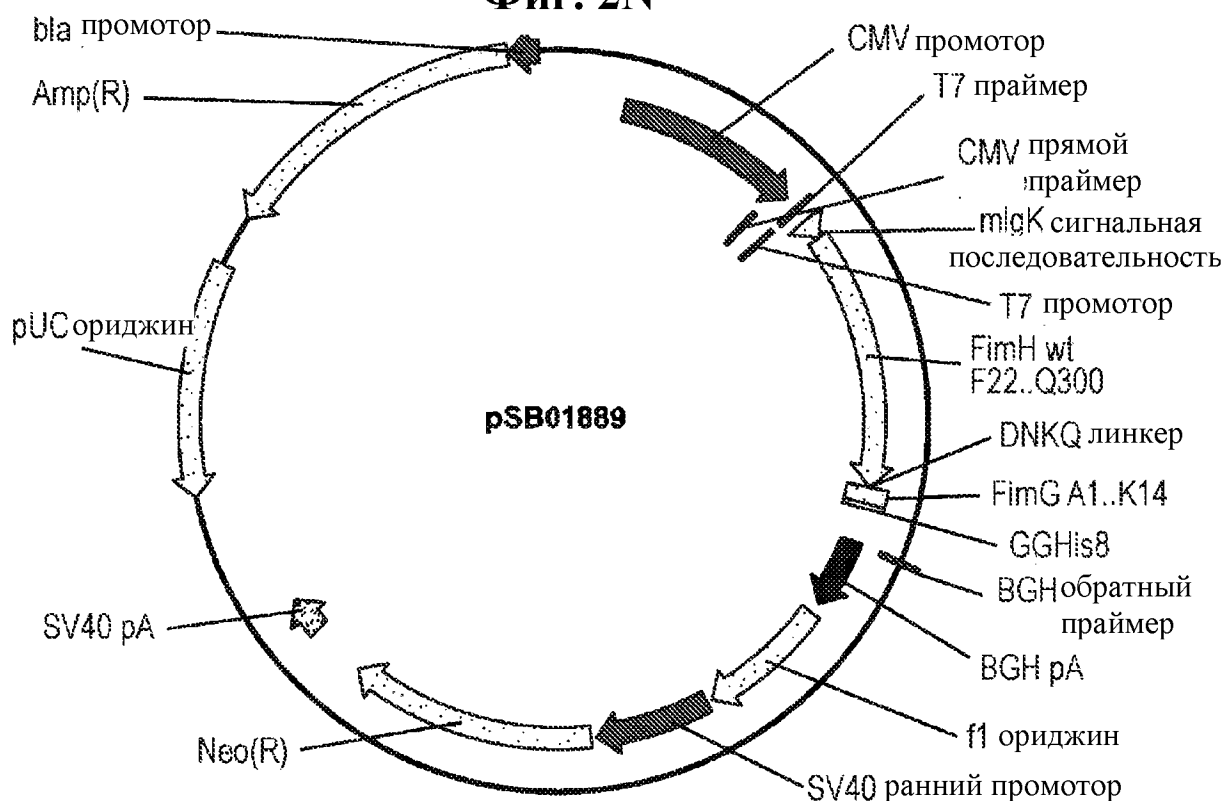
Фиг. 2L



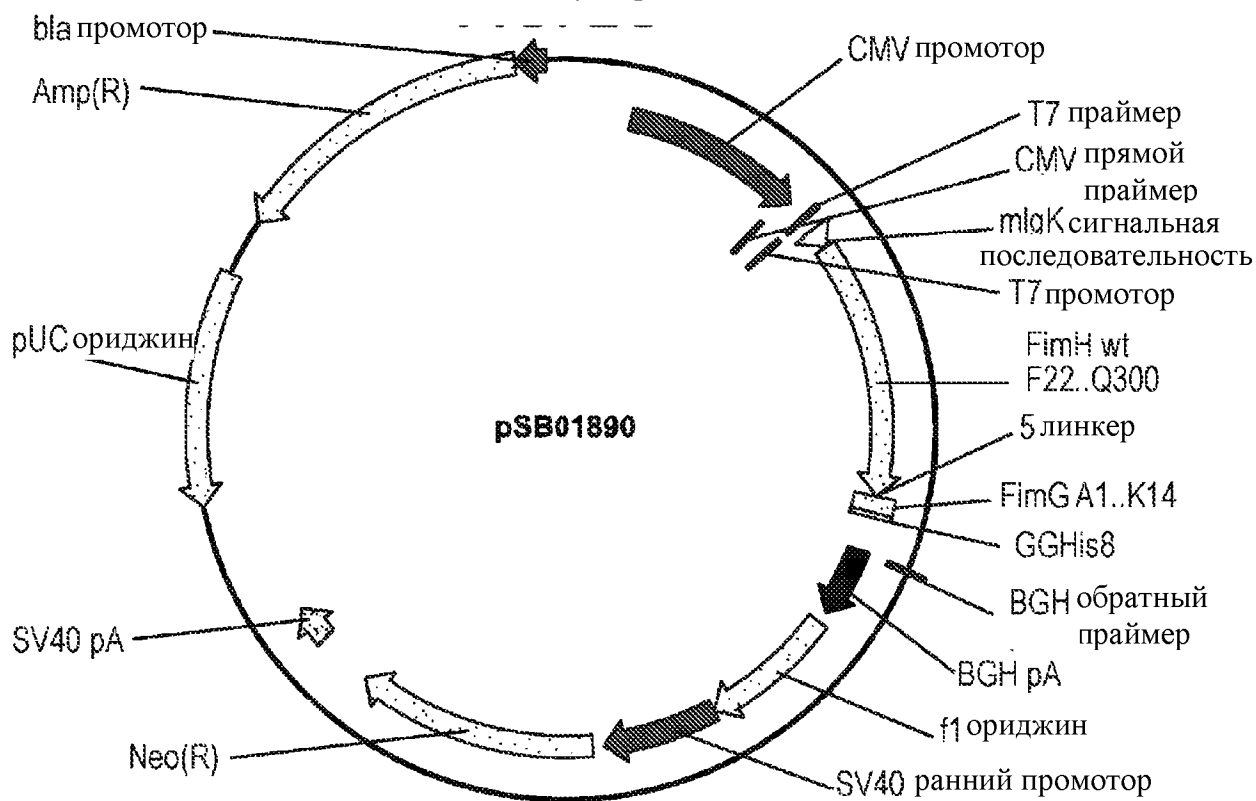
Фиг. 2M



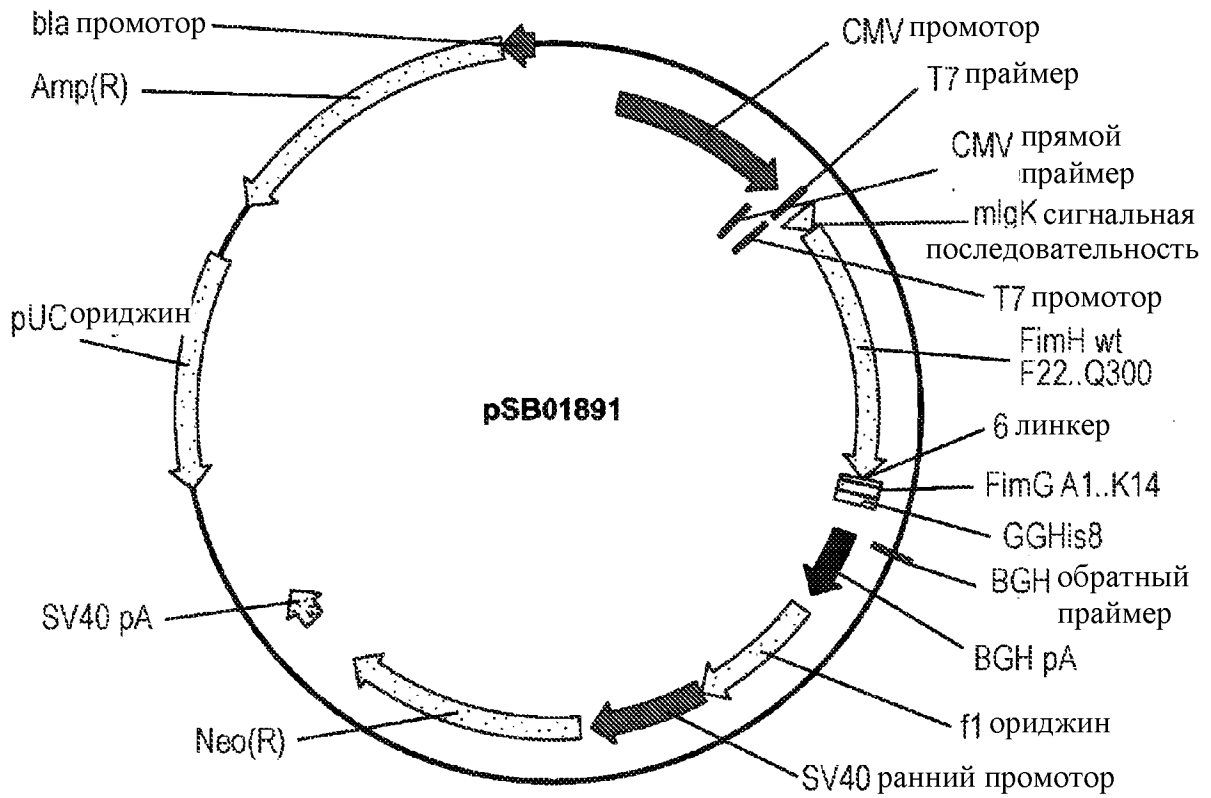
Фиг. 2N



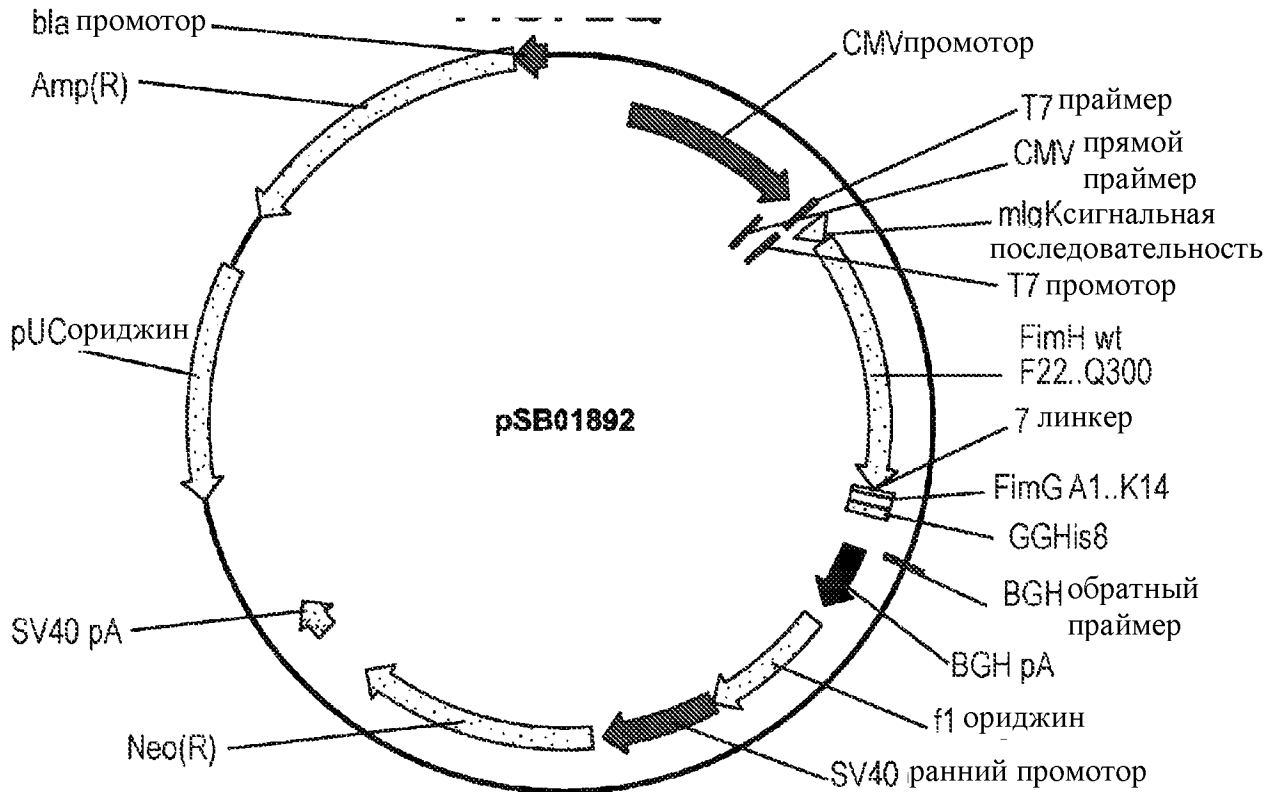
Фиг. 2O



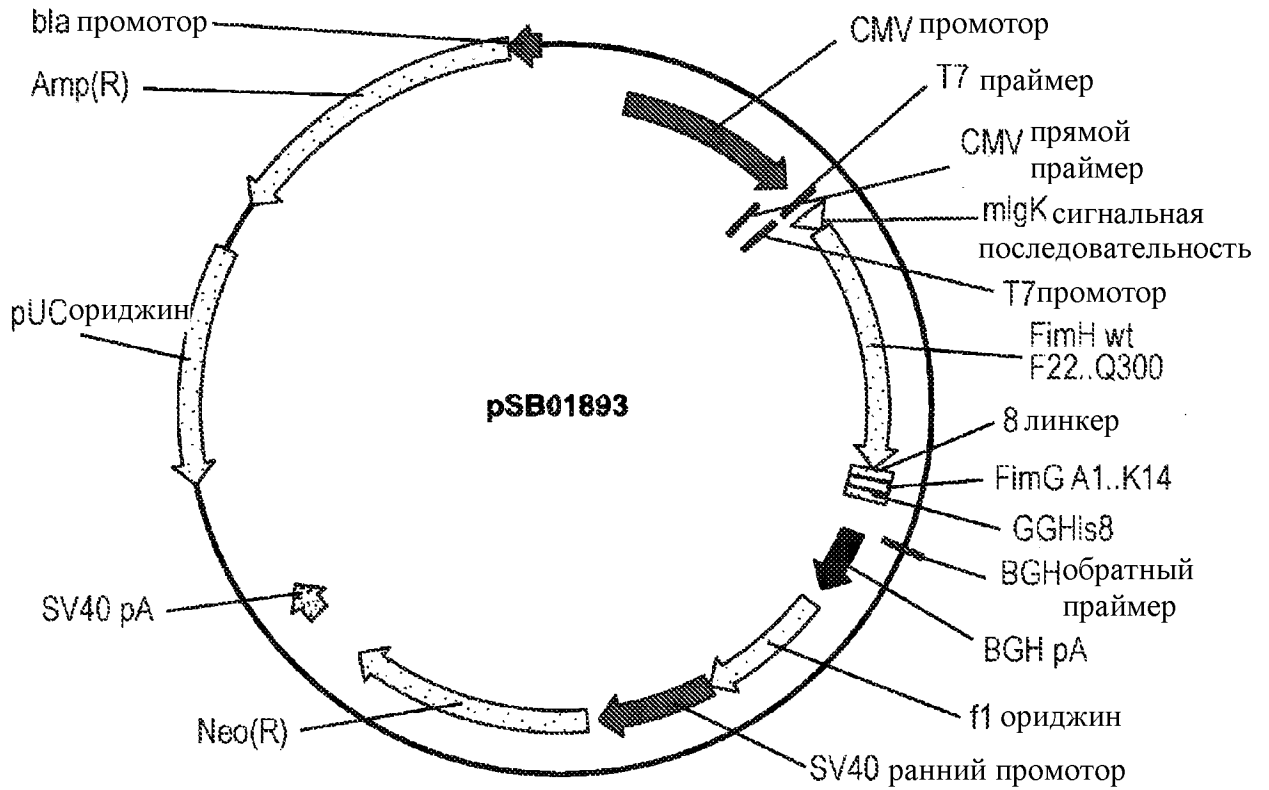
Фиг. 2P



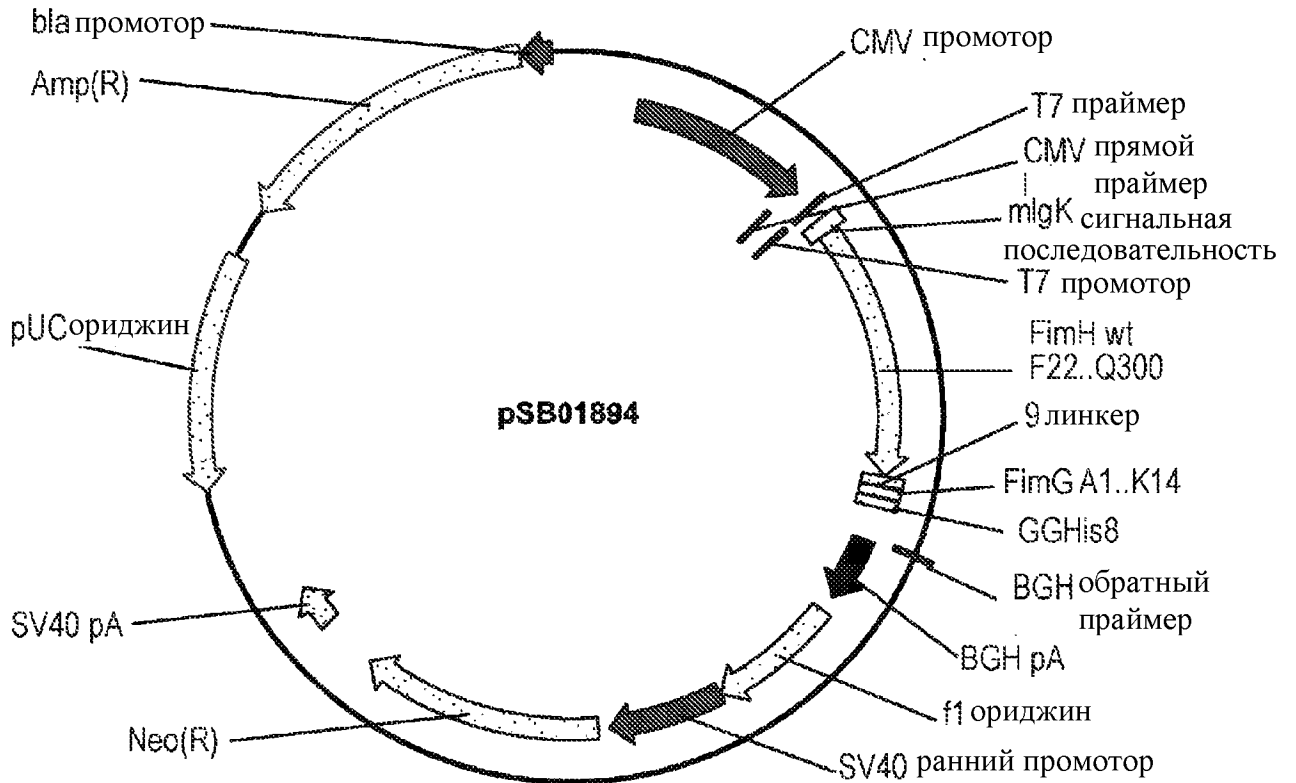
Фиг. 2Q



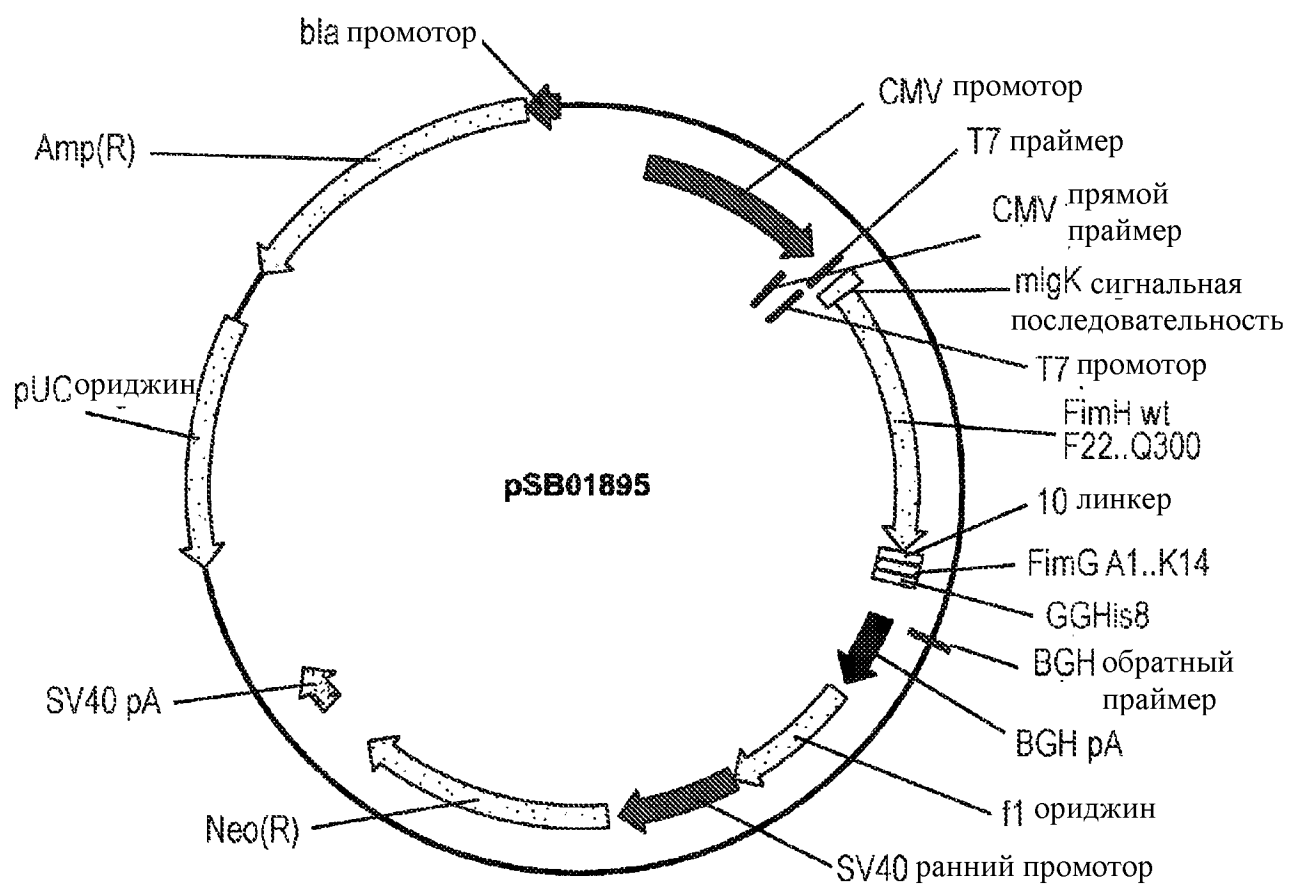
Фиг. 2R



Фиг. 2S

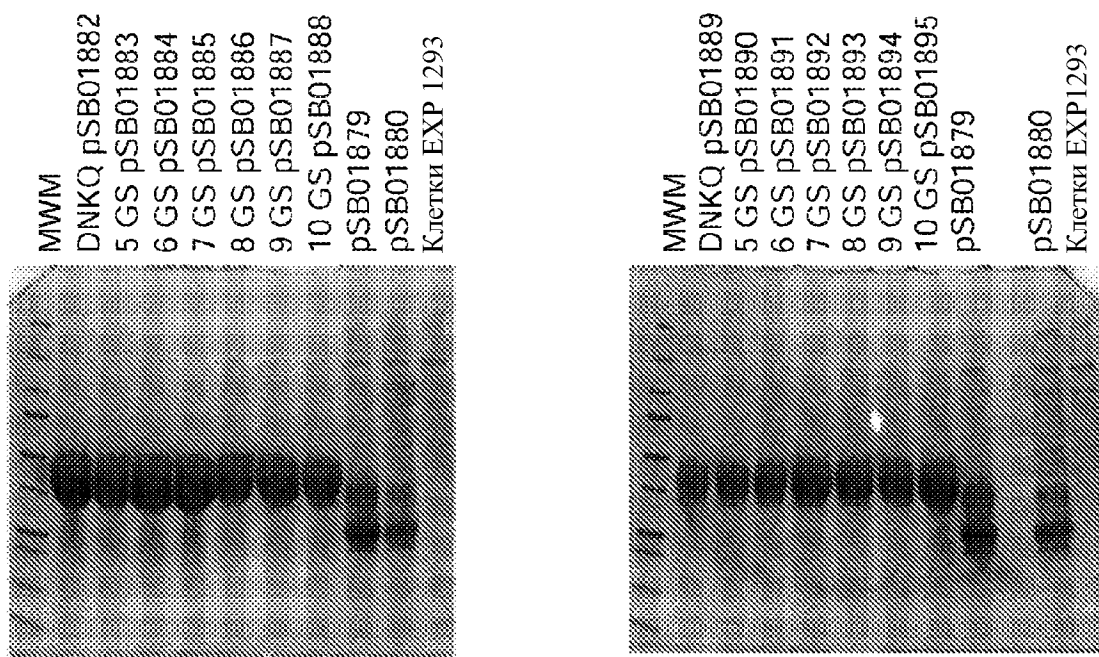


Фиг. 2Т



Фиг. 3

Результаты экспрессии и очистки

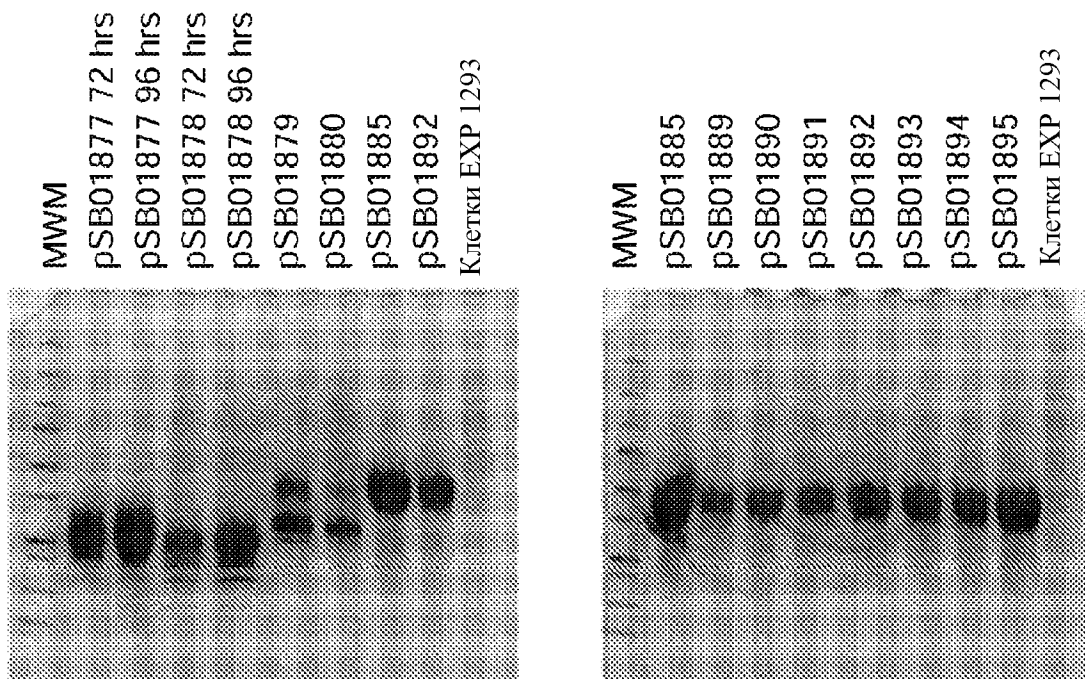


Сигнальная последовательность FimH

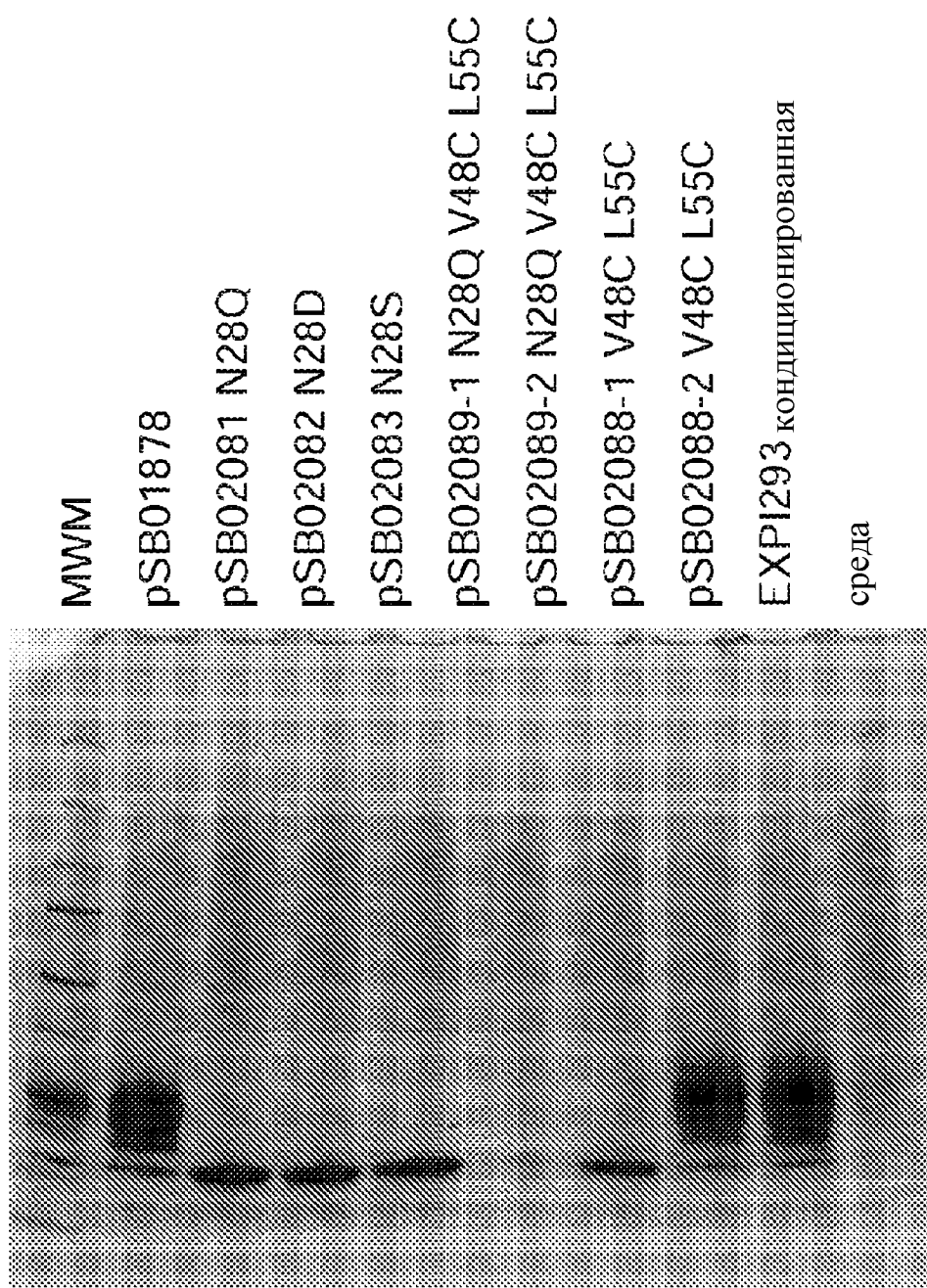
Сигнальная последовательность mIgK

Фиг. 4

Результаты экспрессии и очистки

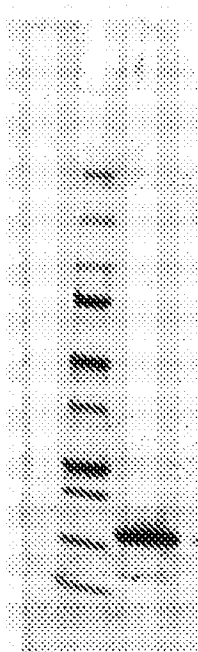


Фиг. 5



Фиг. 6А

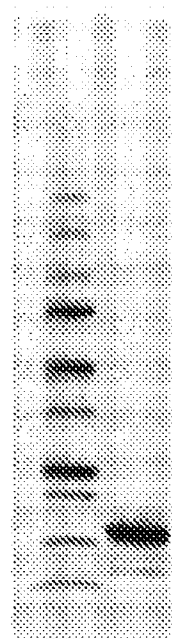
pSB02083



общий выход 17 мг

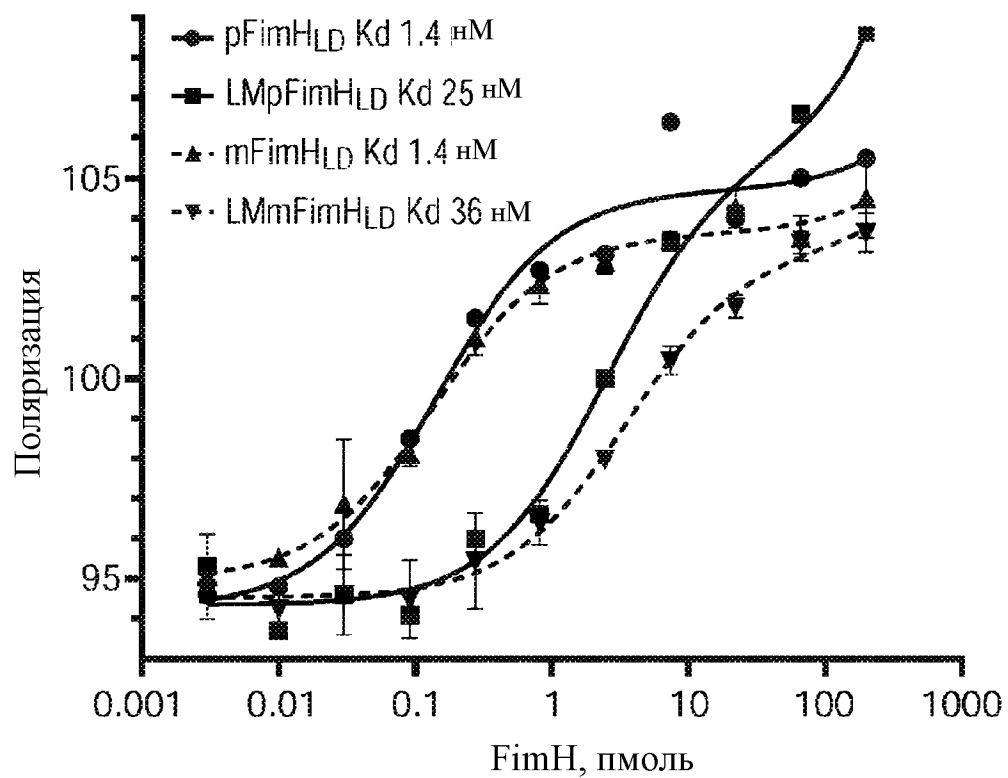
Фиг. 6В

pSB02158

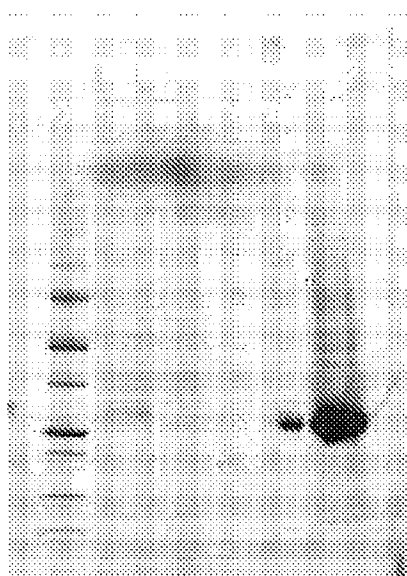


общий выход 10,8 мг

Фиг. 6С

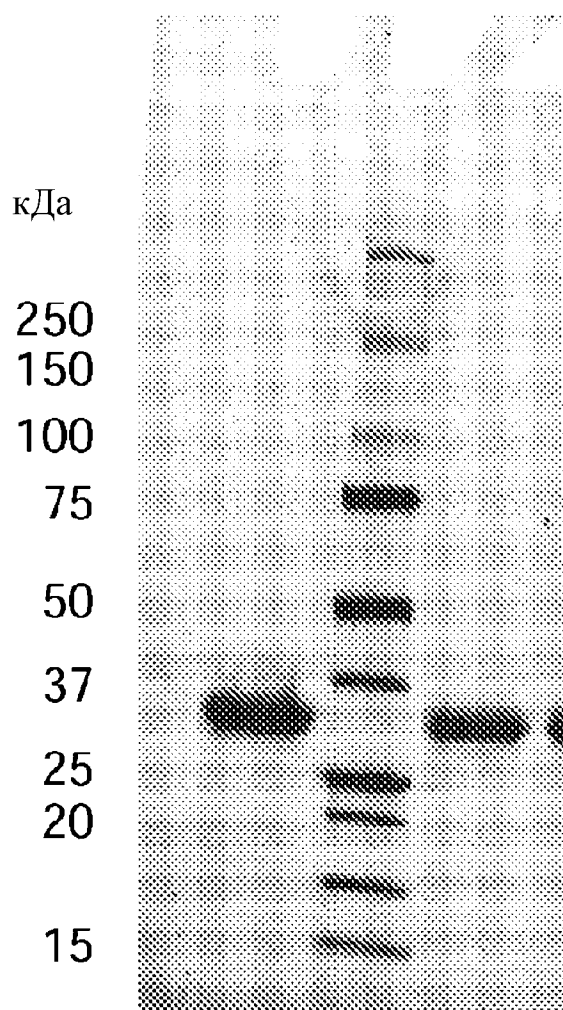


Фиг. 7



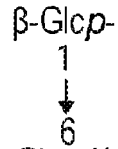
Фиг. 8

Экспрессия pSB2307 FimH dscG дикого типа



Серогруппа	Структура	Фиг. 9А
O1A, O1A1	→3)-α-L-Rha-(1→3)-α-L-Rha-(1→3)-β-L-Rha-(1→4)-β-D-GlcNAc-(1→ β-D-ManNAc-(1→2)	
O1B	→3)-α-L-Rha-(1→2)-α-L-Rha-(1→2)-α-D-Gal-(1→3)-β-D-GlcNAc-(1→ β-D-ManNAc-(1→2)	
O1C	→3)-α-L-Rha-(1→2)-α-L-Rha-(1→3)-α-D-Gal-(1→3)-β-D-GlcNAc-(1→ β-D-ManNAc-(1→2)	
O2	→3)-α-L-Rha-(1→2)-α-L-Rha-(1→3)-β-L-Rha-(1→4)-β-D-GlcNAc-(1→ α-D-Fuc3NAc-(1→2)	
O3	β-L-RhaNAc(1→4)α-D-Glc-(1→4) →3)-β-D-GlcNAc-(1→3)-α-D-Gal-(1→3)-β-D-GlcNAc-(1→	
O4:K52	→2)-α-L-Rha-(1→6)-α-D-Glc-(1→3)-α-L-FucNAc-(1→3)-β-D-GlcNAc(1→	
O4:K6	α-D-Glc-(1→3) →2)-α-L-Rha-(1→6)-α-D-Glc-(1→3)-α-L-FucNAc-(1→3)-β-D-GlcNAc(1→	
O5ab	→4)-β-D-Qui3NAc-(1→3)-β-D-Ribf-(1→4)-β-D-Gal-(1→3)-α-D-GalNAc(1→	
O5ac(штамм 180/C3)	→2)-β-D-Qui3NAc-(1→3)-β-D-Ribf-(1→4)-β-D-Gal-(1→3)-α-D-GalNAc(1→	
O6:K2; K13; K15	→4)-α-D-GalNAc-(1→3)-β-D-Man-(1→4)-β-D-Man-(1→3)-α-D-GlcNAc-(1→ β-D-Glc-(1→2)	
O6:K54	→4)-α-D-GalNAc-(1→3)-β-D-Man-(1→4)-β-D-Man-(1→3)-α-D-GlcNAc-(1→ β-D-GlcNAc-(1→2)	
O7	α-L-Rha-(1→3) →3)-β-D-Qui4NAc-(1→2)-α-D-Man-(1→4)-β-D-Gal-(1→3)-α-D-GlcNAc-(1→	
O10	→3)-α-L-Rha-(1→3)-α-L-Rha-(1→3)-α-D-Gal-(1→3)-β-D-GlcNAc-(1→ α-D-Fuc4NAcyl-(1→2)	
	Ацил=ацетил (60%) or (R)-3-гидроксибутирил 40%	
O16	→2)-β-D-Galf-(1→6)-α-D-Glc-(1→3)-α-L-Rha2Ac-(1→3)-α-D-GlcNAc-(1→	
O17	α-D-Glc-(1→6) →6)-α-D-Man-(1→2)-α-D-Man-(1→2)-β-D-Man-(1→3)-α-D-GlcNAc(1→	
O18A, O18ac	→2)-α-L-Rha-(1→6)-α-D-Glc-(1→4)-α-D-Gal-(1→3)-α-D-GlcNAc-(1→ β-D-GlcNAc-(1→3)	
O18A1	α-D-Glc-(1→6) →2)-α-L-Rha-(1→6)-α-D-Glc-(1→4)-α-D-Gal-(1→3)-α-D-GlcNAc-(1→ β-D-GlcNAc-(1→3)	
O18B	→3)-α-L-Rha-(1→6)-α-D-Glc-(1→4)-α-D-Gal-(1→3)-α-D-GlcNAc-(1→ β-D-Glc-(1→3)	
O18B1	α-D-Glc-(1→4) →3)-α-L-Rha-(1→6)-α-D-Glc-(1→4)-α-D-Gal-(1→3)-α-D-GlcNAc-(1→ β-D-Glc-(1→3)	
O21	β-D-Gal-(1→4) →3)-β-D-Gal-(1→4)-β-D-Glc-(1→3)-β-D-GalNAc-(1→ β-D-GlcNAc-(1→2)	
O23A	α-D-Glc-(1→6) →6)-α-D-Glc-(1→4)-β-D-Gal-(1→3)-α-D-GalNAc-(1→3)-β-D-GlcNAc-(1→ β-D-GlcNAc(1→3)	
O24	→7)-α-Neu5Ac-(2→3)-β-D-Glc-(1→3)-β-D-GalNAc-(1→ α-D-Glc-(1→2)	

Фиг. 9В



O25b	$\alpha\text{-Rhap}(1 \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-GlcP}(1 \rightarrow 3)\text{-Rhap}20\text{Ac}(1 \rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-GlcPNAc}$
O25	$\beta\text{-D-Glc}(1 \rightarrow 6) \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glc}(1 \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-FucNAc}(1 \rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcNAc}(1 \rightarrow \alpha\text{-L-Rha}(1 \rightarrow 3)$
O26	$\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rha}(1 \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-FucNAc}(1 \rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcNAc}(1 \rightarrow$
O28	$\rightarrow 2)\text{-}(R)\text{-Gro-1-P} \rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcNAc}(1 \rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galf2Ac}(1 \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcNAc}(1 \rightarrow$
O44	$\alpha\text{-D-Glc}(1 \rightarrow 4) \rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Man}(1 \rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Man}(1 \rightarrow 2)\text{-b-D-Man}(1 \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcNAc}(1 \rightarrow$
O45	$\rightarrow 2)\text{-b-D-Glc}(1 \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-6dTal2Ac}(1 \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-FucNAc}(1 \rightarrow$
O45rel	$\rightarrow 2)\text{-b-D-Glc}(1 \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-6dTal2Ac}(1 \rightarrow 3)\text{-b-D-GlcNAc}(1 \rightarrow$
O55	$\rightarrow 6)\text{-b-D-GlcNAc}(1 \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Gal}(1 \rightarrow 3)\text{-b-D-GalNAc}(1 \rightarrow \alpha\text{-Col}(1 \rightarrow 2)\text{-b-D-Gal}(1 \rightarrow 3)$
O56	$\rightarrow 7)\text{-}\alpha\text{-Neu5Ac}(2 \rightarrow 3)\text{-b-D-Glc}(1 \rightarrow 3)\text{-b-D-GlcNAc}(1 \rightarrow \alpha\text{-D-Gal}(1 \rightarrow 2)$
O58	$3\text{-O-}[(R)\text{-1-карбоксииэтил}] \text{-}\alpha\text{-L-Rha}(1 \rightarrow 3) \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Man}(1 \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Man}2\text{Ac}(1 \rightarrow 3)\text{-b-D-GlcNAc}(1 \rightarrow$
O64	$\text{b-D-Gal}(1 \rightarrow 6) \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-ManNAc}(1 \rightarrow 3)\text{-b-D-GlcA}(1 \rightarrow 3)\text{-b-D-Gal}(1 \rightarrow 3)\text{-b-D-GlcNAc}(1 \rightarrow$
O69	$\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rha}(1 \rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rha}(1 \rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Gal}(1 \rightarrow 3)\text{-b-D-GlcNAc}(1 \rightarrow \text{Erbing et al. (1977)}$
O73 (штамм 73-1)	$\alpha\text{-D-Glc}(1 \rightarrow 3) \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Man}(1 \rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Man}(1 \rightarrow 2)\text{-b-D-Man}(1 \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GalNAc}(1 \rightarrow$
O75	$\text{b-D-Man}(1 \rightarrow 4) \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Gal}(1 \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rha}(1 \rightarrow 3)\text{-b-D-GlcNAc}(1 \rightarrow$
O77	$\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Man}(1 \rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Man}(1 \rightarrow 2)\text{-b-D-Man}(1 \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcNAc}(1 \rightarrow$
O78	$\rightarrow 4)\text{-b-D-GlcNAc}(1 \rightarrow 4)\text{-b-D-Man}(1 \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Man}(1 \rightarrow 3)\text{-b-D-GlcNAc}(1 \rightarrow$
O86	$\alpha\text{-D-Gal}(1 \rightarrow 3) \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Fuc}(1 \rightarrow 2)\text{-b-D-Gal}(1 \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GalNAc}(1 \rightarrow 3)\text{-b-D-GalNAc}(1 \rightarrow$
O88	$\alpha\text{-L-6dTal}(1 \rightarrow 3) \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Man}(1 \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Man}(1 \rightarrow 3)\text{-b-D-GlcNAc}(1 \rightarrow$
O90	$\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Fuc}2/3\text{Ac}(1 \rightarrow 2)\text{-b-D-Gal}(1 \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GalNAc}(1 \rightarrow 3)\text{-b-D-GalNAc}(1 \rightarrow$
O98	$\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-QuiNAc}(1 \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalNAcA}(1 \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-QuiNAc}(1 \rightarrow 3)\text{-b-D-GlcNAc}(1 \rightarrow$
O104	$\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Gal}(1 \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-Neu}5,7,9\text{Ac}3(2 \rightarrow 3)\text{-b-D-Gal}(1 \rightarrow 3)\text{-b-D-GalNAc}(1 \rightarrow$
O111	$\alpha\text{-Col}(1 \rightarrow 6) \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glc}(1 \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Gal}(1 \rightarrow 3)\text{-b-D-GlcNAc}(1 \rightarrow \alpha\text{-Col}(1 \rightarrow 3)$
O113	$\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalNAc}(1 \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalA}(1 \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Gal}(1 \rightarrow 3)\text{-b-D-GlcNAc}(1 \rightarrow \text{b-D-Gal}(1 \rightarrow 3)$
O114	$\rightarrow 4)\text{-b-D-Qui}3\text{N}(\text{N-ацетил-L-серил})\text{-}(1 \rightarrow 3)\text{-b-D-Ribf}(1 \rightarrow 4)\text{-b-D-Gal}(1 \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcNAc}(1 \rightarrow$

Фиг. 9С

- O119 β -D-RhaNAc3NFo-(1→3) | →2)- β -D-Man-(1→3)- α -D-Gal-(1→4)- α -L-Rha-(1→3)- α -D-GlcNAc-(1→
- O121 →3)- β -D-Qui4N(N-acetyl-glycyl)-(1→4)- α -D-GalNAc3AcA6N-(1→4)- α -D-GalNAcA-(1→3)- α -D-GlcNAc-(1→
- O124 4-O-[(R)-1-карбокситил]- β -D-Glc-(1→6)- α -D-Glc(1→4) | →3)- α -D-Gal-(1→6)- β -D-Galf-(1→3)- β -D-GalNAc-(1→
- O125 α -D-Glc-(1→3) | →4)- β -D-GalNAc-(1→2)- α -D-Man-(1→3)- α -L-Fuc-(1→3)- α -D-GalNAc-(1→ | β -D-Gal-(1→3)
- O126 →2)- β -D-Man-(1→3)- β -D-Gal-(1→3)- α -D-GlcNAc-(1→3)- β -D-GlcNAc-(1→ | α -L-Fuc-(1→2)
- O127 →2)- α -L-Fuc-(1→2)- β -D-Gal-(1→3)- α -D-GalNAc-(1→3)- α -D-GalNAc-(1→
- O128 α -L-Fuc-(1→2) | →6)- β -D-Gal-(1→3)- β -D-GalNAc-(1→4)- α -D-Gal-(1→3)- β -D-GalNAc-(1→
- O136 →4)- β -Pse5Ac7Ac-(2→4)- β -D-Gal-(1→4)
 β -D-GlcNAc-(1→ β -Pse5Ac7Ac=5,7-диацетамидо-3,5,7,9-тетрадезоксиглицеро- β -L-манно-нонулозоновая к-та
- O138 →2)- α -L-Rha-(1→3)- α -L-Rha-(1→4)- α -D-GalNAcA-(1→3)- β -D-GlcNAc-(1→
- O141 α -L-Rha-(1→3) | →4)- α -D-Man-(1→3)- α -D-Man6Ac-(1→3)- β -D-GlcNAc-(1→ | β -D-GlcA-(1→2)
- O142 →2)- α -L-Rha-(1→6)- α -D-GalNAc-(1→4)- α -D-GalNAc-(1→3)- α -D-GalNAc-(1→ | β -D-GlcNAc-(1→3)
- O143 →2)- β -D-GalA6R3,4Ac-(1→3)- α -D-GalNAc-(1→4)- β -D-GlcA-(1→3)- β -D-GlcNAc-(1→ R=1,3-дигидрокси-2-пропиламино
- O147 →2)- α -L-Rha-(1→2)- α -L-Rha-(1→4)- β -D-GalA-(1→3)- β -D-GalNAc-(1→
- O149 →3)- β -D-GlcNAc-(S)-4,6Py-(1→3)- β -L-Rha-(1→4)- β -D-GlcNAc-(1→ (S)-4,6Py=4,6-O-[(S)-1-карбокситилиден]-
- O152 β -L-Rha-(1→4) | →3)- α -D-GlcNAc-(1-P→6)- α -D-Glc-(1→2)- β -D-Glc-(1→3)- β -D-GlcNAc-(1→
- O157 →2)- α -D-Rha4NAc-(1→3)- α -L-Fuc-(1→4)- β -D-Glc-(1→3)- α -D-GalNAc-(1→
- O158 α -D-Glc-(1→6) | →4)- α -D-Glc-(1→3)- α -D-GalNAc-(1→3)- β -D-GalNAc-(1→ | α -L-Rha-(1→3)
- O159 α -L-Fuc-(1→4) | →3)- β -D-GlcNAc-(1→4)- α -D-GalA-(1→3)- α -L-Fuc-(1→3)- β -D-GlcNAc-(1→
- O164 β -D-Glc-(1→6)- α -D-Glc(1→4) | →3)- β -D-Gal-(1→6)- β -D-Galf-(1→3)- β -D-GalNAc-(1→
- O173 α -L-Fuc-(1→4) | →3)- α -D-Glc-(1-P→6)- α -D-Glc-(1→2)- β -D-Glc-(1→3)- β -D-GlcNAc-(1→
- 62D1 α -D-Gal(1→6) | →2)- β -D-Qui3NAc-(1→3)- α -L-Rha-(1→3)- β -D-Gal-(1→3)- α -D-FucNAc-(1→ предложено *Erwinia herbicola*
как

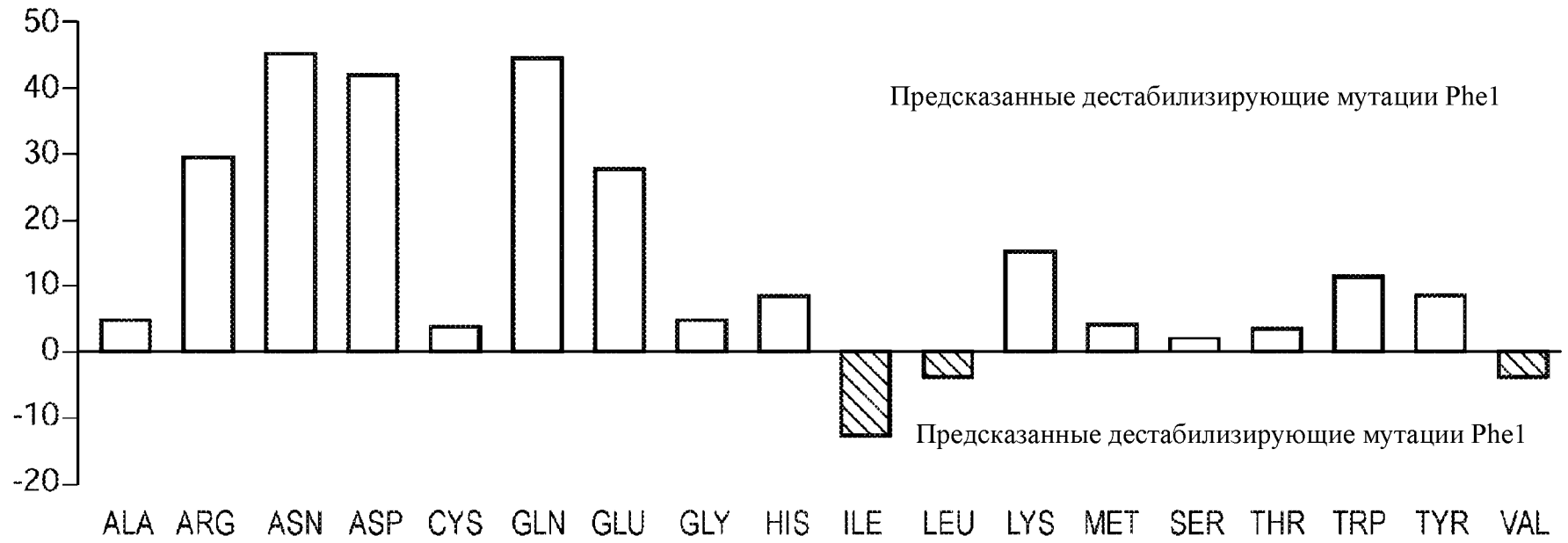
Фиг. 10А

O22	→6)-α-D-Glc-(1→4)-β-D-GlcA-(1→4)-β-D-GalNAc3Ac-(1→3)-α-D-Gal-(1→3)-β-D-GalNAc-(1→
O35	→3)-α-L-Rha-(1→2)-α-L-Rha-(1→3)-α-L-Rha-(1→2)-α-L-Rha-(1→3)-β-D-GlcNAc-(1→ α-D-GalNAcA6N-(1→2)
O65	→2)-β-D-Qui3NAc-(1→4)-α-D-GalA6N-(1→4)-α-D-GalNAc-(1→4)-β-D-GalA-(1→3)-α-D-GlcNAc-(1→
O66	→2)-β-D-Man-(1→3)-α-D-GlcNAc-(1→2)-β-D-Glc3Ac-(1→3)-α-L-6dTal-(1→3)-α-D-GlcNAc(1→
O83	→6)-α-D-Glc-(1→4)-β-D-GlcA-(1→6)-β-D-Gal-(1→4)-β-D-Gal-(1→4)-β-D-GlcNAc-(1→
O91	→4)-α-D-Qui3NAcyl-(1→4)-β-D-Gal-(1→4)-β-D-GlcNAc-(1→4)-β-D-GlcA6NGly-(1→3)-β-D-GlcNAc-(1→ Acyl=(R)-3-гидроксибутирил
O105	β-D-Ribf-(1→3) →4)-α-D-GlcA2Ac3Ac-(1→2)-α-L-Rha4Ac-(1→3)-β-L-Rha-(1→4)-β-L-Rha-(1→3)-β-D-GlcNAc6Ac-(1→
O116	→2)-β-D-Qui4NAc-(1→6)-α-D-GlcNAc-(1→4)-α-D-GalNAc-(1→4)-α-D-GalA-(1→3)-β-D-GlcNAc-(1→
O117	→4)-β-D-GalNAc-(1→3)-α-L-Rha-(1→4)-α-D-Glc-(1→4)-β-D-Gal-(1→3)-α-D-GalNAc-(1→
O139	β-D-Glc-(1→3) →3)-α-L-Rha-(1→4)-α-D-GalA-(1→2)-α-L-Rha-(1→3)-α-L-Rha-(1→2)-α-L-Rha-(1→3)-α-D-GlcNAc-(1→
O153	→2)-β-D-Ribf-(1→4)-β-D-Gal-(1→4)-α-D-GlcNAc-(1→4)-β-D-Gal-(1→3)-α-D-GlcNAc-(1→ Ratnayake (1994a)
O167	α-D-Galf-(1→4) →2)-β-D-GalA6N(L)Ala-(1→3)-α-D-GlcNAc-(1→2)-β-D-Galf-(1→5)-β-D-Galf-(1→3)-β-D-GlcNAc-(1→
O172	→3)-α-L-FucNAc-(1→4)-α-D-Glc6Ac-(1-P→4)-α-D-Glc-(1→3)-α-L-FucNAc-(1→3)-α-D-GlcNAc-(1→

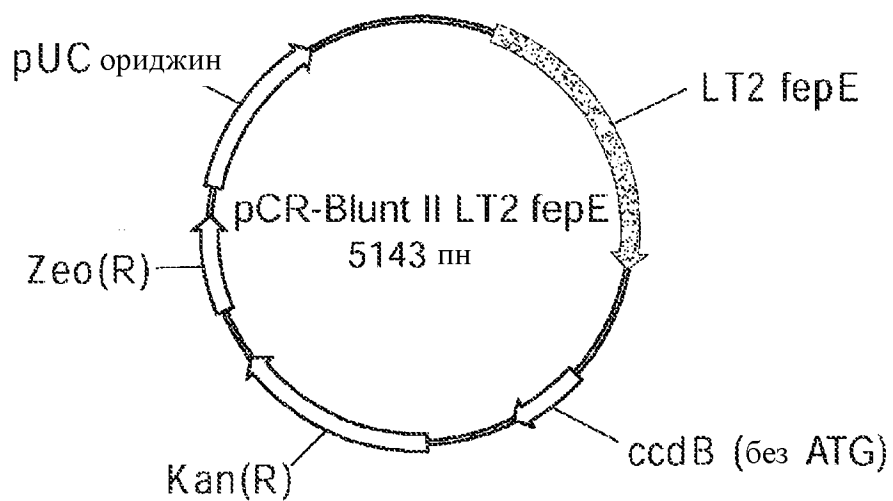
Фиг. 10В

O8	→2)-α-D-Man-(1→2)-α-D-Man-(1→3)-β-D-Man-(1→
O9a	→2)-α-D-Man-(1→2)-α-D-Man-(1→3)-α-D-Man-(1→3)-α-D-Man-(1→
O9	→2)-[α-D-Man-(1→2)]2-α-D-Man-(1→3)-α-D-Man-(1→3)-α-D-Man-(1→
O20ab	→2)-β-D-Ribf-(1→4)-α-D-Gal-(1→ Vasil'ev & Zakharova (1976)
O20ac	α-D-Gal-(1→3) →2)-β-D-Ribf-(1→4)-α-D-Gal-(1→
O52	→3)-β-D-Fucf-(1→3)-β-D-6dmanHep2Ac-(1→
O97	→3)-α-L-Rha-(1→3)-β-L-Rha-(1→ β-D-Xulf-(2→2)β-D-Xulf-(2→2)
O101	→6)-α-D-GlcNAc-(1→4)-α-D-GalNAc-(1→

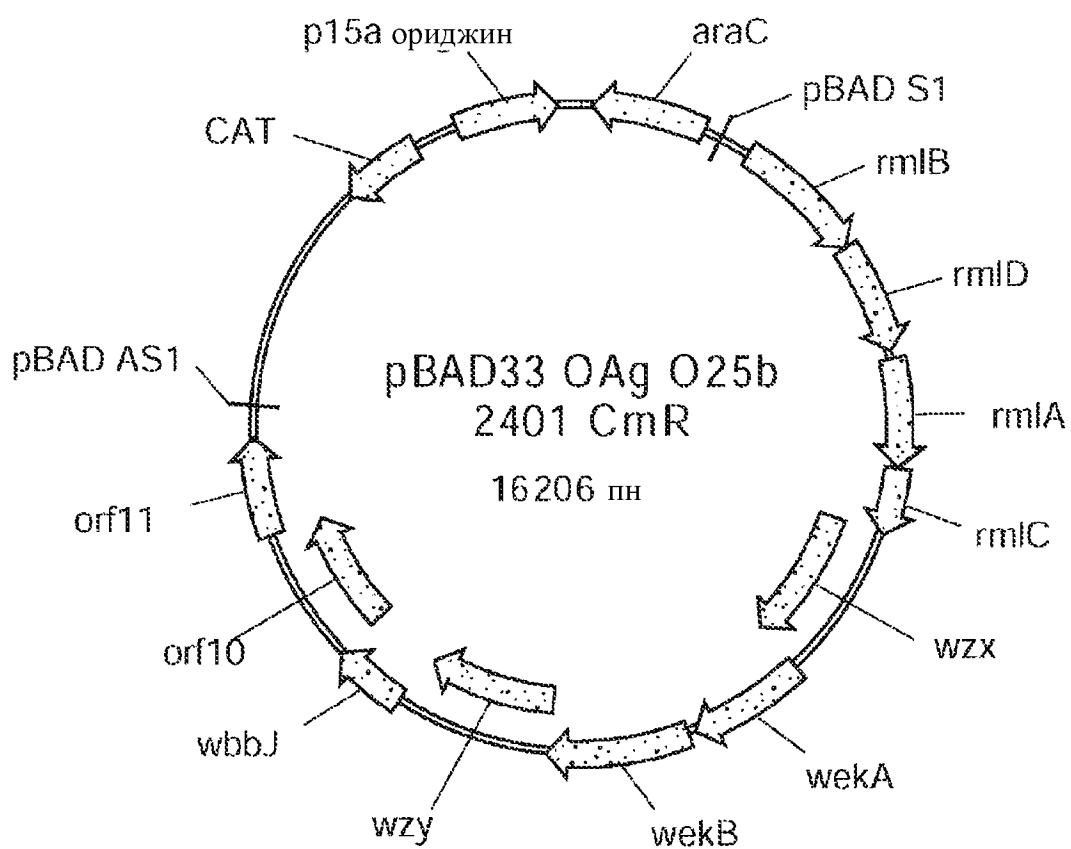
Фиг. 11



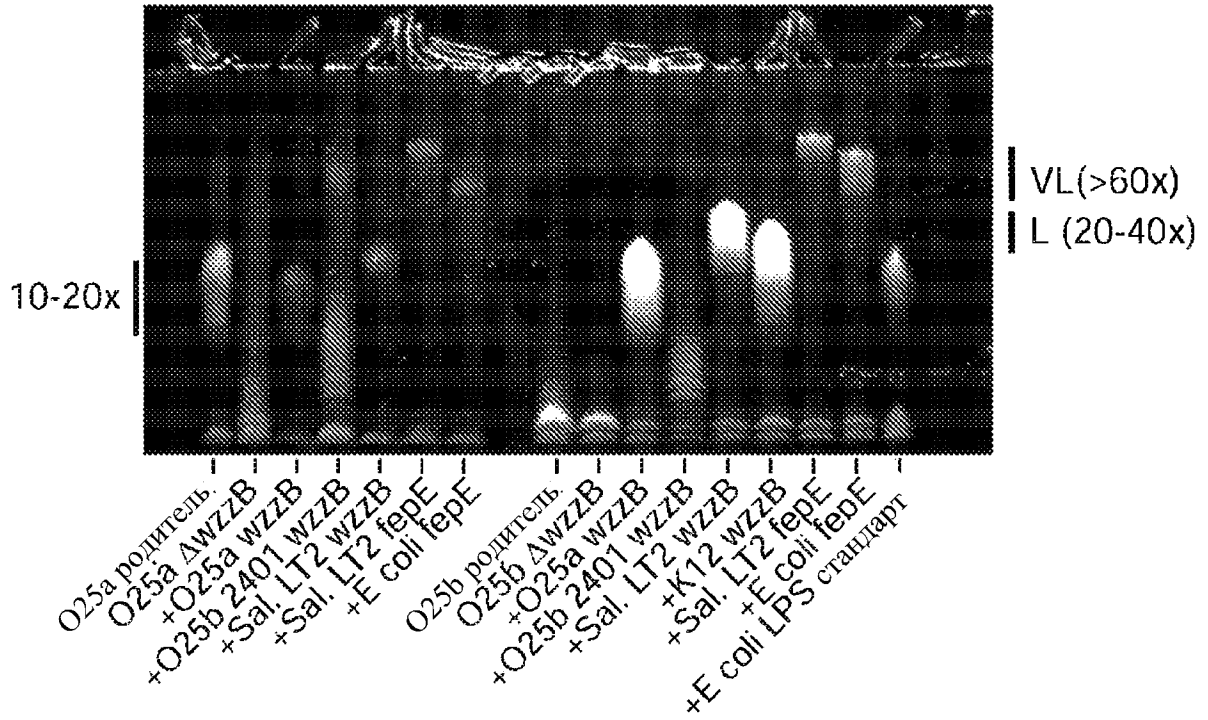
Фиг. 12А



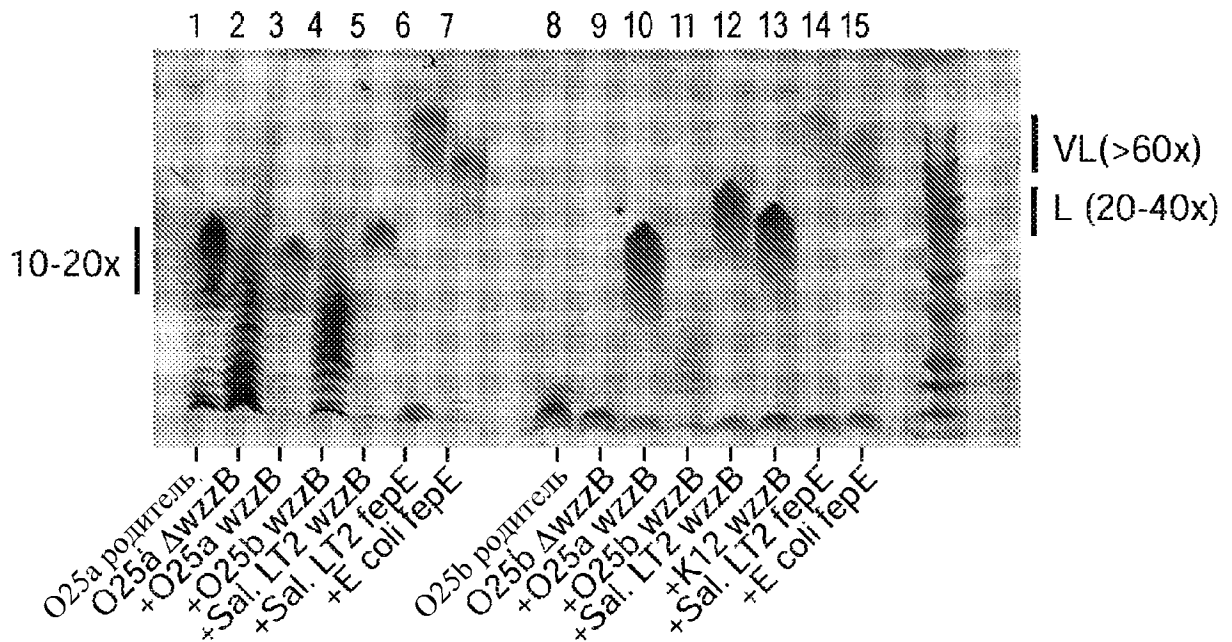
Фиг. 12В



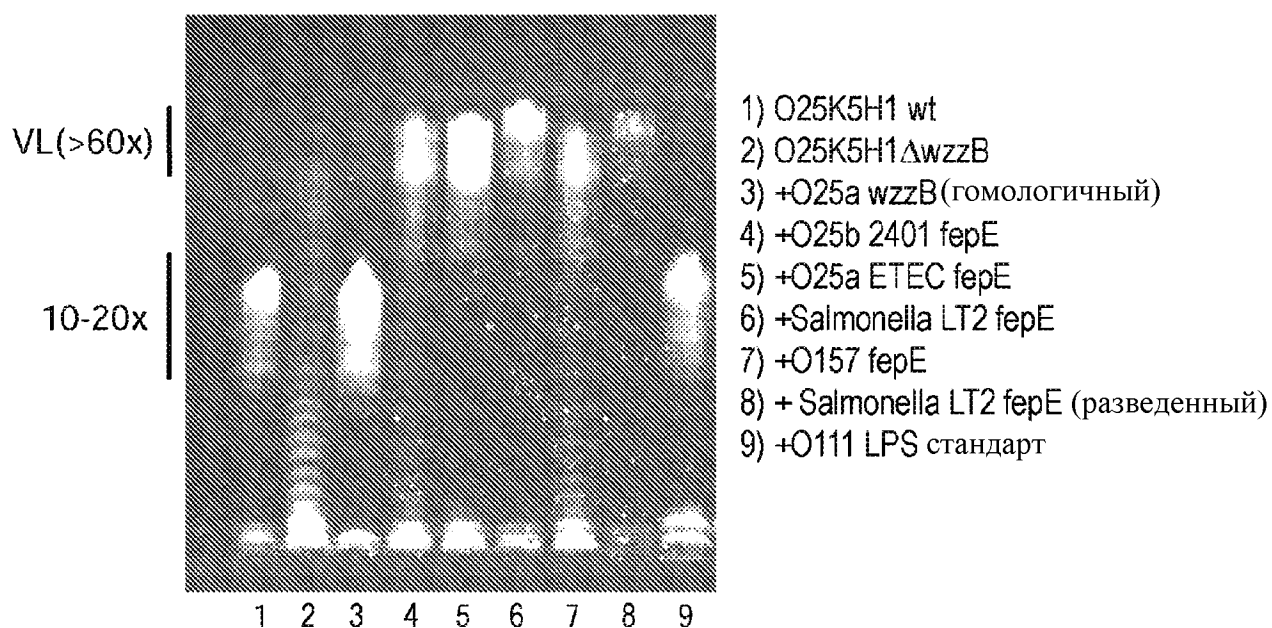
Фиг. 13А



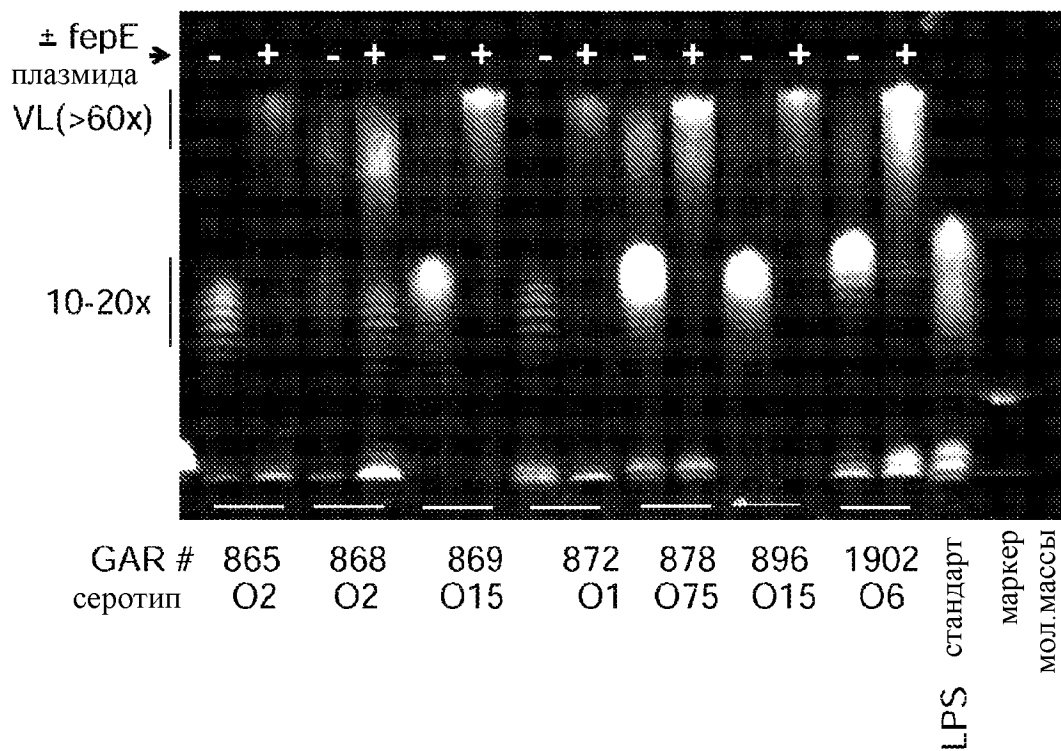
Фиг. 13В



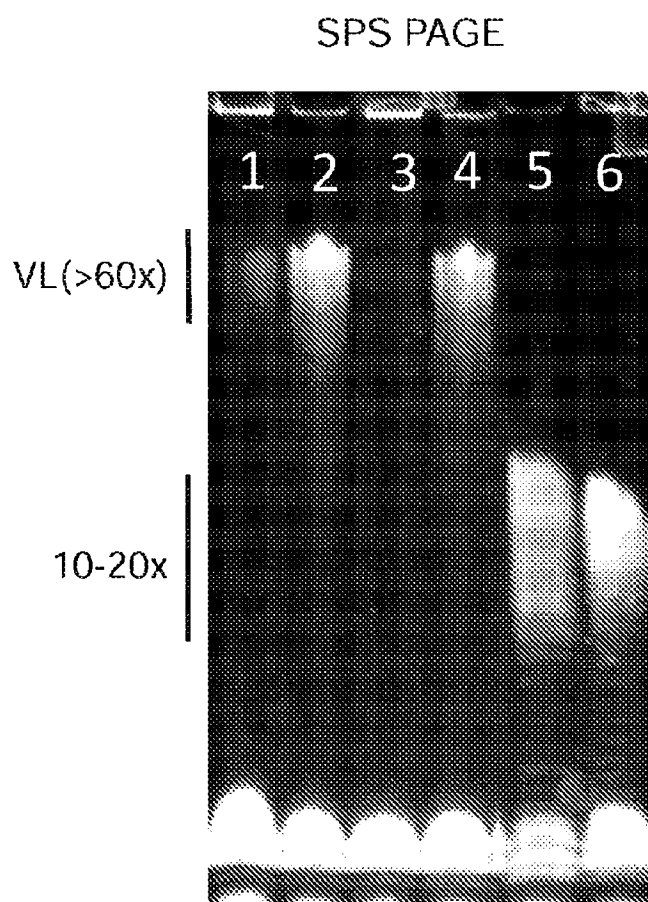
Фиг. 14



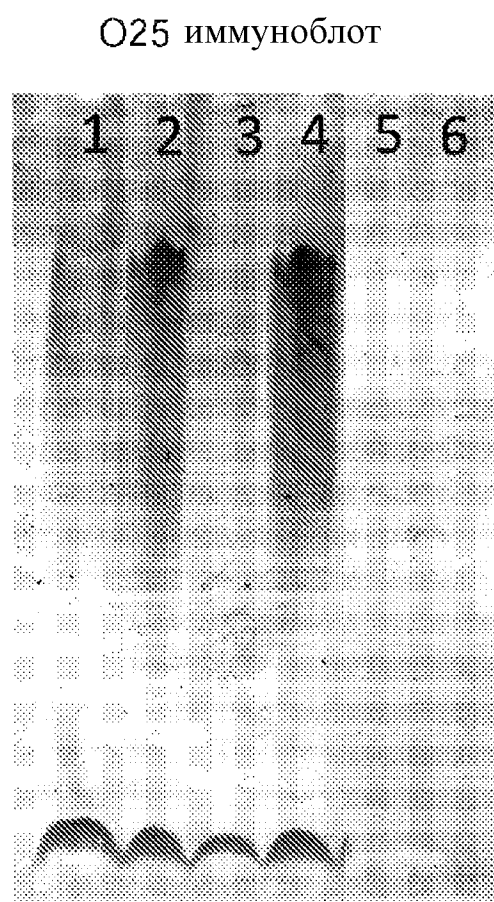
Фиг. 15



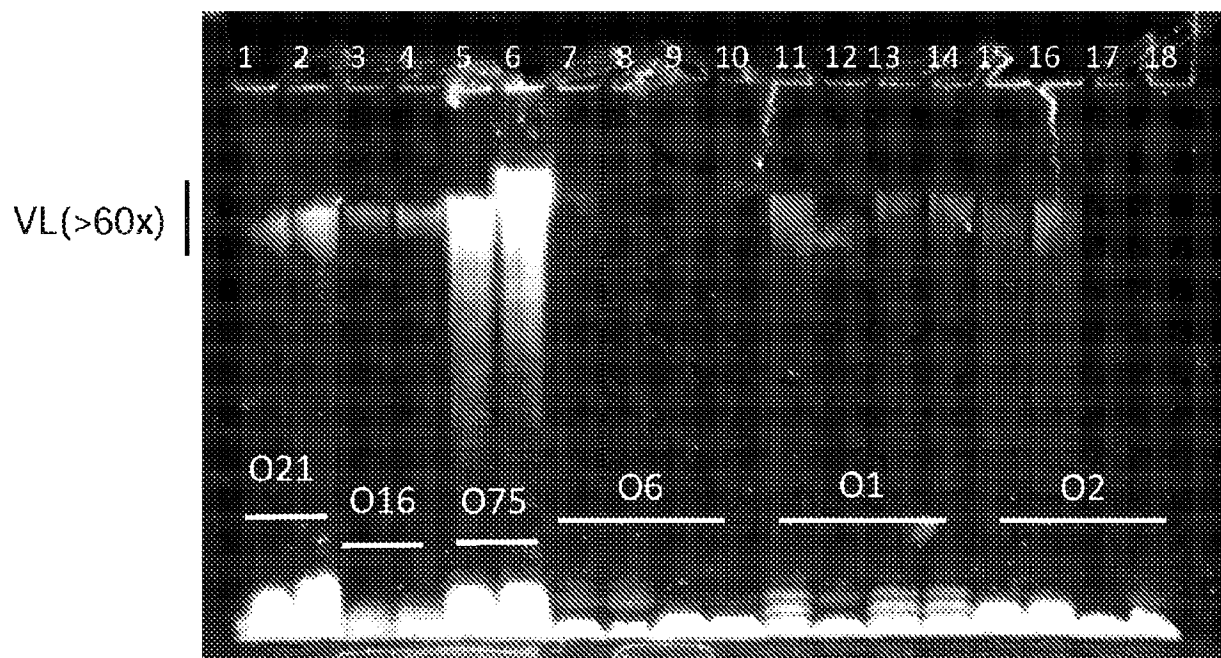
Фиг. 16А



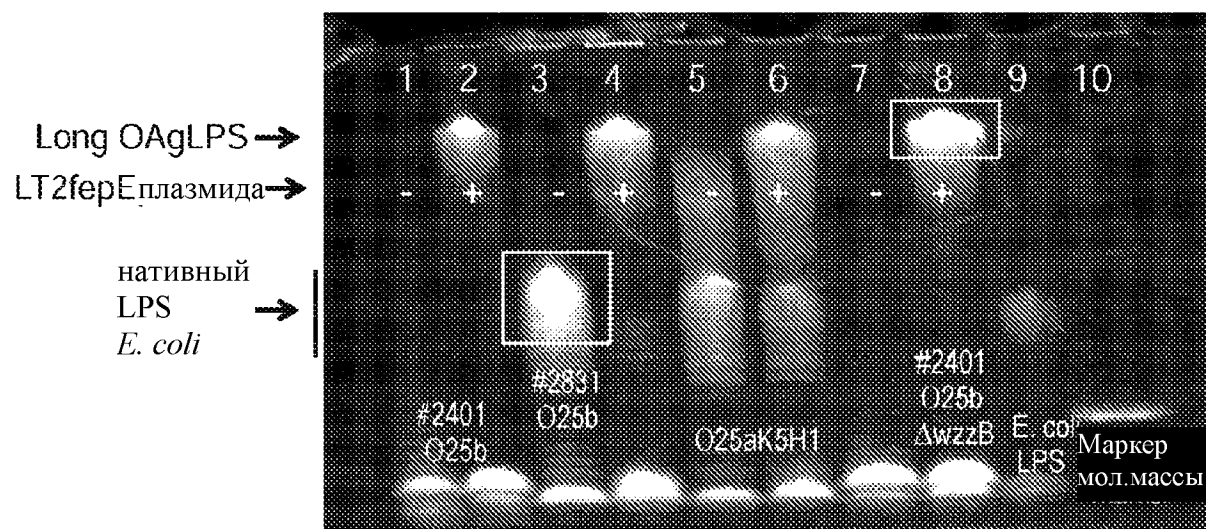
Фиг. 16В

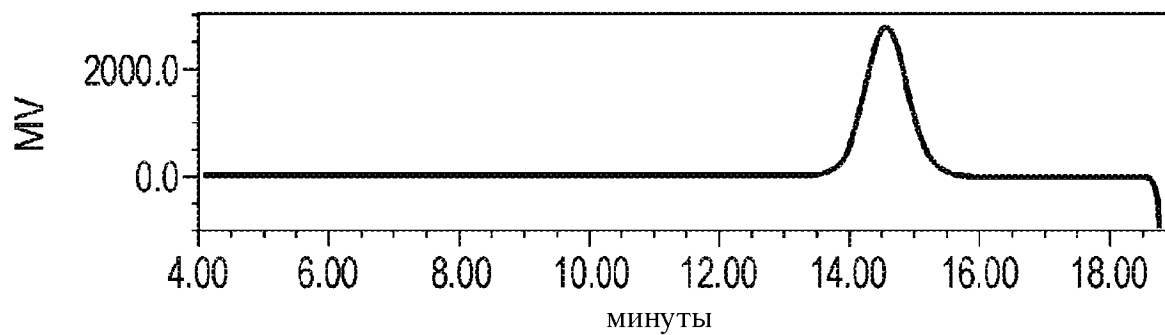
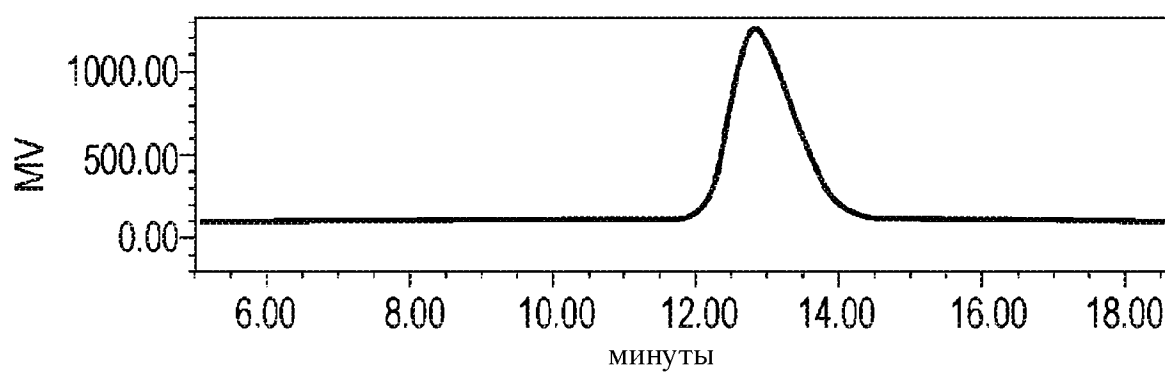


Фиг. 17

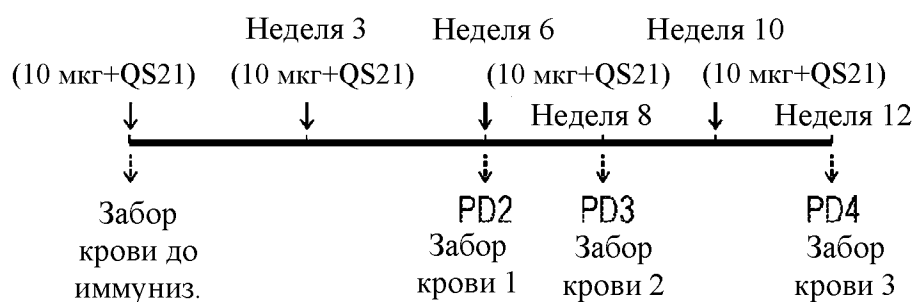


Фиг. 18

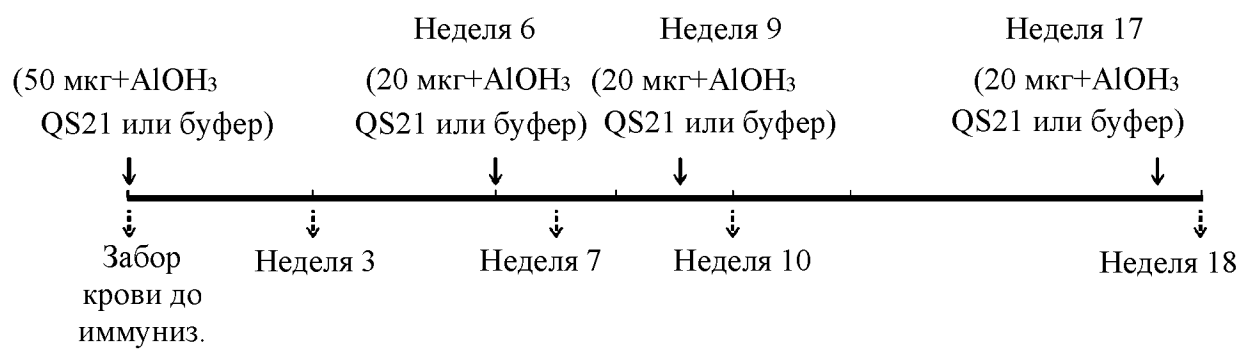


Фиг. 19А**Фиг. 19В**

Фиг. 20А



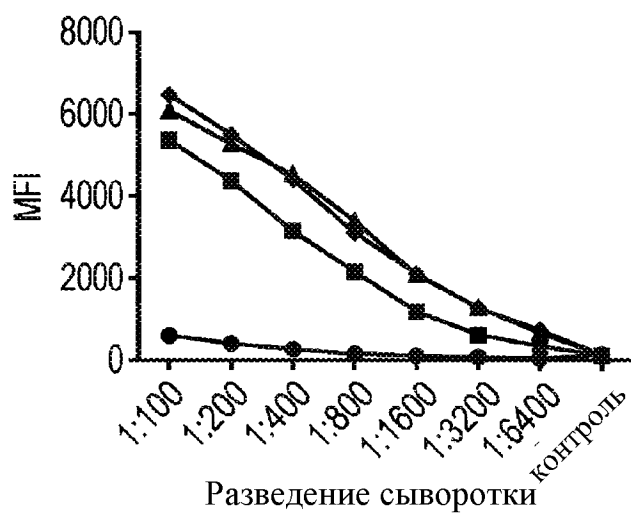
Фиг. 20В



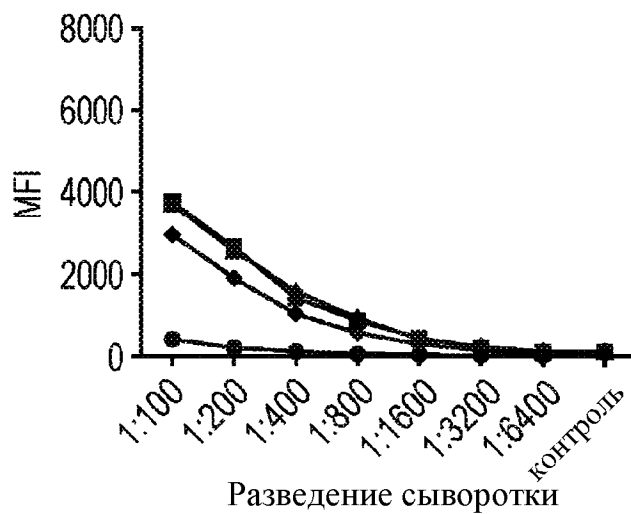
Фиг. 21А



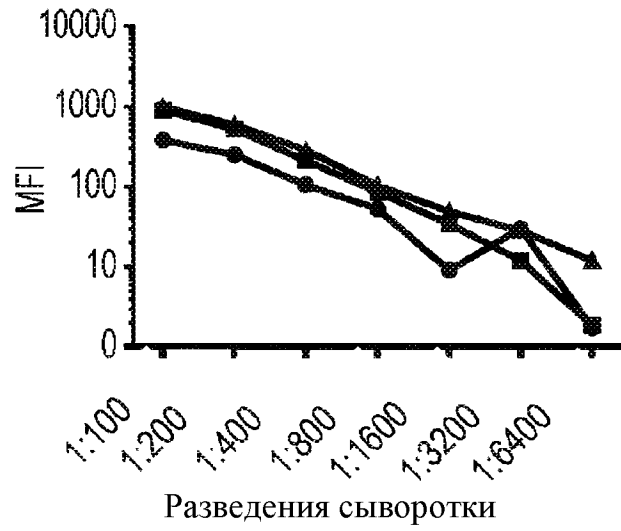
Фиг. 21В



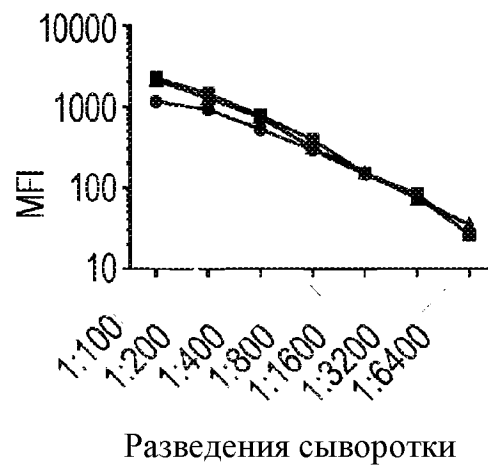
Фиг. 21С



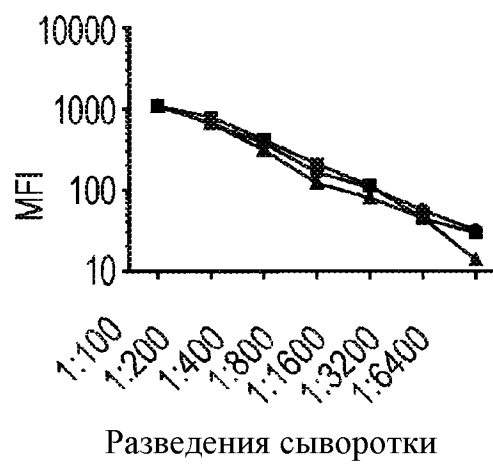
Фиг. 22А



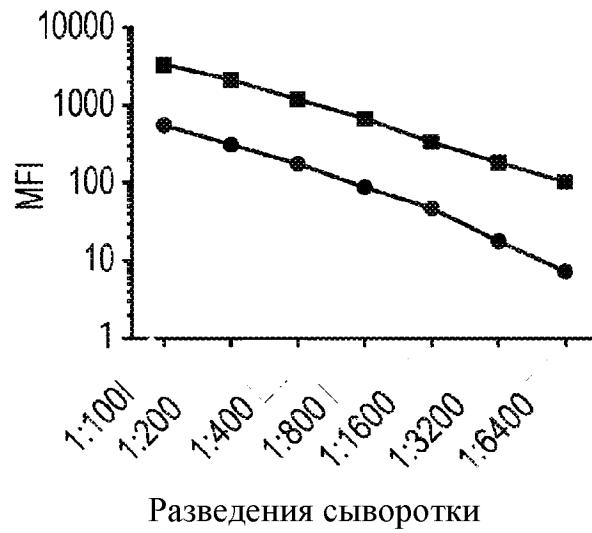
Фиг. 22В



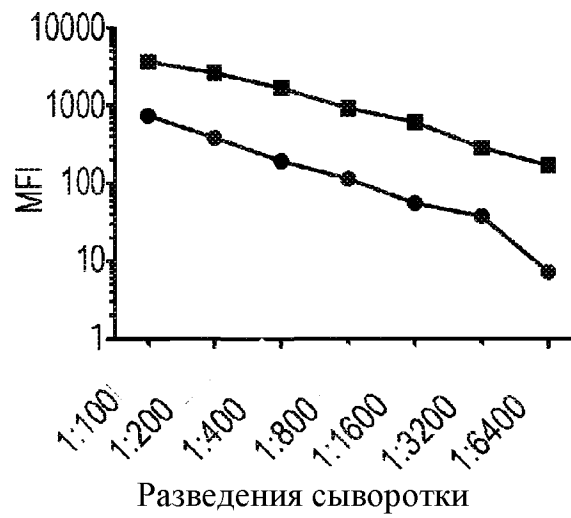
Фиг. 22С



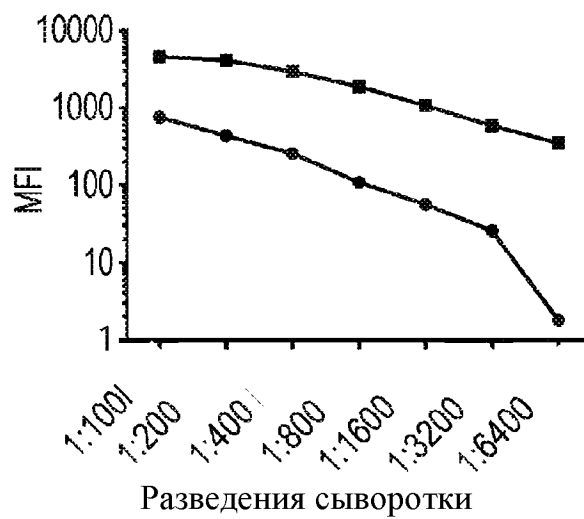
Фиг. 22D



Фиг. 22E



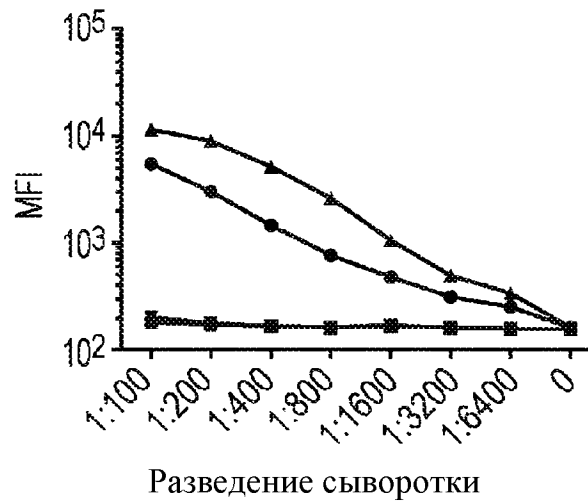
Фиг. 22F



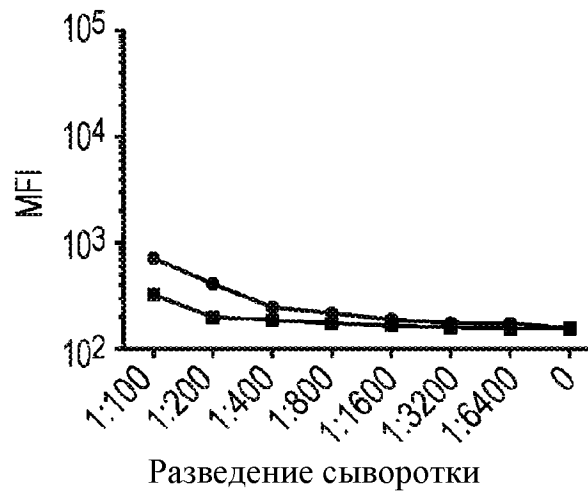
Фиг. 23А



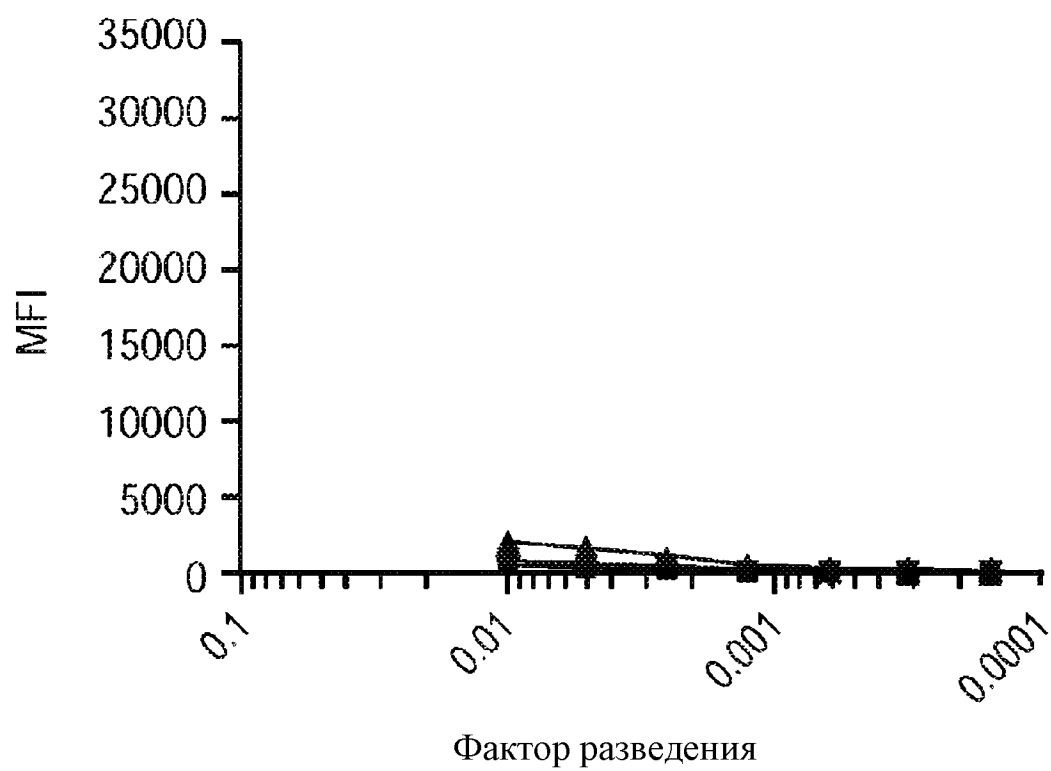
Фиг. 23В



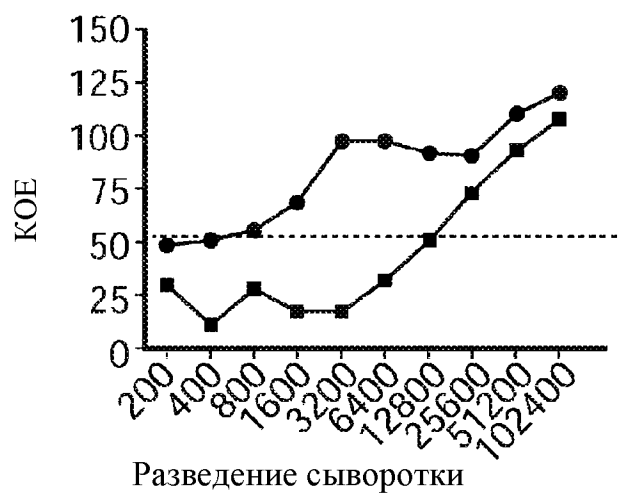
Фиг. 23С



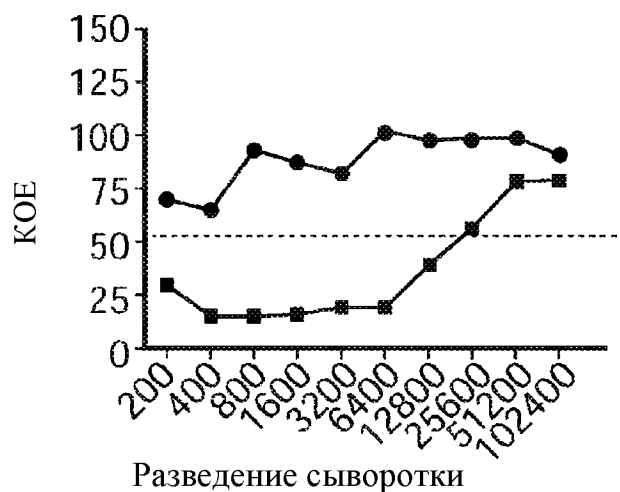
Фиг. 25



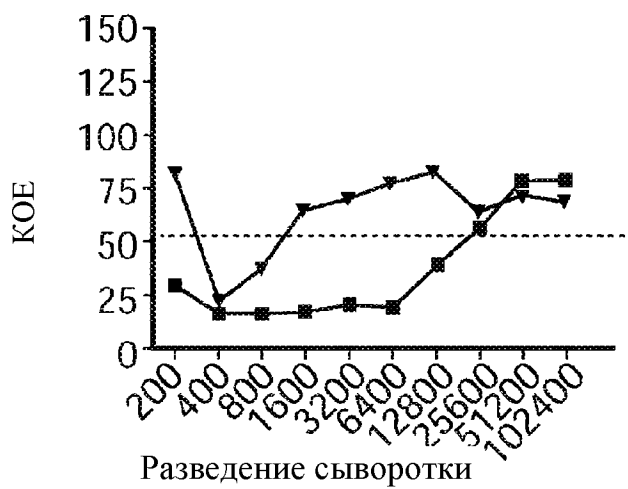
Фиг. 26А



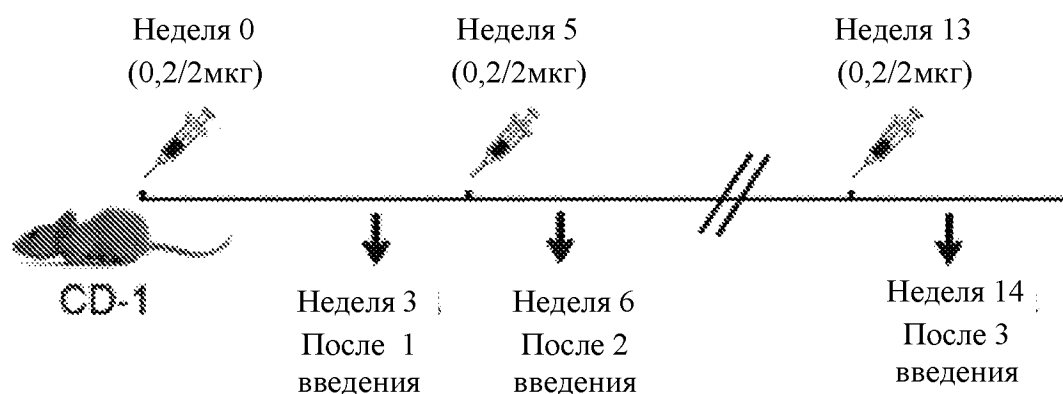
Фиг. 26В



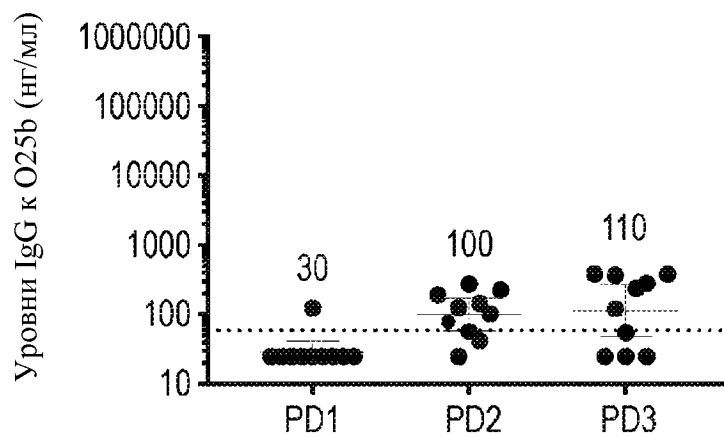
Фиг. 26С



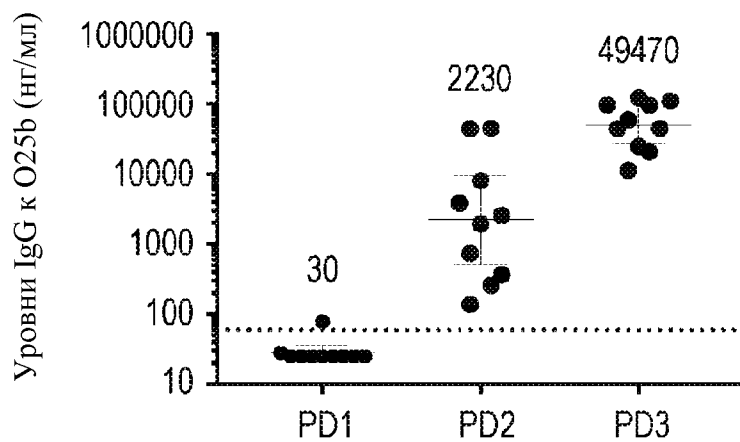
Фиг. 27А



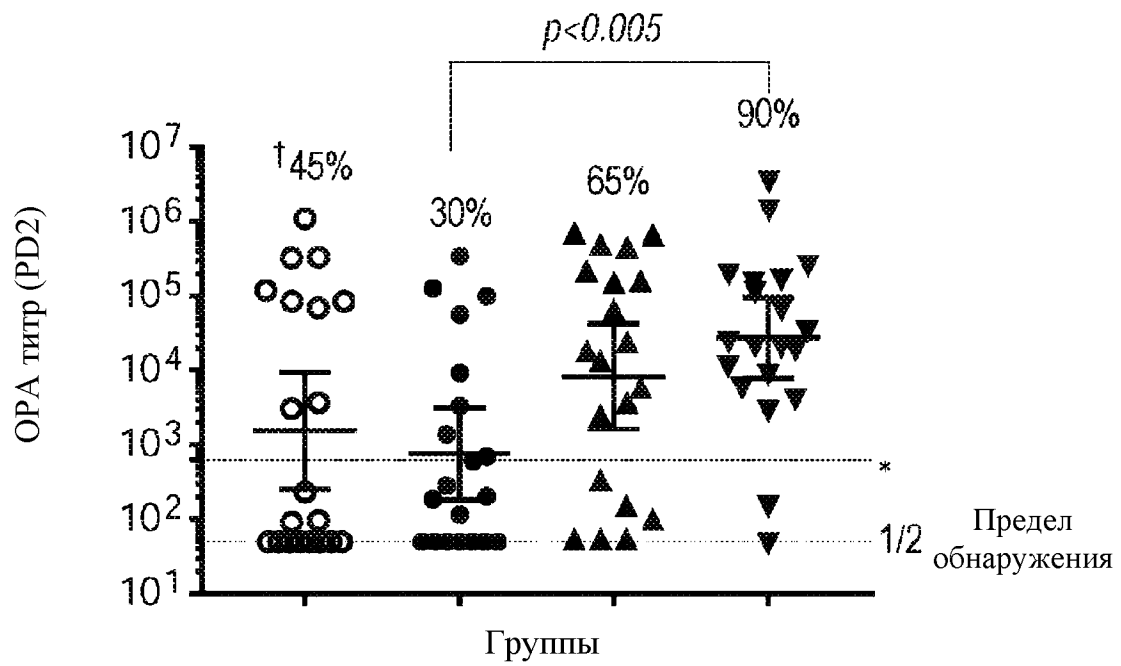
Фиг. 27В



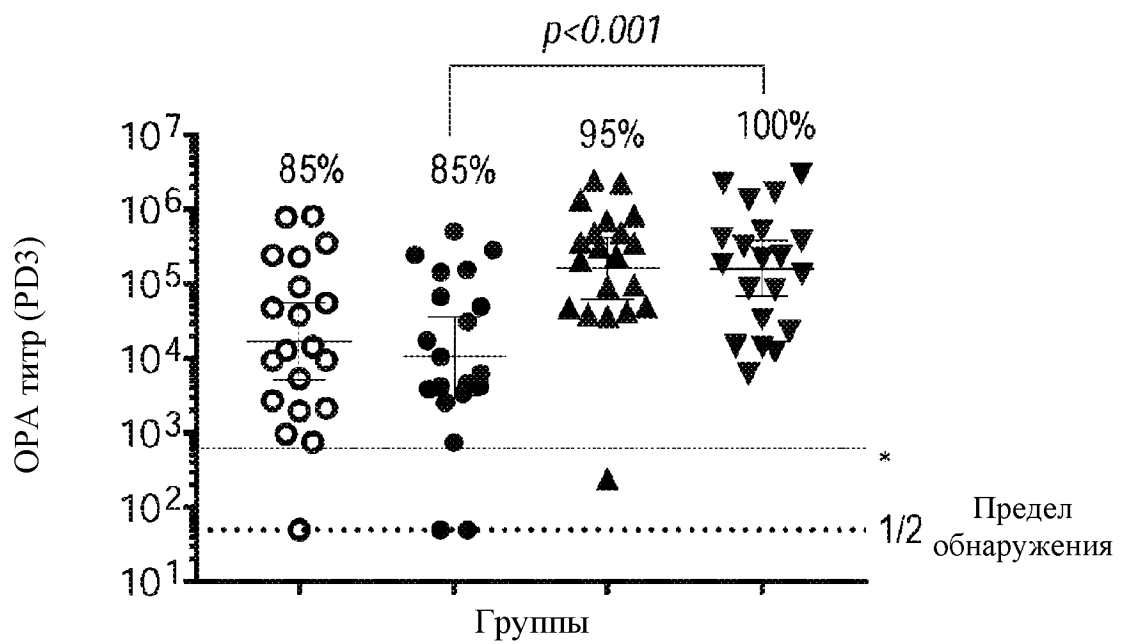
Фиг. 27С



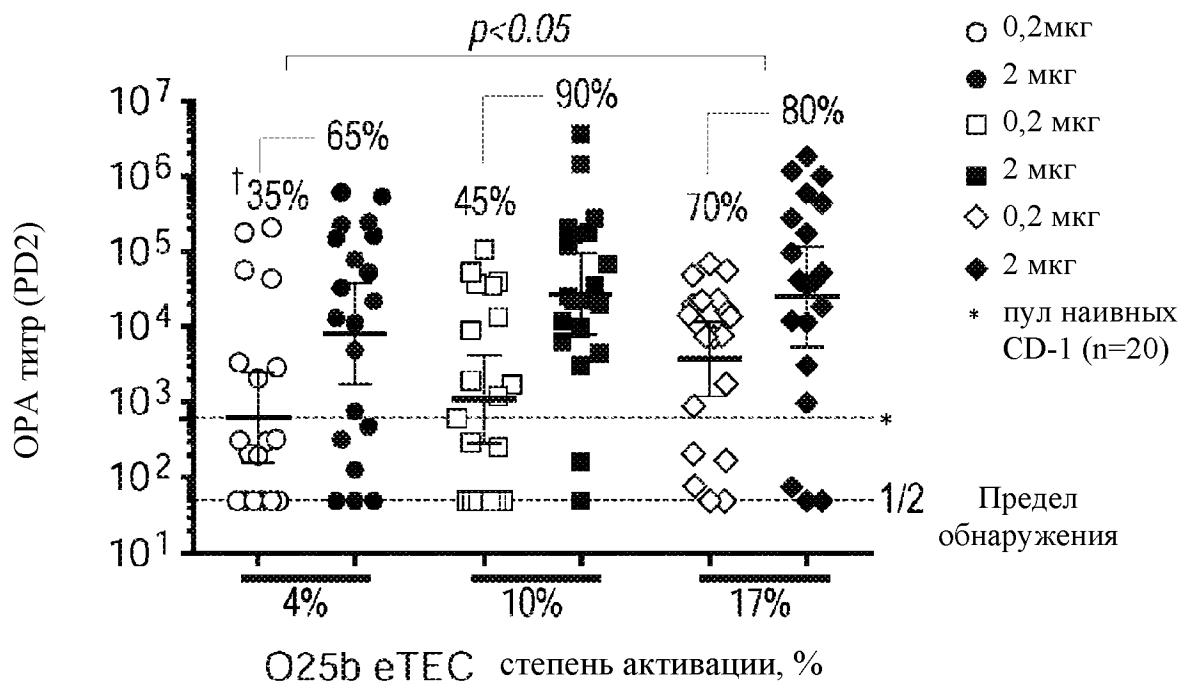
Фиг. 28А



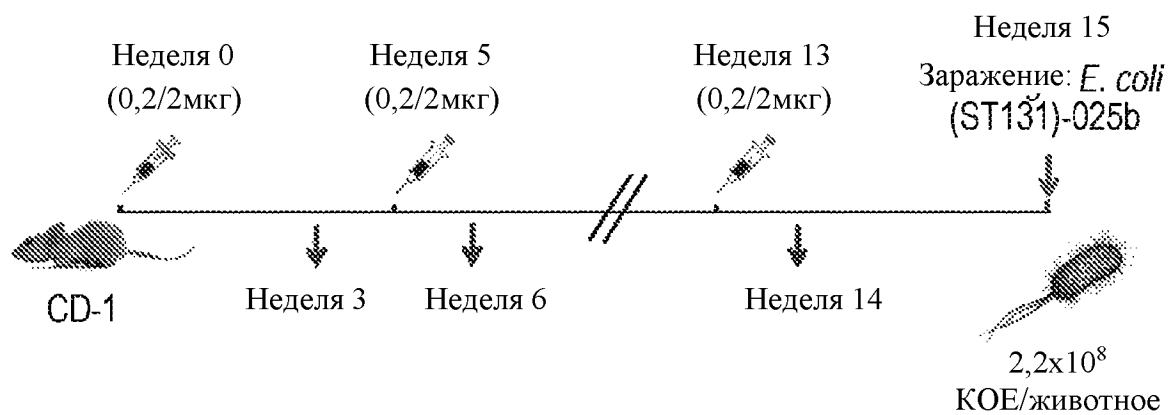
Фиг. 28В



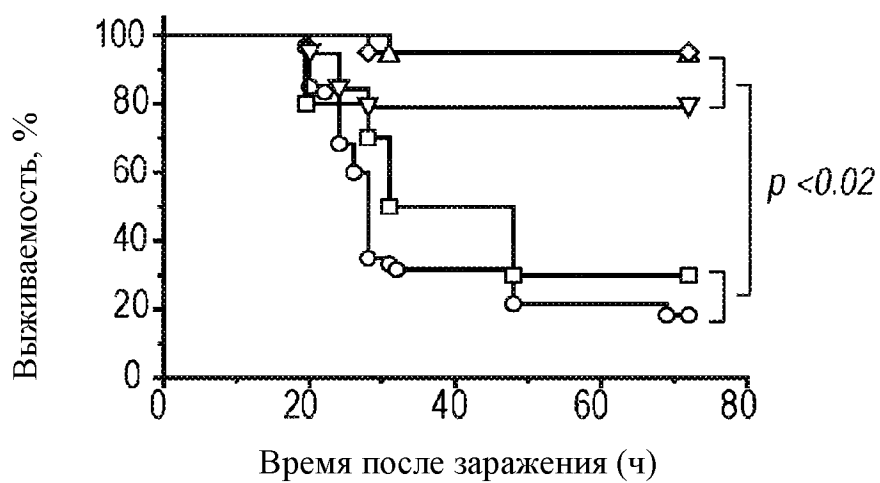
Фиг. 29



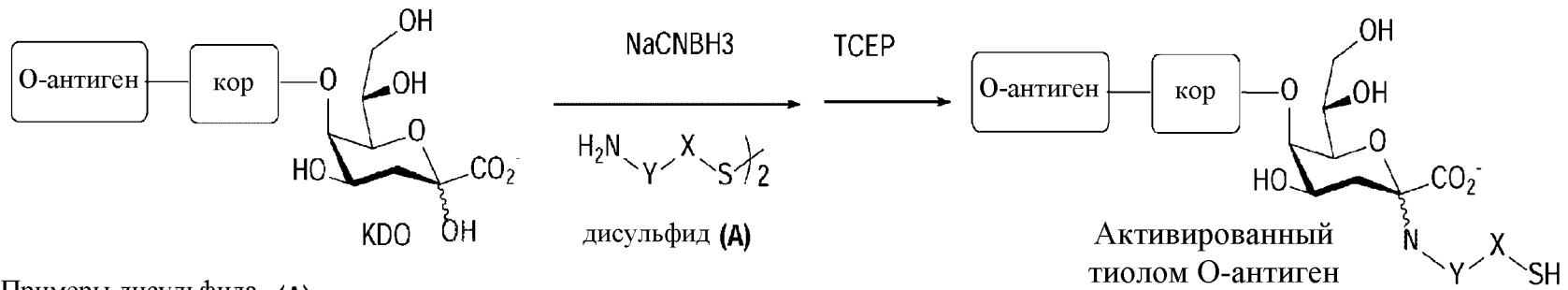
Фиг. 30А



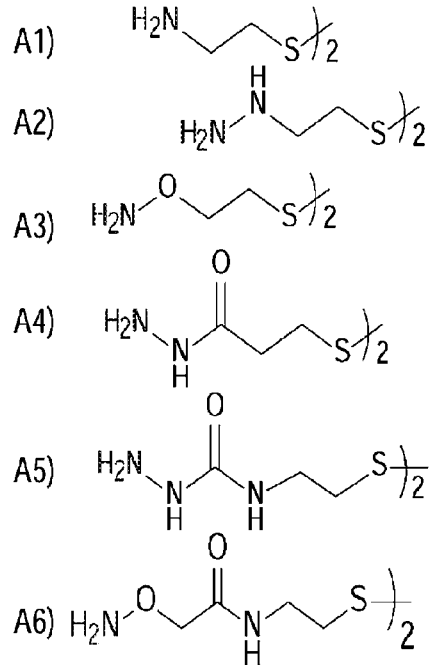
Фиг. 30В



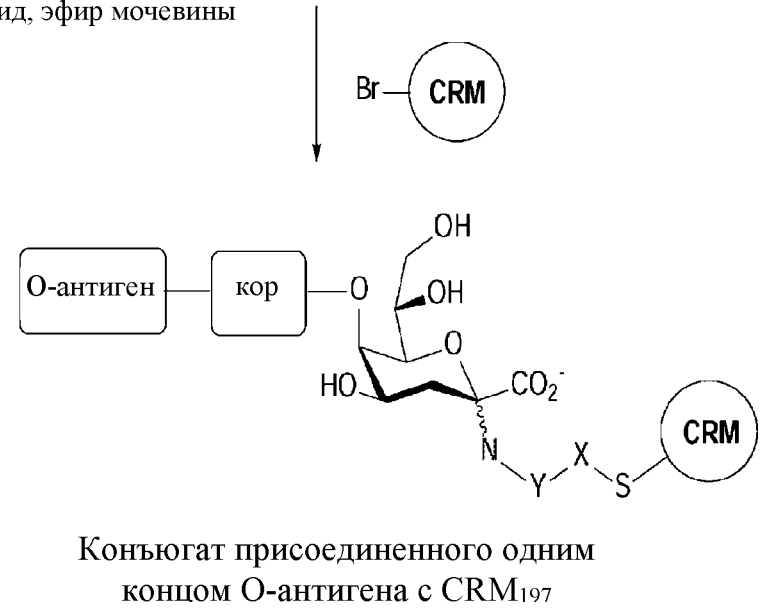
Фиг. 31



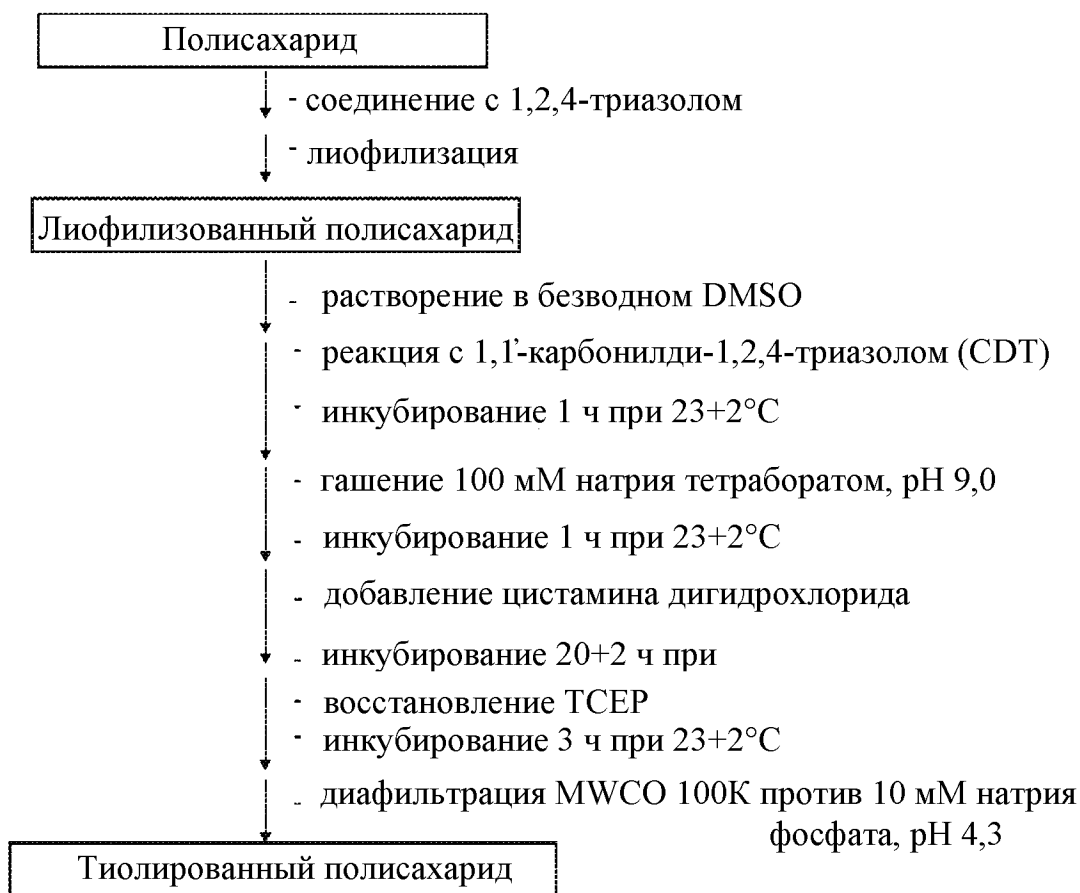
Примеры дисульфида (A):



X = алкильная цепь с 1-6 атомами углерода
 Y = ничего, кислород, азот, амид, эфир мочевины



Фиг. 32А



Фиг. 32В

