

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292122** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.10

(22) Дата подачи заявки
2021.01.14

(51) Int. Cl. *A61K 39/108* (2006.01)
C07K 14/245 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)

(54) МУТАНТНАЯ ФОРМА FimH, КОМПОЗИЦИИ НА ЕЕ ОСНОВЕ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **20152217.4**

(32) **2020.01.16**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2021/050707**

(87) **WO 2021/144369 2021.07.22**

(71) Заявитель:
ЯНССЕН ФАРМАСЬЮТИКЛЗ, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:

**Грейпстра Ян, Верденбург Эвелине
Марлен, Гёртсен Йерун, Фае Келлен
Кристина, Фейтсма Лаурис Якоб (NL)**

(74) Представитель:

**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(57) Описаны полипептиды, содержащие лектиновый домен FimH, содержащий аминокислотную мутацию, которая приводит к тому, что лектиновый домен FimH находится в конформации с низкой аффинностью к маннозе. Дополнительно, описаны фармацевтические композиции, которые содержат такие полипептиды, и способы стимуляции иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, путем введения полипептида.

202292122

A1

A1

202292122

МУТАНТНАЯ ФОРМА FimH, КОМПОЗИЦИИ НА ЕЕ ОСНОВЕ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

5

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к областям медицинской микробиологии, иммунологии и разработки вакцин. В частности, настоящее изобретение относится к полипептидам, содержащим лектиновый домен FimH, содержащий аминокислотную мутацию, которая приводит к тому, что лектиновый домен FimH находится в конформации с низкой аффинностью к маннозе и индуцирует высокие уровни опосредованного антителами ингибирования адгезии *E. coli* к эпителиальным клеткам мочевого пузыря. Кроме того, настоящее изобретение относится к композициям, которые содержат такие полипептиды, и к способам стимуляции иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, путем введения иммуногенного полипептида.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Штаммы *E. coli*, приводящие к внекишечным инфекциям, генетически отличны от штаммов, которые вызывают кишечное заболевание, и получили название внекишечные патогенные *E. coli* (ExPEC). ExPEC являются наиболее распространенными кишечными грамотрицательными микроорганизмами, вызывающими внекишечную инфекцию в амбулаторных, стационарных и больничных условиях. Типичные внекишечные инфекции, обусловленные *E. coli*, включают инфекцию мочевыводящих путей (UTI), различные внутрибрюшные инфекции (IAI), пневмонию, инфекцию в области хирургического вмешательства, менингит, инфекцию внутрисосудистых устройств, остеомиелит и инфекции мягких тканей, все из которых могут сопровождаться бактериемией. *E. coli* является ведущей причиной тяжелого сепсиса и приводит к высоким показателям заболеваемости и смертности.

ExPEC, как и другие представители семейства Enterobacteriaceae, образует фимбрии I типа, которые помогают прикрепляться к эпителиальным поверхностям слизистой оболочки. Такие фимбрии I типа представляют собой волосоподобные структуры, которые выходят из поверхности у представителей семейства Enterobacteriaceae. Главным компонентом фимбрий I типа являются повторяющиеся субъединицы FimA, расположенные в виде правозакрученной спирали с

формированием филамента длиной приблизительно 1 мкм и диаметром 7 нм с центральным аксиальным отверстием (Brinton, 1965). В дополнение к FimA в качестве главной субъединицы фимбриальный филамент также содержит FimF, FimG и FimH в качестве минорных белковых субъединиц. Минорная белковая субъединица FimH представляет собой маннан-связывающий адгезин, который содействует прикреплению бактерий с фимбриями I типа к маннозосодержащим гликопротеинам на поверхности эукариотических клеток и представляет семейство белков, которые связываются с различными мишенями, включая маннан и фибронектин. Иммунологические исследования с помощью электронной микроскопии показали, что FimH расположен стратегически на дистальных кончиках фимбрий I типа, где он, по-видимому, образует комплекс с FimG, формируя гибкую фибриллярную структуру, а также расположен по длине филамента с различными интервалами.

Было показано, что белок-адгезин FimH индуцирует защиту при применении в качестве вакцины против UTI в различных доклинических моделях (Langermann S, et al., 1997, Science, 276: 607-611; Langermann S, et al., 2000, J Infect Dis, 181: 774-778; O'Brien VP et al., 2016, Nat Microbiol, 2:16196). В 1999 г. компания Medimmune представила субъединичную вакцину, содержащую FimH, для испытаний фазы II, но разработка вакцины прекратилась в 2003 г. из-за недостаточной эффективности в предупреждении UTI (см., например, Brumbaugh AR and Mobley HLT, 2012, Expert Rev Vaccines, 11: 663-676). Тем не менее, компания Sequoia Sciences, по-видимому, в настоящее время ведет клиническую разработку вакцины для рецидивирующих UTI, вакцины, состоящей из белка FimH в комплексе с белком FimC, и объединенной с новым адъювантным составом. Компания сообщает, что данная вакцина была высокоиммуногенной и хорошо переносимой и может снижать частоту UTI, хотя ее безопасность и эффективность еще необходимо установить (<https://www.sequoiasciences.com/uti-vaccine-program>).

Было показано, что во время инфекции *E. coli* лектиновый домен адгезина FimH, который связывается с маннозилированными рецепторами, может принимать две различные конформации: с низкой аффинностью к маннозе (напряженную) и высокой аффинностью к маннозе (вытянутую/расслабленную) (Kalas et al, 2017, Sci Adv 10;3(2)). Конформация с низкой аффинностью содействует подвижности бактерий и колонизации новых тканей. Конформация с высокой аффинностью обеспечивает прочную адгезию бактерии в условиях действия механических сил экскреции мочи (Kalas et al, 2017, выше). Кроме того, было показано, что антитела против варианта с

низкой аффинностью блокируют связывание бактерий с клетками уротелия и снижают количество КОЕ в мочевом пузыре (Tchesnokova, 2011 Infect Immun. 79(10):3895-904; Kisiela, 2013 Proc Natl Acad Sci, 19;110(47):19089-94).

В WO 02102974 описан целый ряд мутантных форм FimH, все из которых содержат аминокислотную модификацию в области впадины молекулы. В частности, в WO 02102974 описаны варианты, в которых мутированы взаимодействующие с маннозой остатки в кармане связывания. Данное местоположение мутации выбрано потому, что оно будет поддерживать мутантную форму FimH в более открытой конформации и, таким образом, откроет эпитопы, которые слабо доступны в белке дикого типа. Однако на сегодняшний день, по информации, имеющейся у авторов настоящего изобретения, ни одна из этих мутантных форм не рассматривалась в дальнейшем в качестве вакцин-кандидатов. В клинических испытаниях были использованы только FimH дикого типа.

Таким образом, в данной области техники сохраняется потребность в вакцинах, которые могут индуцировать антитела с высокой ингибирующей активностью против бактериальных инфекций, вызванных *E. coli*.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте настоящего изобретения представлен полипептид, содержащий лектиновый домен FimH, где лектиновый домен FimH содержит аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из валина (V), изолейцина (I), лейцина (L), глицина (G), метионина (M) и аланина (A), в положении, которое соответствует положению 144 в SEQ ID NO: 1.

Во втором аспекте настоящего изобретения представлен комплекс, содержащий полноразмерный полипептид FimH согласно настоящему изобретению и FimC (FimCH).

В третьем аспекте настоящего изобретения представлен полинуклеотид, кодирующий полипептид согласно настоящему изобретению.

В четвертом аспекте настоящего изобретения представлена фармацевтическая композиция, содержащая полипептид согласно настоящему изобретению, комплекс согласно настоящему изобретению или полинуклеотид согласно настоящему изобретению.

В пятом аспекте настоящего изобретения представлен полипептид согласно настоящему изобретению, комплекс согласно настоящему изобретению,

полинуклеотид согласно настоящему изобретению или фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного препарата.

В шестом аспекте настоящего изобретения представлен полипептид согласно
 5 настоящему изобретению, комплекс согласно настоящему изобретению, полинуклеотид согласно настоящему изобретению или фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению для применения в индуцировании иммунного
 10 ответа против бактерии семейства Enterobacteriaceae. Настоящее изобретение дополнительно относится к способу лечения или предупреждения состояния, связанного с энтеробактериями, у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ
 включает введение эффективного количества полипептида согласно настоящему изобретению, полинуклеотида согласно настоящему изобретению или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению.

В шестом аспекте настоящего изобретения представлен вектор, содержащий
 15 полинуклеотид согласно настоящему изобретению.

В седьмом аспекте настоящего изобретения дополнительно представлен способ получения полипептида, включающий осуществление экспрессии полипептида за счет
 рекомбинантной клетки, содержащей полинуклеотид по настоящему изобретению и/или вектор по настоящему изобретению, необязательно способ дополнительно
 20 включает выделение полипептида, за которым необязательно следует составление полипептида в фармацевтическую композицию.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1. Уровни антител к FimH (общий IgG) в сыворотке крови, индуцированные
 25 различными вариантами FimH. Крысы Вистар (n = 2) получили 4 внутримышечные иммунизации в день 0, 7, 10 и 18 с использованием 60 мкг/доза различных вариантов FimH в комбинации с адъювантом, отличным от адъюванта Фрейнда (модель Speedy-rat, Eurogentec). Уровни антител к FimH измеряли с помощью ELISA до иммунизации (день 0, незакрашенные кружки) и после иммунизации (день 28, закрашенные кружки).
 30 Данные представляют среднее образцов сыворотки крови в двух повторностях от 2 животных/группа. Титры антител (EC50) рассчитывали на основе 4-параметрической логистической регрессионной модели, аппроксимированной по 12-ступенчатой кривой разведения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении представлен новый полипептид, содержащий лектиновый домен FimH, где лектиновый домен FimH "заперт" в конформации с низкой аффинностью к маннозе, также обозначаемой в данном документе как "конформация с низкой аффинностью". Настоящее изобретение основано отчасти на наблюдении того, что антиген FimH в конформации с низкой аффинностью к маннозе способен индуцировать антитела, которые могут ингибировать опосредованную маннозидом адгезию. Такие антитела характеризуются высокой ингибирующей активностью и усиленным эффектом в предупреждении или лечении бактериальных инфекций. В данном документе обнаружили, что лектиновый домен FimH с мутацией F144V характеризуется удивительно хорошей комбинацией требуемых свойств, что делает его очень подходящим для применения в вакцинах против UTI, т. е. для предупреждения или сокращения рецидивов UTI.

Соответственно, в первом аспекте настоящего изобретения представлен полипептид, предпочтительно к иммуногенный полипептид, содержащий лектиновый домен FimH, где лектиновый домен FimH содержит аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из валина (V), изолейцина (I), лейцина (L), глицина (G), метионина (M) и аланина (A), в положении, которое соответствует положению 144 в SEQ ID NO: 1.

Аминокислотное положение 144 относится к положению 144 в эталонной аминокислотной последовательности лектинового домена FimH под SEQ ID NO: 1. В аминокислотных последовательностях по настоящему изобретению, отличных от SEQ ID NO: 1, предпочтительно, положение аминокислоты 144 присутствует в аминокислотном положении, соответствующем положению 144 в SEQ ID NO: 1, предпочтительно при выравнивании последовательностей в ClustalW (1.83) с использованием настроек по умолчанию. Специалисту в данной области техники будет известно, как идентифицировать соответствующие аминокислотные положения в аминокислотных последовательностях лектинового домена FimH, отличных от SEQ ID NO: 1, с применением алгоритмов выравнивания аминокислотных последовательностей, определенных в данном документе выше.

В одном варианте осуществления полипептид, содержащий лектиновый домен FimH согласно настоящему изобретению, содержит мутацию, которая приводит к тому, что лектиновый домен FimH находится в конформации с низкой аффинностью к маннозе. В одном варианте осуществления полипептид, содержащий лектиновый

домен FimH согласно настоящему изобретению, был мутирован в положении, которое соответствует положению 144 в SEQ ID NO: 1. Мутация может представлять собой любое из делеции, добавления или замены одного аминокислотного остатка. Предпочтительно мутация представляет собой замену одного аминокислотного остатка. Предпочтительно мутация представляет собой замену аминокислотного остатка, который соответствует положению 144 в SEQ ID NO: 1. Предпочтительно мутация представляет собой замену аминокислотного остатка фенилаланина (F) в положении, соответствующем положению 144 в SEQ ID NO: 1. В полипептиде, содержащем лектиновый домен FimH по настоящему изобретению, положение, которое соответствует положению 144 в SEQ ID NO: 1, предпочтительно содержит замену на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из валина (V), изолейцина (I), лейцина (L), глицина (G), метионина (M) и аланина (A). Термины 'мутация', 'мутированный' или 'замена', 'заменен' в данном контексте означают, что в указанном положении присутствует другая аминокислота, чем в соответствующей исходной молекуле, которая в данном документе представляет собой полипептид, содержащий лектиновый домен FimH с F в положении 144. Такая исходная молекула может существовать физически в виде полипептида или в форме нуклеиновой кислоты, кодирующей такой полипептид, но может также просто существовать *in silico* или на бумажном носителе в виде аминокислотной последовательности или соответствующей последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность. Следовательно, в данном контексте мутация или замена также считается присутствующей, например, если белок экспрессируется с нуклеиновой кислоты, которая была синтезирована таким образом, что она кодирует мутацию или замену, даже в том случае, если нуклеиновая кислота, кодирующая соответствующую исходную молекулу, не была изначально фактически получена в ходе такого процесса, т.е. если молекула нуклеиновой кислоты была получена исключительно путем химического синтеза.

В одном предпочтительном варианте осуществления полипептид, содержащий лектиновый домен FimH по настоящему изобретению, содержит замену фенилаланина (F) на валин (V) в положении 144. В определенных вариантах осуществления полипептид, содержащий лектиновый домен FimH по настоящему изобретению, представляет собой не встречающийся в природе полипептид, который содержит валин в положении 144. В определенных вариантах осуществления полипептид, содержащий

лектиновый домен FimH по настоящему изобретению, содержит валин в положении 144 вместо встречающегося в природе фенилаланина.

В одном варианте осуществления лектиновый домен FimH имеет аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1. Предпочтительно лектиновый домен FimH может содержать последовательность, имеющую SEQ ID NO: 1, за исключением положения 144, которое в случае лектинового домена FimH по настоящему изобретению заменено на валин (V), изолейцин (I), лейцин (L), глицин (G), метионин (M) или аланин (A).

Полноразмерный FimH (FimH_{FL}) состоит из двух доменов: N-концевого лектинового домена (FimH_{LD}), соединенного с С-концевым пилиновым доменом (FimH_{PD}) за счет короткого линкера из тетрапептидной петли. В одном варианте осуществления настоящего изобретения полипептид, содержащий лектиновый домен FimH согласно настоящему изобретению, дополнительно содержит пилиновый домен FimH. В одном предпочтительном варианте осуществления полипептид по настоящему изобретению представляет собой полноразмерный полипептид FimH, в котором лектиновый домен FimH содержит аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из валина (V), изолейцина (I), лейцина (L), глицина (G), метионина (M) и аланина (A), в положении, которое соответствует положению 144 в SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления полипептид представляет собой полноразмерный FimH, характеризующийся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2. Предпочтительно полноразмерный полипептид FimH может содержать последовательность, имеющую SEQ ID NO: 2, за исключением замены F144V, описанной в данном документе. В другом варианте осуществления полипептид представляет собой полноразмерный FimH, характеризующийся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4 или предпочтительно по меньшей мере с аминокислотами 22-300 из нее. Предпочтительно полноразмерный полипептид FimH может содержать последовательность, имеющую SEQ ID NO: 4, или более предпочтительно по меньшей мере аминокислоты 22-300 из нее, за исключением замены F144V, описанной в данном документе.

В определенных вариантах осуществления полипептид представляет собой полноразмерный FimH, характеризующийся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 23-45 и 55, описанной в US 6737063, который

5 включен в данный документ во всей своей полноте.

Полипептиды FimH являются высококонсервативными не только среди различных штаммов *E. coli*, но и среди широкого диапазона грамотрицательных бактерий. Более того, изменения аминокислот, наблюдаемые между штаммами, обычно происходят в сходных аминокислотных положениях. В результате высокой

10 консервативности FimH между штаммами *E. coli* полипептиды FimH из одного штамма способны индуцировать ответы с антителами, которые обеспечивают ингибирование или предупреждение связывания других штаммов *E. coli* с клетками за счет лектина FimH и/или обеспечивают защиту и/или лечение инфекции, вызванной другими штаммами *E. coli*. Соответственно, в одном варианте осуществления полноразмерный

15 FimH характеризуется по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 5 или предпочтительно по меньшей мере с аминокислотами 22-300 из нее. Предпочтительно полноразмерный полипептид FimH может содержать последовательность, имеющую SEQ ID NO: 5, или более предпочтительно по меньшей мере аминокислоты 22-300 из

20 нее, за исключением замены F144V, описанной в данном документе. В другом варианте осуществления полноразмерный FimH характеризуется по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 6. Предпочтительно полноразмерный полипептид FimH может содержать последовательность, имеющую SEQ ID NO: 6, за исключением

25 замены F144V, описанной в данном документе.

Используемый в данном документе термин "периплазматический шаперон" определяется как белок, локализованный в периплазме бактерий, который способен формировать комплексы с различными шаперон-связывающими белками посредством распознавания общего связывающего эпитопа (или эпитопов). Шапероны служат

30 матрицами, на которых белки, экспортированные из бактериальной клетки в периплазму, сворачиваются в свои нативные конформации. Ассоциация шаперон-связывающего белка с шапероном также служит для защиты связывающих белков от разрушения протеазами, локализованными внутри периплазмы, повышает их растворимость в водном растворе и приводит к их последовательному правильному

включению в собирающийся пилус. Белки-шапероны представляют собой класс белков граммотрицательных бактерий, которые участвуют в сборке пилей, опосредуя такую сборку, но не встраиваются в структуру. FimC представляет собой периплазматический белок-шаперон для FimH. FimC имеет аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или приблизительно 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3. В определенных вариантах осуществления FimC имеет аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или приблизительно 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 29, описанной в US 6737063, который включен в данный документ во всей своей полноте. Нековалентный комплекс из FimC и FimH имеет название FimCH.

Соответственно, в дополнительном аспекте настоящего изобретения представлен комплекс, содержащий полипептид, содержащий лектиновый домен FimH согласно настоящему изобретению и дополнительно содержащий пилиновый домен FimH или полноразмерный FimH, описанный в данном документе, и FimC.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения полипептид, содержащий лектиновый домен FimH согласно настоящему изобретению, дополнительно содержит пилиновый домен FimH и образует комплекс с FimC с формированием комплекса FimCH.

Авторы настоящего изобретения создали несколько вариантов лектинового домена FimH с различными изменениями аминокислот и тестировали их эффективность в различных анализах (см. примеры). Неожиданным образом оказалось, что не все протестированные белки FimH с мутациями лектинового домена были способны включаться в комплекс FimCH с требуемыми свойствами, т. е. наличием достаточной чистоты (концентрация белка и степень чистоты), целостностью и функциональностью.

Описанный в данном документе лектиновый домен FimH, который содержит аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из валина (V), изолейцина (I), лейцина (L), глицина (G), метионина (M) и аланина (A), в положении, которое соответствует положению 144 в SEQ ID NO: 1, был способен формировать комплекс FimCH, характеризующийся требуемыми свойствами.

В одном варианте осуществления полипептид, содержащий лектиновый домен FimH согласно настоящему изобретению, представляет собой полноразмерный FimH,

характеризующийся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2, и образует комплекс с FimC с формированием комплекса FimCH. Полноразмерный FimH в его конечной форме, как правило, не включает сигнальный пептид, который, например, показан в качестве аминокислот 1-21 в SEQ ID NO: 4 и 5, т. е. понятно, что полноразмерный FimH из SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 включает аминокислоты 22-300 этих последовательностей, при этом их аминокислоты 1-21, как правило, отсутствуют. Для рекомбинантной продукции полноразмерного FimH в рекомбинантной клетке-хозяине полезно кодировать FimH, который включает сигнальный пептид, для обеспечения транспорта через внутреннюю (цитоплазматическую) мембрану по общему секреторному пути, приводящему к периплазматической локализации полипептида (иногда обозначается как 'периплазматическая экспрессия'), но в конечном полипептиде FimH в качестве выделенного и, например, применяемого в фармацевтических композициях сигнальный пептид, как правило, больше не присутствует в результате процессинга в рекомбинантной клетке, которая экспрессирует полипептид.

В более предпочтительном варианте осуществления комплекс FimCH содержит или состоит из белка FimC, характеризующегося по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или по меньшей мере приблизительно 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3, и белка FimH, содержащего лектиновый домен, содержащий аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из валина (V), изолейцина (I), лейцина (L), глицина (G), метионина (M) и аланина (A), в положении, которое соответствует положению 144 в SEQ ID NO: 1. В еще более предпочтительном варианте осуществления комплекс FimCH содержит или состоит из белка FimC, характеризующегося по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или по меньшей мере приблизительно 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3, и белка FimH, содержащего замену F144V в лектиновом домене, или полноразмерного белка FimH, содержащего замену F165V (например, в SEQ ID NO: 4 или 5, которые все еще включают сигнальный пептид). В полноразмерном FimH, который все еще будет включать сигнальный пептид, аминокислотное положение 165 соответствует аминокислотному положению 144 в лектиновом домене FimH. Специалисту в данной области техники будет известно, как идентифицировать соответствующие аминокислотные положения в аминокислотных последовательностях полноразмерного FimH и в аминокислотных последовательностях лектинового домена

FimH с использованием алгоритмов выравнивания аминокислотных последовательностей, определенных в данном документе выше.

В одном варианте осуществления комплексы, содержащие шаперон *E. coli* FimC и вариант лектинового домена FimH согласно настоящему изобретению, могут формироваться за счет совместной экспрессии полипептида варианта лектинового домена FimH согласно настоящему изобретению вместе с FimC в рекомбинантной клетке.

В одном варианте осуществления комплекс FimCH содержит FimC, происходящий из одного штамма бактерий, в то же время FimH происходит из другого штамма бактерий. В другом варианте осуществления комплекс FimCH содержит FimC и FimH, оба из которых происходят из одного и того же штамма бактерий. В определенных вариантах осуществления FimH или FimC или оба FimH и FimC могут представлять собой искусственные последовательности, не полученные из реальных изолятов бактерий, существующих в природе, например они также могут быть основаны на консенсусных последовательностях или комбинациях природных изолятов.

В одном варианте осуществления комплекс FimCH содержит по меньшей мере один полипептид, который содержит His-метку. В одном варианте осуществления полноразмерный FimH согласно настоящему изобретению содержит His-метку, или FimC, описанный в данном документе, содержит His-метку. Предпочтительно в комплексе FimCH FimC содержит His-метку. Используемая в данном документе His-метка представляет собой фрагмент из остатков гистидина (His), например, шесть остатков His, которые могут быть добавлены внутрь или предпочтительно на N-или C-конце белка. Применение такой метки хорошо известно для облегчения очистки.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид FimH, определенного в данном документе выше. Полинуклеотиду может предшествовать промотор, функционально связанный с ним. В определенных вариантах осуществления промотор является эндогенным по отношению к кодирующей последовательности FimH. В определенных вариантах осуществления промотор представляет собой эндогенный промотор, управляющий экспрессией FimH в бактерии семейства *Enterobacteriaceae*. В других вариантах осуществления промотор является гетерологичным по отношению к кодирующей последовательности FimH, например, применяют сильный промотор, который, как известно специалисту в данной области техники, применяется в рекомбинантных системах экспрессии. Например,

вектор pET-DUET, содержащий индуцируемый промотор Lac, можно применять для экспрессии FimH и/или FimC. В случае индуцируемого промотора для индуцирования экспрессии можно использовать IPTG. Предпочтительно полинуклеотид выделяют из его природного окружения. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения представлен выделенный полинуклеотид согласно настоящему изобретению. Полипептид может быть рекомбинантным, синтетическим или искусственным полинуклеотидом. Полинуклеотид может находиться в форме любой нуклеиновой кислоты, например, ДНК или РНК, предпочтительно ДНК. Полинуклеотид может содержать один или несколько нуклеотидов, которые отсутствуют о встречающемся в природе полинуклеотиде, кодирующем FimH. Предпочтительно полинуклеотид содержит один или несколько нуклеотидов, которые отсутствуют во встречающемся в природе полинуклеотиде, кодирующем FimH, на своем 5'-конце и/или 3'-конце. Последовательностям кодируемых зрелых FimC и/или FimH предпочтительно может предшествовать сигнальный пептид в полипептидах, кодируемых соответствующими полинуклеотидами, и сигнальные пептиды могут быть эндогенными сигнальными пептидами для полипептидов FimC и/или FimH (т. е. сигнальными пептидами, встречающимися в природе для этих белков) соответственно, или они могут быть гетерологичными сигнальными пептидами, т. е. сигнальными пептидами из других белков или синтетическими сигнальными пептидами. Сигнальные пептиды полезны для периплазматической экспрессии, но как правило отщепляются и отсутствуют в окончательно продуцируемых и очищенных FimC и/или FimH соответственно.

Если требуется и/или при необходимости полипептид, содержащий лектиновый домен FimH согласно настоящему изобретению, или полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий лектиновый домен FimH согласно настоящему изобретению, могут быть включены в фармацевтически активную смесь путем добавления фармацевтически приемлемого носителя.

Соответственно, в дополнительном аспекте настоящего изобретения также представлена композиция, предпочтительно фармацевтическая композиция, содержащая лектиновый домен FimH согласно настоящему изобретению, или полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий лектиновый домен FimH согласно настоящему изобретению.

(Фармацевтические) композиции по настоящему изобретению могут содержать любое фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, в том числе носитель,

наполнитель, консервант, солюбилизатор и/или разбавитель. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, в частности, для инъекционных растворов. Подходящие вспомогательные вещества включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т. п. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в "Remington's pharmaceutical sciences," XIII ed. Editor-in-Chief Eric W. Martin. Mack Publishing Co., Easton, Pa., 2013.

В определенных вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению дополнительно содержат один или несколько буферов, например, забуференный Tris солевой раствор, фосфатный буфер и сахарозо-фосфатно-глутаматный буфер.

В определенных вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению дополнительно содержат одну или несколько солей, например Tris-гидрохлорид, хлорид натрия, хлорид кальция, хлорид калия, фосфат натрия, глутамат мононатрия и соли алюминия (например, гидроксид алюминия, фосфат алюминия, алюмосульфат калия или смесь таких солей алюминия).

Композиции по настоящему изобретению можно применять для обеспечения развития иммунного ответа у хозяина, которому вводят композицию, т. е. они являются иммуногенными. Таким образом, композиции по настоящему изобретению можно применять в качестве вакцин против инфекции, вызванной бактерией из семейства Enterobacteriaceae, предпочтительно против инфекции, вызванной *Klebsiella*, более предпочтительно *E.coli*, и, таким образом, могут содержать любые дополнительные компоненты, подходящие для применения в вакцине. Например, дополнительным компонентом вакцинной композиции является адъювант, описанный в данном документе.

В определенных вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению дополнительно содержат консервант, такой как фенол, хлорид бензетония, 2-феноксизтанол или тимеросал. В конкретном варианте осуществления (фармацевтические) композиции по настоящему изобретению содержат от 0,001% до 0,01% консерванта. В других вариантах осуществления (фармацевтические) композиции по настоящему изобретению не содержат консерванта.

В определенных вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению составлены таким образом, чтобы подходить для предполагаемого пути

введения субъекту. Например, композиции по настоящему изобретению могут быть составлены таким образом, чтобы подходить для подкожного, парентерального, перорального, внутрикожного, чрескожного, колоректального, внутрибрюшинного, интравагинального или ректального введения. В конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция может быть составлена для внутривенного, перорального, трансбуккального, внутрибрюшинного, интраназального, интратрахеального, подкожного, внутримышечного, местного, внутрикожного, чрескожного или легочного введения, предпочтительно внутримышечного введения.

Композиции по настоящему изобретению могут быть заключены в контейнер, упаковку или дозатор вместе с инструкциями по введению.

В определенных вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению можно хранить перед применением, например, композиции можно хранить в замороженном виде (например, при приблизительно -20°C или при приблизительно -70°C); хранить в условиях охлаждения (например, при приблизительно $2-8^{\circ}\text{C}$, например, приблизительно 4°C) или хранить при комнатной температуре. В качестве альтернативы отдельные композиции, содержащие один или несколько компонентов (i), (ii) и (iii), можно хранить и смешивать с комбинированной вакцинной композицией, содержащей все три компонента (i), (ii) и (iii), перед применением. В еще одном альтернативном варианте отдельные композиции предусмотрены в виде графика комбинированного введения.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить вместе с композицией, которая содержит один или несколько полисахаридов, ковалентно связанных с белком-носителем. Предпочтительно такая композиция содержит один или несколько биоконъюгатов полисахарида О-антигена *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, например, как описано в WO 2019/175145, которая включена в данный документ во всей своей полноте.

В варианте осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, описанная в данном документе, дополнительно содержит адъювант. Используемый в данном документе термин "адъювант" относится к соединению, которое при введении в сочетании с композицией по настоящему изобретению или как ее часть повышает, усиливает и/или стимулирует иммунный ответ на FimH, но если адъювантное соединение вводится отдельно, то выработки иммунного ответа на конъюгат и/или FimH не происходит. Адъюванты могут усиливать иммунный ответ за

счет нескольких механизмов, включая, например, рекрутирование лимфоцитов, стимуляцию В- и/или Т-клеток и стимуляцию антигенпрезентирующих клеток.

Предпочтительно фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат адъювант или вводятся в комбинации с ним. Адъювант для введения в комбинации с композицией по настоящему изобретению можно вводить до, одновременно или после введения иммуногенных композиций. В предпочтительных вариантах осуществления FimH по настоящему изобретению и адъювант вводят в форме единой композиции.

Конкретные примеры адъювантов включают без ограничения соли алюминия (квасцы) (например, гидроксид алюминия, фосфат алюминия, сульфат алюминия и оксид алюминия, в том числе наночастицы, содержащие квасцы или составы на основе наноквасцов), фосфат кальция (например, Masson JD et al, 2017, Expert Rev Vaccines 16: 289-299), монофосфориллипид А (MPL) или 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А (3D-MPL) (см., например, патент Соединенного Королевства GB2220211, EP0971739, EP1194166, US6491919), AS01, AS02, AS03 и AS04 (все GlaxoSmithKline; см., например, EP1126876, US7357936 для AS04, EP0671948, EP0761231, US5750110 для AS02), имидазопиридиновые соединения (см. WO2007/109812), имидазохиноксалиновые соединения (см. WO2007/109813), дельта-инулин (например, Petrovsky N and PD Cooper, 2015, Vaccine 33: 5920-5926), STING-активирующие синтетические циклические динуклеотиды (например, US 20150056224), комбинации лецитина и гомополимеров карбомера (например, US 6676958) и сапонины, такие как Quil A и QS21 (см., например, Zhu D and W Tuo, 2016, Nat Prod Chem Res 3: e113 (doi:10.4172/2329-6836.1000e113), необязательно в комбинации с QS7 (см. Kensil et al., в Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); патент США № 5057540). В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой адъювант Фрейнда (полный или неполный). В определенных вариантах осуществления адъювант содержит Quil-A, такой как, например, коммерчески доступный от Brenntag (сейчас Croda) или Invivogen. QuilA содержит экстрагируемую водой фракцию сапонинов из дерева *Quillaja saponaria* Molina. Эти сапонины принадлежат к группе тритерпеноидных сапонинов, которые имеют общую тритерпеноидную структуру остова. Известно, что сапонины индуцируют сильный адъювантный ответ как на Т-зависимые, так и на Т-независимые антигены, а также сильные ответы с цитотоксическими CD8+-лимфоцитами и потенцируют ответ на антигены для слизистой оболочки. Они также

могут объединяться с холестерином и фосфолипидами с формированием иммуностимулирующих комплексов (ISCOM), в которых адъювант QuilA может активировать как антитело-опосредованные, так и клеточно-опосредованные иммунные ответы в отношении широкого спектра антигенов различного происхождения. В определенных вариантах осуществления адъювант представляет собой AS01, предпочтительно AS01B. S01 представляет собой адъювантную систему, содержащую MPL (3-О-дезацил-4'-монофосфориллипид А), QS21 (*Quillaja saponaria* Molina, фракция 21) и липосомы. В определенных вариантах осуществления AS01 коммерчески доступен (GSK) или может быть изготовлен, как описано в WO 96/33739, включенном в данный документ посредством ссылки. Определенные адъюванты содержат эмульсии, которые представляют собой смеси двух несмешивающихся жидкостей, например, масла и воды, одна из которых взвешена в виде мелких капель внутри другой, и стабилизированы за счет поверхностно-активных веществ. Эмульсии масло-в-воде содержат воду, формирующую непрерывную фазу, окружающую небольшие капли масла, в то время как эмульсии вода-в-масле содержат масло, формирующее непрерывную фазу. Определенные эмульсии содержат сквален (метаболизируемое масло). Определенные адъюванты содержат блок-сополимеры, которые представляют собой сополимеры, формируемые при объединении в кластер двух мономеров и формировании блоков из повторяющихся звеньев. Примером эмульсии вода-в-масле, содержащей блок-сополимер, сквален и стабилизатор в виде микрочастиц, является TiterMax®, которую можно коммерчески получить от Sigma-Aldrich. Необязательно эмульсии можно комбинировать с дополнительными иммуностимулирующими компонентами, например, агонистом TLR4, или они могут содержать их. Определенные адъюванты представляют собой эмульсии масло-в-воде (такие как сквален или арахисовое масло), которые также применяются в MF59 (см., например, EP0399843, US 6299884, US 6451325) и AS03, необязательно в комбинации с иммуностимуляторами, такими как монофосфориллипид А и/или QS21, такой как в AS02 (см. Stoute et al., 1997, N. Engl. J. Med. 336, 86-91). Дополнительными примерами адъювантов являются липосомы, содержащие иммуностимуляторы, такие как MPL и QS21, такие как в AS01E и AS01B (например, US 2011/0206758). Другими примерами адъювантов являются CpG (*Bioworld Today*, 15 ноября 1998 г.) и имидазохинолины (такие как имиквимод и R848). См., например, Reed G, et al., 2013, *Nature Med*, 19: 1597-1608.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления адъювант содержит сапонины, предпочтительно экстрагируемую водой фракцию сапонинов, полученную из *Quillaja saponaria*. В определенных вариантах осуществления адъювант содержит QS-21.

5 В определенных предпочтительных вариантах осуществления адъювант содержит агонист толл-подобного рецептора 4 (TLR4). Агонисты TLR4 хорошо известны в данной области техники, см., например, Ireton GC и SG Reed, 2013, Expert Rev Vaccines 12: 793-807. В определенных предпочтительных вариантах осуществления адъювант представляет собой агонист TLR4, содержащий липид А или его аналог или
10 производное.

Адъювант, предпочтительно включающий агонист TLR4, может быть составлен различными способами, например, в эмульсиях, таких как эмульсии вода-в-масле (w/o) или эмульсии масло-в-воде (o/w) (примерами являются MF59, AS03), стабильных (нано-)эмульсиях (SE), липидных суспензиях, липосомах, (полимерных) наночастицах,
15 виросомах, адсорбированных квасцах, водных составах (AF) и т. п., представляющих различные системы доставки иммуномодулирующих молекул в адъюванте и/или иммуногенах (см., например, Reed et al., 2013, см. выше; Alving CR et al., 2012, Curr Opin Immunol 24: 310-315).

Иммуностимулирующий агонист TLR4 можно необязательно объединять с
20 другими иммуномодулирующими компонентами, такими как сапонины (например, QuilA, QS7, QS21, Matrix M, Iscom, Iscomatrix и т. д.), соли алюминия, активаторы других TLR (например, имидазохинолины, флагеллин, CpG, аналоги dsRNA и т. д.) и т. п. (см., например, Reed et al., 2013, выше).

Используемый в данном документе термин "липид А" относится к гидрофобному
25 липидному фрагменту молекулы LPS, который содержит глюкозамин и связан с кето-дезоксиктулозонатом во внутреннем ядре молекулы LPS кетозидной связью, которая заякоривает молекулу LPS в наружном листке наружной мембраны грамотрицательных бактерий. Обзор синтеза LPS и структур липида А см., например, в Raetz, 1993, J. Bacteriology 175:5745-5753, Raetz CR and C Whitfield, 2002, Annu Rev Biochem 71: 635-
30 700; US 5593969 и US 5191072. Используемый в данном документе липид А включает встречающийся в природе липид А, его смеси, аналоги, производные и предшественники. Термин включает моносахариды, например, предшественник липида А, называемый липидом X; дисахарид липида А; гептаацил липид А; гексаацил липид А; пентаацил липид А; тетраацил-липид А, например, тетра-ацильный предшественник

липида А, называемый липидом IVA; дефосфорилированный липид А; монофосфорильный липид А; дифосфорильный липид А, например, липид А из *Escherichia coli* и *Rhodobacter sphaeroides*. Некоторые иммуноактивирующие структуры липида А содержат 6 ацильных цепей. Четыре первичные ацильные цепи, присоединенные непосредственно к глюкозаминовым сахарам, представляют собой 3-гидроксиацильные цепи, обычно имеющие длину от 10 до 16 атомов углерода. Две дополнительные ацильные цепи часто прикреплены к 3-гидроксигруппам первичных ацильных цепей. В качестве примера, липид А *E. coli* как правило имеет четыре 3-гидроксиацильные цепи C14, прикрепленные к сахарам, и одну C12 и одну C14, прикрепленные к 3-гидроксигруппам первичных ацильных цепей в положениях 2' и 3', соответственно.

Используемый в данном документе термин "аналог или производное липида А" относится к молекуле, которая по структуре и иммунологической активности напоминает липид А, но которая не обязательно естественным образом встречается в природе. Аналоги или производные липида А могут быть модифицированными, например, укороченными или конденсированными, и/или их глюкозаминовые остатки замещены другим аминсахарным остатком, например, галактозаминовыми остатками, с содержанием 2-дезоксид-2-аминоглюконата вместо глюкозамин-1-фосфата на восстанавливающем конце, чтобы нести фрагмент галактуроновой кислоты вместо фосфата в положении 4'. Аналоги или производные липида А могут быть получены из липида А, выделенного из бактерии, например, путем химического получения производных или химического синтеза, например, путем первоначального определения структуры предпочтительного липида А и осуществления синтеза его аналогов или производных. Аналоги или производные липида А также можно использовать в качестве адъювантов, являющихся агонистами TLR4 (см., например, Gregg KA et al, 2017, MBio 8, eDD492-17, doi: 10.1128/mBio.00492-17). Например, аналог или производное липида А можно получить деацилированием молекулы липида А дикого типа, например, путем обработки щелочью. Аналоги или производные липида А могут быть получены, например, из липида А, выделенного из бактерий. Такие молекулы также могут быть синтезированы химическим путем. Другим примером аналогов или производных липида А являются молекулы липида А, выделенные из бактериальных клеток, несущих мутации, или делеции или вставки в ферментах, вовлеченных в биосинтез липида А и/или модификацию липида А. MPL и 3D-MPL представляют собой аналоги или производные липида А, которые были модифицированы для

снижения токсичности липида А. Липид А, MPL и 3D-MPL имеют сахарный остов, к которому прикреплены длинноцепочечные жирные кислоты, где остов содержит два 6-углеродных сахара с гликозидной связью и фосфорильный фрагмент в 4-положении. Как правило, от пяти до восьми длинноцепочечных жирных кислот (обычно 12-14 атомов углерода) прикреплены к сахарному остову. Вследствие происхождения из природных источников, MPL или 3D-MPL могут присутствовать в виде составного вещества или смеси из целого ряда паттернов жирнокислотных замещений, например, гептаацил, гексаацил, пентаацил и т. д. с различной длиной жирных кислот. Это также верно для некоторых других аналогов или производных липида А, описанных в данном документе, однако синтетические варианты липида А также могут быть определенными и однородными. MPL и его изготовление описаны, например, в US 4436727. Например 3D-MPL описан в US 4912094B1 и отличается от MPL селективным удалением 3-гидроксимиристилацилового остатка, который посредством сложноэфирной связи связан с глюкозамином на восстанавливающем конце в положении 3 (сравните, например, структуру MPL в столбце 1 с 3D-MPL в столбце 6 US 4912094B1). В данной области техники зачастую применяют 3D-MPL, который иногда называют MPL (например, первая структура в таблице 1 из Ireton GC and SG Reed, 2013, см. выше, обозначает эту структуру как MPL®, но на самом деле изображает структуру 3D-MPL). Примеры липида А (аналоги, производные) согласно настоящему изобретению включают MPL, 3D-MPL, RC529 (например, EP1385541), PET-липид А, GLA (гликопиранозил-липидный адъювант, синтетический дисахарид-гликолипид; например, US20100310602, US8722064), SLA (например, Carter D et al, 2016, Clin Transl Immunology 5: e108 (doi: 10.1038/cti.2016.63), где описан структурно-функциональный подход к оптимизации лигандов TLR4 для человеческих вакцин), PHAD (фосфорилированный гексаацилдисахарид, структура которого такая же, как у GLA), 3D-PHAD, 3D-(6-ацил)-PHAD (3D(6A)-PHAD) (PHAD, 3D-PHAD и 3D(6A)PHAD представляют собой синтетические варианты липида А, см., например, avantilipids.com/divisions/adjuvants, где также представлены структуры этих молекул), E6020 (номер CAS 287180-63-6), ONO4007, OM-174 и т. п. Типичные химические структуры 3D-MPL, RC529, PET-липид А, GLA/PHAD, E6020, ONO4007 и OM-174 см., например, в таблице 1 в Ireton GC and SG Reed, 2013, см. выше. Структуру SLA см., например, на фиг. 1 в Reed SG et al, 2016, Curr Opin Immunol 41: 85-90. В определенных предпочтительных вариантах осуществления адъювант, являющийся агонистом TLR4, содержит аналог или производное липида А, выбранное из 3D-MPL, GLA или SLA.

Иллюстративные адъюванты, содержащие аналог или производное липида А, включают GLA-LSQ (синтетический MPL [GLA], QS21, липиды, составленные в виде липосом), SLA-LSQ (синтетический MPL [SLA], QS21, липиды, составленные в виде липосом), GLA-SE (синтетический MPL [GLA], скваленовая эмульсия масло-в-воде),
 5 SLA-SE (синтетический MPL [SLA], скваленовая эмульсия масло-в-воде), SLA-Nanoalum (синтетический MPL [SLA], соль алюминия), GLA-Nanoalum (синтетический MPL [GLA], соль алюминия), SLA-AF (синтетический MPL [SLA], водная суспензия), GLA-AF (синтетический MPL [GLA], водная суспензия), SLA-квасцы (синтетический MPL [SLA], соль алюминия), GLA-квасцы (синтетический MPL [GLA], соль
 10 алюминия) и несколько адъювантов серии GSK ASxx, в том числе AS01 (MPL, QS21, липосомы), AS02 (MPL, QS21, эмульсия масло-вода), AS25 (MPL, эмульсия масло/вода), AS04 (MPL, соль алюминия) и AS15 (MPL, QS21, CpG, липосомы). См., например, WO 2013/119856, WO 2006/116423, US 4987237, U.S. 4436727, US 4877611, US 4866034, US 4912094, US 4987237, US5191072, US5593969, US 6759241,
 15 US 9017698, US 9149521, US 9149522, US 9415097, US 9415101, US 9504743, Reed G, et al., 2013, выше, Johnson et al., 1999, J Med Chem, 42:4640-4649, а также Ulrich and Myers, 1995, Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach; Powell and Newman, Eds.; Plenum: New York, 495-524.

Молекулы, отличные от гликолипидов, также можно применять в качестве
 20 адъювантов, являющихся агонистами TLR4, например, синтетические молекулы, такие как Neoseptin-3, или природные молекулы, такие как LeIF, см., например, Reed SG et al, 2016, выше.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему лектиновый домен FimH по настоящему изобретению, полинуклеотиду по настоящему
 25 изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного препарата.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к применению полипептида, содержащего лектиновый домен FimH, описанный в данном документе, полинуклеотида, описанного в данном документе, или фармацевтической композиции,
 30 описанной в данном документе, в качестве лекарственного препарата для индукции иммунного ответа против грамотрицательной бактерии из семейства Enterobacteriaceae.

Используемые в данном документе термины "иммуноген", или "иммуногенный", или "антиген" используются взаимозаменяемо для описания молекулы, способной индуцировать иммунологический ответ против нее при введении реципиенту либо

отдельно, либо в сочетании с адьювантом, либо присутствующей на среде-носителе для представления.

Используемые в данном документе "иммунологический ответ" или "иммунный ответ" на антиген или композицию относятся к развитию у субъекта гуморального и/или клеточного иммунного ответа на антиген или антиген, присутствующий в композиции.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему лектиновый домен FimH, описанный в данном документе, полинуклеотиду, описанному в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе, для применения в индукции иммунного ответа против бактериальной инфекции, вызванной грамотрицательной бактерией из семейства Enterobacteriaceae. В определенных вариантах осуществления бактериальная инфекция вызвана *Staphylococcus saprophyticus* или *Staphylococcus aureus*, *Proteus* spp., *Serratia* spp. или *Pseudomonas* spp.. В предпочтительных вариантах осуществления бактериальная инфекция вызвана *Klebsiella* spp. или *E.coli*. В наиболее предпочтительном варианте бактериальная инфекция вызвана *E.coli*. Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению полипептида, содержащего лектиновый домен FimH, описанный в данном документе, полинуклеотида, описанного в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе, в качестве лекарственного препарата для индукции иммунного ответа против *E.coli* или *Klebsiella*, предпочтительно *E.coli*.

В предпочтительных вариантах осуществления бактериальная инфекция, вызванная грамотрицательной бактерией из семейства Enterobacteriaceae, представляет собой инфекцию, вызванную *E.coli*, например, ExPEC, более конкретно инфекцию мочевыводящих путей (UTI). В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему лектиновый домен FimH, описанный в данном документе, полинуклеотиду, описанному в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе, для применения в лечении, предупреждении или подавлении симптомов и/или последствий, ассоциированных с UTI, у субъекта. В определенных вариантах осуществления указанная UTI представляет собой rUTI. *E.coli* является одним из основных возбудителей UTI и rUTI, представляющих собой важную проблему здравоохранения у молодых женщин и пожилых людей. Таким образом, в предпочтительных вариантах осуществления бактериальная инфекция представляет собой UTI или rUTI, вызванные *E.coli*.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения, предупреждения или подавления симптомов и/или последствий, ассоциированных с состоянием, связанным с энтеробактериями, у субъекта, нуждающегося в этом. Способ включает введение субъекту эффективного количества полипептида, содержащего лектиновый домен FimH, описанный в данном документе, полинуклеотида, описанного в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. Предпочтительно введение обеспечивает индукцию иммунного ответа, который является эффективным в лечении или предупреждении состояния, связанного с энтеробактериями. Предпочтительно состояние, связанное с энтеробактериями, представляет собой инфекцию урогенитального тракта, более конкретно UTI или rUTI.

Настоящее изобретение также относится к применению полипептида, содержащего лектиновый домен FimH, описанный в данном документе, полинуклеотида, описанного в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе, для изготовления лекарственного препарата для лечения, предупреждения или подавления бактериальной инфекции, вызванной грамотрицательной бактерией из семейства *Enterobacteriaceae*, предпочтительно бактериальной инфекции, вызванной *E.coli*. Более предпочтительно бактериальная инфекция представляет собой UTI или rUTI, вызванные *E.coli*.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к вектору, содержащему полинуклеотид, кодирующий полипептид по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления вектор представляет собой плазмиду или вирусный вектор, предпочтительно плазмиду. Предпочтительно вектор находится в форме ДНК, т. е. плазмидной ДНК. В определенных вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид по настоящему изобретению, функционально связанный с промотором, что означает, что полинуклеотид находится под контролем промотора. Промотор может быть расположен выше полинуклеотида, который кодирует полипептид по настоящему изобретению, например, в кассете экспрессии в плазмиде.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу получения полипептида по настоящему изобретению, причем способ включает культивирование рекомбинантной клетки, содержащей полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий лектиновый домен FimH, описанный в данном документе, и/или вектор, описанный в данном документе, где культивирование происходит в условиях, способствующих продукции полипептида.

В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает выделение полипептида, за которым необязательно следует составление в фармацевтическую композицию.

Предпочтительно в способе получения полипептида, содержащего лектиновый домен FimH согласно настоящему изобретению, применяют клетку *E.coli*, например, модифицированную клетку *E.coli* BL21.

Извлечение полипептида предпочтительно включает стадию очистки и/или выделения, которую можно проводить с применением традиционных способов очистки белка, хорошо известных в данной области техники. Такие способы могут включать осаждение сульфатом аммония или этанолом, кислотную экстракцию, анионообменную или катионообменную хроматографию, хроматографию на фосфоцеллюлозе, хроматографию гидрофобного взаимодействия, аффинную хроматографию, хроматографию на гидроксипатите и хроматографию на лектинах.

В типичных примерах для такой очистки и/или выделения можно использовать антитело к белку, или His-метке, или отщепляемой лидерной или хвостовой последовательностям, которые экспрессируются как часть структуры белка. В определенных вариантах осуществления полипептид, описанный в данном документе, содержит His-метку, и его можно очищать с помощью таких методов, как аффинная очистка ИМАС. В определенных вариантах осуществления полипептиды, описанные в данном документе, не содержат His-метку, в таких случаях очистку проводят с помощью катионообменной хроматографии (сИEX) и хроматографии гидрофобного взаимодействия (НИС).

Определения

Различные публикации, статьи и патенты процитированы или описаны в разделе "Предпосылки изобретения" и на протяжении всего описания; при этом каждый из этих ссылочных документов включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Целью обсуждения документов, действий, материалов, устройств, изделий и т. п., которое было включено в настоящее описание, является обеспечение контекста настоящего изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что любые или все из этих сущностей составляют часть предшествующего уровня техники с точки зрения любых раскрытых или заявленных изобретений.

Если не определено иное, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое общеизвестно специалисту средней

квалификации в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В иных случаях определенные термины, цитируемые в данном документе, имеют значения, изложенные в настоящем описании. Все патенты, опубликованные заявки на патент и публикации, цитируемые в данном документе, включены посредством ссылки, как если бы они были полностью изложены в данном документе. Следует отметить, что используемые в данном документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылку на множественное число, если из контекста явно не следует иное.

На всем протяжении настоящего описания и нижеследующей формулы изобретения, если контекст не требует иного, слово "содержать" и его варианты, такие как "содержит" и "содержащий", будут пониматься как подразумевающие включение указанного целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий, но без исключения любого другого целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий. При использовании в данном документе термин "содержащий" может быть заменен термином "содержащий в себе" или "включающий", или иногда при использовании в данном документе заменен термином "имеющий".

При использовании в данном документе "состоящий из" исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанные в элементе пункта формулы изобретения. При использовании в данном документе "состоящий по сути из" не исключает материалы или стадии, которые не влияют существенным образом на основные и новые характеристики пункта формулы изобретения. Любой из вышеупомянутых терминов "содержащий", "содержащий в себе", "включающий" и "имеющий", всякий раз, когда они используются в данном документе в контексте аспекта или варианта осуществления настоящего изобретения, может быть заменен термином "состоящий из" или "состоящий по сути из" для изменения объема настоящего изобретения.

Используемый в данном документе соединяющий термин "и/или" между несколькими перечисленными элементами понимают как охватывающий как индивидуальные, так и объединенные варианты. Например, если два элемента соединены с помощью "и/или", первый вариант относится к возможности применения первого элемента без второго. Второй вариант относится к возможности применения второго элемента без первого. Третий вариант относится к возможности применения первого и второго элементов совместно. Любой из этих вариантов понимают как подпадающий под данное значение и, следовательно, удовлетворяющий требованию

используемого в данном документе термина "и/или". Понятно, что возможность одновременного применения более чем одного из вариантов понимают как подпадающую под данное значение и, следовательно, удовлетворяющий требованию термина "и/или".

5 Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к нетоксичному материалу, который не препятствует проявлению эффективности композиции согласно настоящему изобретению или биологической активности композиции согласно настоящему изобретению. "Фармацевтически приемлемый носитель" может включать любое вспомогательное вещество, разбавитель, 10 наполнитель, соль, буфер, стабилизатор, солюбилизатор, масло, липид, везикулу, содержащую липид, микросферу, инкапсуляцию в липосомы или другие материалы, хорошо известные из уровня техники для применения в фармацевтических составах. Будет понятно, что характеристики фармацевтически приемлемого носителя будут зависеть от пути введения для конкретного применения. Согласно конкретным 15 вариантам осуществления в свете настоящего изобретения любой фармацевтически приемлемый носитель, подходящий для применения в вакцине можно применять в настоящем изобретении. Подходящие вспомогательные вещества включают без ограничения стерильную воду, физиологический раствор, декстрозу, глицерин, этанол и т. п. и их комбинации, а также стабилизаторы, например, человеческий 20 сывороточный альбумин (HSA) или другие подходящие белки и редуцирующие сахара.

Используемый в данном документе термин "эффективное количество" относится к количеству активного ингредиента или компонента, которое вызывает требуемый биологический или медицинский ответ у субъекта. Эффективное количество можно определить эмпирически и обычным образом в соответствии с заявленной целью. 25 Например, для содействия определению оптимальных диапазонов дозировок могут необязательно использоваться анализы *in vitro*.

В данном контексте "субъект" или "пациент" означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека, которого будут вакцинировать или которое провакцинировано с помощью способа или композиции 30 согласно варианту осуществления настоящего изобретения. Используемый в данном документе термин "млекопитающее" охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают без ограничения коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, людей и т. п., наиболее предпочтительно человека. В определенных вариантах осуществления субъектом

является взрослый человек. Используемый в данном документе термин "взрослый человек" относится к человеку в возрасте 18 лет или старше. В определенных вариантах осуществления возраст субъекта составляет менее 18 лет, например, 0-18 лет, например, 9-18 лет или 12-18 лет. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек в возрасте от приблизительно 18 до приблизительно 50 лет. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек в возрасте от приблизительно 50 до приблизительно 100 лет, например, 50-85 лет, 60-80 лет, 50 лет или старше, 55 лет или старше, 60 лет или старше, 65 лет или старше, 70 лет или старше, 75 лет или старше, 80 лет или старше, 85 лет или старше. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения возраст субъекта не превышает 85 лет, не превышает 80 лет, не превышает 75 лет. В определенных вариантах осуществления субъект-человек является мужчиной. В определенных вариантах осуществления субъект-человек является женщиной.

Используемая в данном документе "UTI" означает инфекцию почки, мочевого пузыря, мочеочника или уретры. Симптомы UTI могут включать одно или несколько из чувства жжения при мочеиспускании, частых или интенсивных позывов к мочеиспусканию, неполного опорожнения мочевого пузыря, ненормального вида и/или запаха мочи, повышенного содержания лейкоцитов в моче, чувства усталости или дрожи, чувства дезориентации, лихорадки или озноба, недомогания, боли или давления в спине, нижней части живота, тазе или мочевом пузыре. Однако у некоторых пациентов симптомы могут отсутствовать или быть неспецифическими. Последствия UTI могут включать системные осложнения, такие как инвазивное заболевание и сепсис. В определенных вариантах осуществления UTI задокументирована клинически и/или микробиологически, например, подтверждена с помощью бактериального посева мочи и/или с помощью молекулярных или других методов. В определенных вариантах осуществления субъектом является субъект-человек, у которого ранее была или в настоящее время имеется UTI. В определенных вариантах осуществления у субъекта была UTI в пределах последних двух лет, последнего года или последних 6 месяцев. В определенных вариантах осуществления у субъекта была или в настоящее время имеется рецидивирующая UTI (rUTI). Используемая в данном документе "rUTI" означает по меньшей мере две инфекции за шесть месяцев или по меньшей мере три UTI за один год. В определенных вариантах осуществления субъект, которому вводят полипептид, содержащий лектиновый домен FimH по настоящему изобретению, комплекс FimCH по настоящему изобретению или композицию по настоящему

изобретению, перенес по меньшей мере две UTI в пределах последних двух лет, в пределах последнего года или в пределах последних шести месяцев. В определенных вариантах осуществления субъект перенес осложненную UTI. Используемая в данном документе 'осложненная UTI' означает UTI, ассоциированную с таким состоянием, как

5 структурные или функциональные аномалии мочеполового тракта или наличие первопричинного заболевания. В определенных вариантах осуществления UTI приводит к повышенному числу лейкоцитов в моче или другим аномалиям мочи. В определенных вариантах осуществления у субъекта с UTI имеется некоторое количество бактерий в моче, т. е. моча не является стерильной, например, количество

10 бактериальных клеток составляет по меньшей мере приблизительно 10 клеток/мл, по меньшей мере приблизительно 100 клеток/мл, по меньшей мере приблизительно 10^3 клеток/мл, например по меньшей мере приблизительно 10^4 клеток/мл, например, по меньшей мере приблизительно 10^5 клеток/мл.

Используемые в данном документе "иммунологический ответ" или "иммунный

15 ответ" на антиген или композицию относятся к развитию у субъекта гуморального и/или клеточного иммунного ответа на антиген или антиген, присутствующий в композиции.

Если не указано иное, то термин "по меньшей мере", предшествующий серии элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в серии.

20 Слово "приблизительно" или "примерно" при использовании в связи с числовым значением (например, приблизительно 10) предпочтительно означает, что значение может представлять собой заданное значение (10) плюс или минус 10%, предпочтительно плюс или минус 5% от значения.

Термины "гомология", "идентичность последовательностей" и т. п. используются

25 в данном документе взаимозаменяемо. Идентичность последовательностей в данном документе определяется как взаимосвязь между двумя или более аминокислотными (полипептидными или белковыми) последовательностями или двумя или более последовательностями нуклеиновой кислоты (полинуклеотидными), которую определяют путем сравнения последовательностей. В данной области техники

30 "идентичность" также означает степень родства последовательностей между аминокислотными последовательностями или последовательностями нуклеиновой кислоты, в зависимости от случая, которую определяют по соответствию между отрезками таких последовательностей. "Сходство" между двумя аминокислотными последовательностями определяют путем сравнения аминокислотной

последовательности и ее консервативных аминокислотных заместителей одного полипептида с последовательностью второго полипептида. "Идентичность" и "сходство" можно легко рассчитать с помощью известных методов.

"Идентичность последовательностей" и "сходство последовательностей" можно
 5 определить путем выравнивания двух пептидных или двух нуклеотидных последовательностей с использованием алгоритмов глобального или локального выравнивания в зависимости от длины двух последовательностей. Последовательности аналогичной длины предпочтительно выравнивают с использованием алгоритма глобального выравнивания (например, Нидлмана-Вунша), который выравнивает
 10 последовательности оптимальным образом по всей длине, в то время как последовательности, существенно отличающиеся по длине, предпочтительно выравнивают с использованием алгоритма локального выравнивания (например, Смита-Уотермана). Последовательности могут обозначаться как "по сути идентичные" или "фактически схожие" в том случае, когда они (при оптимальном выравнивании,
 15 например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием параметров по умолчанию) имеют по меньшей мере определенный минимальный процент идентичности последовательностей (как определено ниже). GAP использует алгоритм глобального выравнивания Нидлмана и Вунша для выравнивания двух последовательностей по всей их длине (полной длине), обеспечивая максимальное
 20 число совпадений и минимальное число гэпов. Глобальное выравнивание удобно использовать для определения идентичности последовательностей, если две последовательности имеют аналогичную длину. Обычно используют параметры GAP по умолчанию со штрафом за создание гэпа = 50 (нуклеотиды)/8 (белки) и штрафом за удлинение гэпа = 3 (нуклеотиды)/2 (белки). В случае нуклеотидов используемой по
 25 умолчанию матрицей оценок является nwsgapdna, а в случае белков матрицей оценок по умолчанию является Blosum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 915-919). Выравнивания последовательностей и баллы процентной идентичности последовательностей можно определить с использованием компьютерных программ, таких как пакет GCG Wisconsin, версия 10.3, доступный от Accelrys Inc., 9685 Scranton
 30 Road, Сан-Диего, Калифорния 92121-3752, США, или с использованием программного обеспечения с открытым исходным кодом, так как программа "needle" (использующая алгоритм глобального выравнивания Нидлмана-Вунша) или "water" (использующая алгоритм локального выравнивания Смита-Уотермана) в EmbossWIN, версии 2.10.0, с использованием те же параметров, что и для GAP выше, или с использованием

настроек по умолчанию (как для 'needle', так и для 'water', а также для выравнивания как белков, так и ДНК, при этом штраф за открытие гэпа по умолчанию составляет 10,0, а штраф за удлинение гэпа по умолчанию составляет 0,5; матрицы оценки по умолчанию представляют собой Blosum62 для белков и DNAFull для ДНК). Если общая
5 длина последовательностей значительно отличается, предпочтительными являются локальные выравнивания, например, с использованием алгоритма Смита-Уотермана.

В качестве альтернативы процентное сходство или идентичность можно определить путем поиска соответствия в общедоступных базах данных с использованием таких алгоритмов, как FASTA, BLAST и т. д. Таким образом,
10 последовательности нуклеиновой кислоты и белковые последовательности по настоящему изобретению можно дополнительно использовать в качестве "запрашиваемой последовательности" для выполнения поиска соответствия в общедоступных базах данных, например, для идентификации других представителей семейства или родственных последовательностей. Такие поиски можно выполнять с
15 использованием программ BLASTn и BLASTx (версия 2.0) из Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403—10. Нуклеотидные поиски BLAST можно проводить с помощью программы NBLAST, балл = 100, длина слова = 12 для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Белковые поиски BLAST можно проводить с помощью программы
20 BLASTx, балл = 50, длина слова = 3 для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных белковым молекулам по настоящему изобретению. Для получения выравниваний с гэпами для целей сравнения можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно
25 использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, BLASTx и BLASTn). См. домашнюю страницу Национального центра биотехнологической информации по адресу <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Таблица 1. Последовательности

Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO.
Последовательность FimH _{LD} (FimH _{LD} 23-10)	FACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTVPSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTG	1
Последовательность FimH _t	FACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTVPSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYLLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQ	2
Полноразмерный FimC	GVALGATRVIYPAGQKQVQLAVTNNDENSTYLIQSWVENADGVKDGRFIVTPPLFAMKGKKENTLRILDATNNQLPQDRESLFWMNVKAI PSMDKSKLTLTENTLQLAII SRIKLYRPAKLALPPDQAAEKLRFRRSANSLTLINPTPYLLTVTELNAGARVLENALVPPMGESTVKLPSDAGSNITYRTINDYGALT PKMTGVME	3
Пример последовательности (полноразмерного) FimH 23-10	MKRVITLFAVLLMGWSVNAWSFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTVPSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYLLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQ	4
SEQ ID NO: 2 из US 6500434 (пример последовательности полноразмерного FimH)	MKRVITLFAVLLMGWSVNAWSFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTVPSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYRGSVPIPLTVYCAKSQNLGYLLSGTHADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVTQ	5
SEQ ID NO: 29 из US 6737063 (пример последовательности FimH с усечением на N-конце)	FACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTVPSSAGGLVIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYRGSVPIPLTVYCAKSQNLGYLLSGTHADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQ	6
Пример последовательности FimH _{LD}	FACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTVPSSAGGLVIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG	7

Другие примеры последовательностей полипептидов FimH описаны в US 6737063, например, любая из SEQ ID NO: 23-45 или 55, описанных в нем, и все они включены в данный документ посредством ссылки.

ПРИМЕРЫ

Нижеследующие примеры настоящего изобретения предназначены для дополнительной иллюстрации природы настоящего изобретения. Следует понимать,

что нижеследующие примеры не ограничивают настоящее изобретение, и что объем настоящего изобретения следует определять по прилагаемой формуле изобретения.

Пример 1. Разработка новых вариантов – данные SPR

Чтобы понять влияние конформационных изменений FimH на эффективность вакцины, были разработаны несколько вариантов FimH, содержащих различные мутации, которые потенциально могли бы закрывать белок в статусе с низкой аффинностью, с целью определения наилучшего варианта FimH, который индуцирует функциональные антитела, способные снижать бактериальную адгезию и колонизацию мочевого пузыря.

Материалы и методы

Разработка и экспрессия FimH

FimC и FimH экспрессировали в векторе pET-DUET с использованием гетерологичных сигнальных последовательностей для экспрессии в периплазме и С-концевой His-метки на FimC для аффинной очистки с использованием аффинной хроматографии с иммобилизованным металлом (IMAC). Экспрессию индуцировали с использованием IPTG, а белок экстрагировали и очищали с использованием очистки IMAC (Talon).

SPR

Для получения подробной информации об аффинности связывания и кинетике взаимодействия вариантов лектинового домена FimH с н-гептил- α -D-маннопиранозидным лигандом, проводили измерения с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Вкратце, все варианты FimH титровали на поверхности с маннозидным лигандом 5 (Rabbani S et al., J Biol. Chem., 2018, 293(5):1835-1849) с максимальной концентрацией 3 или 10 мкМ в HBS-N (0,01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% поверхностно-активного вещества P20). Белки вводили в количестве от 0,12 до 10 мкМ или от 0,036 до 3,0 мкМ с использованием инъекции в режиме одноциклового кинетики.

Результаты

Разработали несколько вариантов FimH с целью найти вариант лектинового домена FimH, который мог бы индуцировать функциональные ингибирующие антитела, с обеспечением таким образом предупреждения связывания бактерий с клетками мочевого пузыря, при одновременном обеспечении широкого покрытия. Чтобы

оптимизировать шансы обнаружения подходящего варианта лектинового домена FimH, отбирали варианты с различным предсказанным механизмом действия.

Ранее описанные мутантные формы FimH_Q133K и FimH_R60P содержат мутацию в остатках, взаимодействующих с маннозой, в кармане связывания. Предполагается, что эти мутации непосредственно влияют на связывающее взаимодействие с маннозой. Эти мутантные формы брали в качестве положительных контролей. Двойную мутантную форму R60P_Q133K взяли параллельно для проверки потенциально усиленных эффектов. Кроме того, параллельно использовали лектиновый домен FimH дикого типа (WT) в качестве отрицательного контроля. Несколько дополнительных мутантных форм FimH (включая формы, называемые в данном документе 'Мутантом 1' и 'Мутантом 2') создавали и исследовали в качестве кандидатов в панели с целью получения функциональных ингибирующих антител.

Вначале аффинность вариантов в отношении связывания с маннозой оценивали с использованием SPR. Результаты представлены в таблице 2. Как и ожидалось, варианты лектинового домена, имеющие мутации в кармане связывания маннозы FimH (Q133K и R60P_Q133K), вообще не связывались с маннозидом. Мутантная форма R60P, как и ожидалось, показала низкую аффинность к маннозиду.

F142V все еще проявляла некоторую аффинность к маннозиду, что указывает на то, что эта мутация не полностью устраняет связывание с маннозидом. В вариантах лектинового домена FimH, содержащих замену F144V, связывание с маннозидом было полностью устранено. Было неожиданным увидеть, что имеется отличие между F142V и F144V в связывании с маннозидом, учитывая очень тесную близость положений в аминокислотной последовательности по сравнению с мутацией F144V.

Таблица 2. Измерения аффинности к маннозиду у вариантов FimH-LD

Вариант	Аффинность*
F144V	Связывание отсутствует
F142V	Средняя аффинность
Мутантная форма 1	Средняя аффинность
Мутантная форма 2	Низкая аффинность
R60P	Низкая аффинность
R60P-Q133K	Связывание отсутствует
Q133K	Связывание отсутствует

FimH LD wt

Высокая аффинность

* *KD при низкой аффинности >1000 нМ; KD при средней аффинности 100-1000 нМ; KD при высокой аффинности <100 нМ*

Пример 2. *Способность индуцировать ингибирующие антитела*

- 5 Было показано, что антитела, вырабатываемые против FimH с конформацией с низкой аффинностью, способны блокировать бактериальную клетку и снижать образование колоний в мочевом пузыре. Для оценки функциональности антител, индуцированных различными вариантами FimH, закрытыми в конформации с низкой аффинностью, применяли анализ ингибирования адгезии (AIA).

10

Материалы и методы

Иммунизация

- Крысы Вистар получили 4 внутримышечные (в/м) иммунизации в день 0, 7, 10 и 18 с использованием описанных выше вариантов FimH (60 мкг каждого варианта/доза) в комбинации с адъювантом, отличным от адъюванта Фрейнда (28-дневная модель Speedy rat, Eurogentec). Функциональность антител в сыворотке крови исследовали в день 0 (до иммунизации) и день 28 (после иммунизации) с помощью анализа ингибирования адгезии (AIA), описанного ниже.

20 *Анализ ингибирования адгезии (AIA)*

- Бактерий (*E. coli* J96) метили с помощью изотиоцианата флуоресцеина (FITC). Меченых бактерий инкубировали с клетками уротелия мочевого пузыря (линия клеток 5637) в течение 1 ч при 37°C. Процент прикрепившихся бактерий измеряли с помощью проточной цитометрии. Для оценки ингибирования сывороткой бактерий предварительно инкубировали с образцами сыворотки крови в течение 30 минут при 37°C, а затем смешивали с клетками 5637.

ELISA

- 96-луночные планшеты на протяжении ночи покрывали с помощью 1 мкг/мл FimH. После промывки покрытые лунки инкубировали с блокирующим буфером [забуференный фосфатом солевой раствор (PBS) + 2% бычьего сывороточного альбумина (BSA)] в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывки с помощью PBS + 0,05% Tween 20 в планшеты добавляли сыворотку крови, с

30

последующей инкубацией в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывки в каждую лунку добавляли антитело козы к иммуноглобулину крысы, конъюгированное с пероксидазой хрена, разведенное в PBS с 2% BSA, на 1 час при комнатной температуре. После конечной промывки реакцию проявляли с помощью
 5 тетраметилбензидинового субстрата. Реакцию останавливали с помощью 1 М фосфорной кислоты и измеряли оптическую плотность при 450 нм.

Результаты

Ингибирующие титры антител в сыворотке крови рассчитывали в виде
 10 полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC₅₀) на основе 4-параметрической логистической регрессионной модели. Кроме того, с помощью ELISA оценивали уровни антител в сыворотке крови, индуцированных различными вариантами FimH (общий IgG). Титры EC₅₀, определенные как полумаксимальная эффективная концентрация, рассчитывали на основе 12-шаговых кривых титрования в двух
 15 повторностях, которые анализировали с помощью 4PL нелинейной регрессионной модели.

Оценка величины ингибирующих антител, индуцированных каждым из вариантов FimH, показала, что FimH-23-10_F144V был способен индуцировать самые высокие уровни функциональных антител (фиг. 1), что было неожиданным и совершенно
 20 непредсказуемым до настоящего изобретения. На основании данного результата лектиновый домен FimH, содержащий замену F144V, выбрали в качестве ведущего кандидата.

Пример 3. Функциональность антител

Функциональность антител оценивали с помощью анализа интерферометрии биослоя (Octet, Pall Fortebio) с использованием очищенных препаратов IgG, чтобы оценить, присутствуют ли ингибирующие антитела. Вкратце, 4 различных концентрации очищенного IgG (от 0 до 125 мкг/мл) смешивали с вариантом FimH, описанным в
 25 данном документе. После смешивания белок лектинового домена FimH оценивали в отношении способности связываться с биосенсором, на котором предварительно иммобилизовали меченный биотином мономаннозид (с использованием химического взаимодействия биотин-стрептавидин). Ассоциацию и диссоциацию измеряли в течение 600 секунд, и ответ (в нанометрах (нм)) во время ассоциации рассчитывали и
 30 сравнивали. Данное измерение выполняли с маннозидом по сравнению с холостыми

контролями, чтобы оценить способность вариантов FimH ингибировать связывание FimH с маннозой.

Результаты

Изменения конформации кармана связывания FimH (приводящие к связыванию FimH с маннозидами с низкой, средней или высокой аффинностью) играют важную роль в связывании бактерий с клетками уротелия. Было высказано предположение, что антитела против конформации, характеризующейся низкой аффинностью к маннозе, будут оказывать ингибирующий эффект на адгезию бактерий. Чтобы проанализировать данное предположение и дополнительно понять влияние конформационных изменений FimH на эффективность вакцины, очищенный IgG из сыворотки крови крыс, иммунизированных вариантами лектинового домена FimH, подвергали скринингу в отношении способности уменьшать связывание FimH с простым маннозидом (мономанноза-биотин) с помощью интерферометрии биослоя (BLI).

BLI-скрининг в отношении присутствия ингибирующих антител в сыворотке крови крыс, иммунизированных вариантами лектинового домена FimH, показал, что FimH-23-10_F144V был способен ингибировать связывание белков лектинового домена FimH как с низкой аффинностью, так и высокой аффинностью к иммобилизованному мономаннозиду (данные не показаны).

Пример 4. Способность связывать охарактеризованные ингибирующие mAb 475 и 926
Мутации в лектиновом домене FimH могут вызывать потерю эпитопов, которые имеют решающее значение для обеспечения развития сильного и функционального иммунного ответа, таких как эпитопы, присутствующие в кармане связывания FimH. Чтобы гарантировать, что целостность кармана связывания не нарушена в результате описанных в данном документе мутаций, оценивали связывание моноклональных антител (mAb) mAb475 и mAb926 с мутантными лектиновыми доменами FimH. mAb475 и mAb926 распознают перекрывающиеся, но отличные эпитопы на лектиновом домене FimH внутри связывающего маннозу кармана FimH (Kisiela et al. 2013 и 2015).

Результаты

Мутированные лектиновые домены FimH были ранее описаны в WO 02102974. В WO 02102974 описан обширный список возможных мутаций, в основном неуточненных мутаций (предполагается 65 возможных сайтов мутаций в лектиновом домене FimH, длина которого составляет примерно 159 аминокислот). Однако в WO

02102974 указано, что лектиновые домены FimH, имеющие аминокислотную замену в положении 54, 133 или 135, являются наиболее многообещающими кандидатами, при этом FimH_Q133K явно упоминается как очень предпочтительный вариант. Поэтому было совершенно неожиданно, что FimH-23-10_Q133K не распознается функциональным mAb475, что указывает на проблемы с целостностью кармана связывания (таблица 3). Напротив, FimH-23-10_F144V распознавался как mAb475, так и mAb926, что указывает на то, что карман связывания оставался полностью интактным (таблица 3).

Таблица 3. Способность связывать охарактеризованные ингибирующие mAb 475 и 926

Вариант	Целостность кармана связывания	
	mAb 475	mAb 926
F144V	Связывание	Связывание
R60P	Связывание	Связывание
R60P-Q133K	Связывание отсутствует	Связывание
Q133K	Связывание отсутствует	Связывание
FimH_LD wt	Связывание	Связывание

Таким образом, в заключение, из всех вариантов FimH вариант FimH_F144V продемонстрировал сильно сниженную аффинность к маннозе (что указывает на то, что вариант имел конформацию с низкой аффинностью к маннозе) и был способен ингибировать связывание белков лектинового домена FimH как с низкой, так и с высокой аффинностью с иммобилизованным мономаннозидом. Кроме того, FimH_F144V индуцирует самые высокие уровни функциональных антител из всех исследованных мутаций и, как было показано, имеет интактный карман связывания. Эту мутантную форму также можно было получить в комплексе FimCH. В заключение, лектиновый домен FimH с валином в положении 144 характеризуется удивительной комбинацией признаков, которые делают его очень подходящим в качестве компонента вакцины, т. е. лучше дикого типа, на котором до сих пор, по-видимому, были сосредоточены усилия по разработке вакцины на основе FimH, и лучше других вариантов, протестированных в данном документе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, содержащий лектиновый домен FimH, где лектиновый домен FimH содержит аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из валина (V), изолейцина (I), лейцина (L), глицина (G), метионина (M) и аланина (A), в положении, которое соответствует положению 144 в SEQ ID NO: 1.
2. Полипептид по п. 1, где полипептид содержит мутацию, и где мутация представляет собой замену F144V.
3. Полипептид по п. 1 или п. 2, где лектиновый домен FimH имеет аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1, предпочтительно, где лектиновый домен FimH содержит SEQ ID NO: 1, где остаток фенилаланина в положении 144 заменен на валин.
4. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, где полипептид дополнительно содержит пилиновый домен FimH.
5. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, где полипептид представляет собой полноразмерный FimH, характеризующийся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2, предпочтительно, где FimH содержит SEQ ID NO: 2, где остаток фенилаланина в положении 144 заменен на валин.
6. Комплекс, содержащий полипептид по п. 4 или п. 5 и FimC (FimCH).
7. Полинуклеотид, кодирующий полипептид по любому из пп. 1-5.
8. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид по любому из пп. 1-5, комплекс по п. 6 или полинуклеотид по п. 7.
9. Фармацевтическая композиция по п. 8, где композиция дополнительно содержит адъювант.

10. Полипептид по пп. 1-5, комплекс по п. 6, полинуклеотид по п. 7 или фармацевтическая композиция по п. 8 или п. 9 для применения в качестве лекарственного препарата.
- 5 11. Полипептид по пп. 1-5, комплекс по п. 6, полинуклеотид по п. 7 или фармацевтическая композиция по п. 8 или п. 9 для применения в индуцировании иммунного ответа против бактерии из семейства *Enterobacteriaceae*.
- 10 12. Полипептид, полинуклеотид, комплекс или фармацевтическая композиция для применения по п. 11, где бактерия представляет собой *E.coli* или *Klebsiella*, предпочтительно *E.coli*.
- 15 13. Полипептид по пп. 1-5, комплекс по п. 6, полинуклеотид по п. 7 или фармацевтическая композиция по п. 8 или п. 9 для применения в предупреждении или лечении инфекции мочевыводящих путей, вызванной *E. coli*, у субъекта.
- 20 14. Способ лечения или предупреждения состояния, связанного с энтеробактериями, у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества полипептида по любому из пп. 1-5, комплекса по п. 6, полинуклеотида по п. 7 или фармацевтической композиции по п. 8 или п. 9.
15. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 7.
- 25 16. Способ получения полипептида, содержащего лектиновый домен FimH, включающий осуществление экспрессии полипептида за счет рекомбинантной клетки, содержащей полинуклеотид по п. 7 и/или вектор по п. 15, причем необязательно способ дополнительно включает выделение и очистку полипептида, за которыми необязательно следует составление полипептида в фармацевтическую композицию.

