

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391256** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.08.25

(22) Дата подачи заявки
2021.11.30

(51) Int. Cl. *C07K 14/245* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/108 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(54) **FimH, КОМПЛЕМЕНТИРОВАННЫЙ ДОНОРНОЙ ЦЕПЬЮ**

(31) **20211337.9; 20214942.3**

(32) **2020.12.02; 2020.12.17**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2021/083659**

(87) **WO 2022/117595 2022.06.09**

(88) **2022.07.07**

(71) Заявитель:
**ГЛАКСОСМИТКЛАЙН
БАЙОЛОДЖИКАЛС СА (BE)**

(72) Изобретатель:

**Адамо Роберто, Коцци Роберта,
Фантони Аделе, Фогат Санджай,
Росини Роберто, Скарселли Мария
(IT), Вахоме Ньютон (US)**

(74) Представитель:

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

(57) Настоящее изобретение относится к новым, модифицированным полипептидам FimH, кодирующим их нуклеиновым кислотам и применению указанных полипептидов и нуклеиновых кислот в лечении и/или предупреждении заболевания, в частности инфекции мочевыводящих путей (UTI).

A1

202391256

202391256

A1

РСТ/ЕР2021/083659 МПК *C07K 14/245* (2006.01) *A61K 35/74* (2015.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
A61K 39/108 (2006.01)

FiмН, КОМПЛЕМЕНТИРОВАННЫЙ ДОНОРНОЙ ЦЕПЬЮ
ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит представленный в электронном виде перечень последовательностей в формате текстового файла ASCII (VB67013 FF Seq List_ST25.txt; размер: 356838 байт; дата создания: 27 октября 2021 года), который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к новым модифицированным полипептидам FiмН, кодирующим их нуклеиновым кислотам и применению указанных полипептидов и нуклеиновых кислот в лечении и/или предупреждении заболевания, в частности инфекции мочевыводящих путей (UTI).

Уровень техники

Уропатогенная *Escherichia coli* (UPEC) является причиной приблизительно 85% всех инфекций мочевыводящих путей (UTI) (A. R. Ronald, Urinary tract infection in adults: Research priorities and strategies. Int. J. Antimicrob. Agents 17, 343–348; 2001). Локализованный на конце пилей 1 типа адгезин FiмН позволяет UPEC колонизировать эпителий мочевого пузыря при UTI посредством связывания с маннозилированными рецепторами на поверхности уротелия (M. A. Mulvey, Induction and evasion of host defences by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. Science 282, 1494–1497; 1998).

FiмН является изменчивым в зависимости от фазы, и сигналы из окружающей среды влияют на его экспрессию, что позволяет бактериям прикрепляться и избегать выведения при мочеиспускании (Infect. Immun. 1998, 66, 3303). Известно, что IgG (иммуноглобулины G) к FiмН ингибируют адгезию бактерий к мочевому пузырю у мышей и обезьян, и защитный эффект был ассоциирован с присутствием IgG к FiмН в моче (Langermann S, et al. Science. 1997 Apr 25;276(5312):607-11; Langermann S, et al. J Infect Dis. 2000 Feb;181(2):774-8). Транссудация сывороточных функциональных IgG в мочеполовой тракт, по-видимому, ответственна за ингибирование бактериальной адгезии.

Белок FiмН состоит из N-концевого лектинового домена (FiмН_L), который

связывает маннозу через карман, образованный тремя петлями, линкера из 5 аминокислот и С-концевого пилинового домена (FimH_P), который прикрепляет FimH к пиллю.

Кристаллические структуры FimH на разных стадиях сборки пилля показали, что FimH_P состоит из неполной иммуноглобулин(Ig)-подобной складки, которая стабилизирована за счет комплементирующего взаимодействия донорной цепи с шапероном FimC в периплазме и с FimG во время сборки пилля. FimH_P принимает единственную конформацию, но FimH_L может находиться в по меньшей мере двух конформационных состояниях с разной аффинностью в отношении маннозы – высокоаффинной конформации, релаксированном (R) состоянии, и низкоаффинной конформации, напряженном (T) состоянии (D. Choudhury, X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 285, 1061–1066 (1999); C.-S. Hung, Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection. *Mol. Microbiol.* 44, 903–915 (2002); I. Le Trong, Structural basis for mechanical force regulation of the adhesin FimH via finger trap-like β sheet twisting. *Cell* 141, 645–655 (2010); G. Phan, Crystal structure of the FimD usher bound to its cognate FimC–FimH substrate. *Nature* 474, 49–53 (2011); S. Geibel, Structural and energetic basis of folded-protein transport by the FimD usher. *Nature* 496, 243–246 (2013)).

Когда FimH связывается с FimC, FimH принимает удлиненную конформацию, в которой FimH_L и FimH_P не взаимодействуют друг с другом, а FimH_L находится в состоянии связывания маннозы с высокой аффинностью. Когда FimH связан с FimG, FimH принимает компактную конформацию, где FimH_L и FimH_P тесно взаимодействуют, а FimH_L находится в состоянии связывания маннозы с низкой аффинностью. FimH_P может аллостерически снижать способность FimH_L к связыванию маннозы за счет взаимодействия с нижней частью FimH_L; тогда как связывание маннозы с FimH_L индуцирует появление конформаций FimH_L, не взаимодействующих с FimH_P.

Ранее сообщалось, что моноклональные антитела к FimH_L, находящемуся в низкоаффинной конформации, обеспечивают лучшее ингибирование адгезии к мочевому пузырю по сравнению с моноклональными антителами к форме, образующейся после связывания маннозы (Tchesnokova *et al.*, 2011, 'Type 1 Fimbrial Adhesin FimH Elicits an Immune Response That Enhances Cell Adhesion of *Escherichia coli*' *Infect. Immun.* 79(10): 3895-3904).

FimH, содержащий некомплементированный пилиновый домен, является

нестабильным и склонен к агрегации. Следует отметить, что FimH обычно был использован в качестве антигена в комплексе с периплазматическим белком FimC. Компонент FimC не способствовал уменьшению бактериальной колонизации у мышей непосредственно, а скорее способствовал стабилизации FimH, защищая его от деградации (*Science* 1997, 276, 607; *FEMS Microbiol. Lett.* 2000, 188, 147). Для получения стабильного белка FimH пептид донорной цепи FimG (остатки FimG 1-14) добавляли *in vitro* для вытеснения шаперона сборки пилей FimC из FimH (Sauer MM, et al. *Nat Commun.* 2016 Mar 7;7:10738.). Низкоаффинная конформация FimH_L также была получена путем встраивания дисульфидного мостика, закрывающего маннозный карман (Kisielia DI, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Nov 19;110(47):19089-94).

Применение комплексов FimHC сопряжено со значительными затратами на производство, а именно получение двух полипептидов, которые затем должны быть объединены в комплекс, что представляет нежелательное осложнение и серьезную проблему, связанную с хранением, поскольку для того, чтобы антигены были эффективными, необходимо поддерживать стабильность комплексов в процессе хранения. Иммуногенность FimH_L, содержащего дисульфидный мостик, варьирует вследствие низкой молекулярной массы этой части, и также оказалось затруднительным экспрессировать полноразмерный FimH, содержащий дисульфидный мостик в домене FimH_L.

Таким образом, остается насущная потребность в антигенах из ExPEC (внекишечной патогенной *E. coli*), которые были бы как иммунологически эффективными, так и рентабельными для производства в требуемых масштабах.

Описание

Важно отметить, что FimC стабилизирует FimH в его растянутой форме, подобной форме после связывания (*Nat. Commun.* 2016, 7, 10738). Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что с помощью структурно-ориентированного конструирования возможно стабилизировать форму FimH до связывания в отсутствие FimC и/или улучшить способность созданных антител к FimH ингибировать адгезию бактерий к уроэпителиальным клеткам.

Соответственно, в первом аспекте настоящего изобретения предложен полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую или состоящую из:

- (a) FimH; или варианта, фрагмента и/или слияния FimH, и

(b) комплементирующей аминокислотной последовательности донорной цепи,
где (b) расположена после (a).

«Расположена после» обозначает или включает аминокислотную последовательность, которая, в пределах первичной аминокислотной последовательности полипептида, расположена ближе к С-концу полипептида относительно эталонной последовательности.

В качестве альтернативы или дополнительно, полипептид согласно настоящему изобретению содержит или состоит из аминокислотной последовательности X-(a)-L-(b)-Y, где «(a)» представляет собой полипептид FimH; или вариант, фрагмент и/или слияние FimH; «L» представляет собой возможный первый линкер; «(b)» представляет собой комплементирующую аминокислотную последовательность донорной цепи, «X» представляет собой возможную N-концевую аминокислотную последовательность; «Y» представляет собой возможную С-концевую аминокислотную последовательность, где «Y» не имеет происхождения из FimC или FimH или их фрагмента.

«Комплементирующая аминокислотная последовательность донорной цепи» обозначает аминокислотную последовательность, способную поддерживать FimH в (a) высокоаффинной конформации, релаксированном (R) состоянии, или (b) низкоаффинной конформации, напряженном (T) состоянии. В одном предпочтительном воплощении комплементирующая аминокислотная последовательность донорной цепи способна поддерживать FimH в низкоаффинной конформации, то есть напряженном (T) состоянии.

«Высокоаффинная конформация, релаксированное (R) состояние» обозначает или включает аффинность связывания маннозы, более близкую к таковой для FimH в высокоаффинной конформации, чем низкоаффинной конформации (в частности, FimH, из которого имеет происхождение или в основном имеет происхождение полипептид согласно настоящему изобретению, в особенности при образовании комплекса с FimC), например по меньшей мере 51%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% от аффинности связывания маннозы для FimH в высокоаффинной конформации, например $K_d < 1,2$ мкМ, как раскрыто в Kisiela DI, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Nov 19;110(47):19089-94.

«Низкоаффинная конформация, напряженное (T) состояние» обозначает или включает аффинность связывания маннозы, более близкую к таковой для FimH в

низкоаффинной конформации, чем высокоаффинной конформации (в частности, FimH, из которого имеет происхождение или в основном имеет происхождение полипептид согласно настоящему изобретению, в особенности при образовании комплекса с FimC), например менее чем 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% от аффинности связывания маннозы для FimH в высокоаффинной конформации, например $K_d \approx 300$ мкМ или выше (то есть аффинность связывания маннозы не детектируема), как раскрыто в Kisiela DI, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Nov 19;110(47):19089-94. В одном воплощении полипептид согласно настоящему изобретению находится в низкоаффинной конформации, например имеет аффинность связывания маннозы, с K_d приблизительно 100 мкМ, 200 мкМ, 300 мкМ, 400 мкМ, 500 мкМ, 600 мкМ, 700 мкМ, 800 мкМ, 900 мкМ или 1 мМ, либо не имеет детектируемой аффинности связывания маннозы.

Связывание маннозы может быть определено с использованием любых подходящих способов, известных в данной области техники, например поверхностный плазмонный резонанс (SPR) может быть использован для установления наличия связывания, специфичности связывания и констант связывания конструкций FimH с маннозилированным бычьим сывороточным альбумином (Man-BSA) и глюкозилированным бычьим сывороточным альбумином (Glc-BSA) (отрицательным контролем), см., например, *Rabani et al.*, 2018, 'Conformational switch of the bacterial adhesin FimH in the absence of the regulatory domain: Engineering a minimalistic allosteric system' *J. Biol. Chem.*, 293(5):1835-1849 и Bouckaert J, et al. Mol Microbiol. 2005 Jan;55(2):441-55, которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

Конформацию FimH также можно оценивать путем определения связывания конформационных антител с использованием любых подходящих способов, известных в данной области техники, например поверхностного плазмонного резонанса и описанных в разделе «Примеры». Типичные антитела способны распознавать эпитопы, которые по-разному перекрываются со связывающим маннозу карманом FimH, например антитела, связывающиеся с эпитопами, которые перекрываются со связывающим маннозу карманом, например эпитопами, которые ограничиваются лишь одной петлей связывающего маннозу кармана. Примеры антител раскрыты в WO 2016/183501 или Kisiela DI, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Nov 19;110(47):19089-94, Kisiela DI, et al. PLoS Pathog. 2015 May 14;11(5):e1004857, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. В одном воплощении конформационное

антитело имеет последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), представленную в SEQ ID NO: 125, и последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), представленную в SEQ ID NO: 126. В одном воплощении конформационное антитело имеет последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), представленную в SEQ ID NO: 127, и последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), представленную в SEQ ID NO: 128.

QVQLQQSGAELATPGASVKMSCKASGYTSTNYWIHWVKQRPGQGLEWIGYINPTSG
YTEYNQNFKDKATLTADKSSSTAYMQLTSLTSEDSAVYYCARGVIRDFWGQGTTLT
VSSAKTTAPSVYPLAPVCGDGTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPA
VLQSDLYTLSSSVTVTSS [SEQ ID NO: 125] – VH mAb 926

DVLMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQNIVHNNGNTYLEWYLQSPGQSPKLLIYK VSN
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPFTFGSGTKLEIK [SEQ
ID NO: 126] – VL (каппа) mAb 926

QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYPRDG
DTNYNGKFMVKVTLTADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCEVGRGFYGM DYWGQG
TSVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDGTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVH
TFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSS [SEQ ID NO: 127] – VH mAb 475

DIVMTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVSNVAWYQQKPGQSPKAMIYSASYRYS
GVPGRFTGSGSGTDFTLTINNVSQSEDLATYFCQQNSSFPFTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO:
128] – VL (каппа) mAb 475

В настоящем документе термин «аминокислота» включает двадцать стандартных генетически кодируемых аминокислот и их соответствующие стереоизомеры в «D»-форме (в сравнении с природной «L»-формой), омега-аминокислоты и другие встречающиеся в природе аминокислоты, нестандартные аминокислоты (например, α,α -дизамещенные аминокислоты, N-алкиламино кислоты и т.д.) и химически дериватизированные аминокислоты (см. ниже).

Таким образом, при перечислении конкретной аминокислоты, такой как «аланин», «Ala» или «A», указанный термин относится как к L-аланину, так и к D-аланину, если явно не указано иное. Другие нестандартные аминокислоты также могут быть подходящими компонентами для полипептидов согласно настоящему изобретению при условии, что полипептид сохраняет желаемое функциональное свойство. Для приведенных пептидов каждый кодируемый аминокислотный остаток, где это уместно, представлен с использованием однобуквенного обозначения, соответствующего

тривиальному названию стандартной аминокислоты.

«**Выделенный**» обозначает, что признак (например, полипептид) согласно настоящему изобретению предложен в контексте, отличном от того, в котором он может быть обнаружен в природе. Специалисту в данной области техники будет понятно, что «выделенный» означает измененный «рукой человека» по сравнению с его природным состоянием, то есть, если он встречается в природе, то он был изменен или удален из своей исходной среды, или и то, и другое. Например, полинуклеотид или полипептид, присутствующий в природе в живом организме, не является «выделенным», когда находится в таком живом организме, но тот же самый полинуклеотид или полипептид, отделенный от сопутствующих ему в природном состоянии материалов, является «выделенным» согласно использованию этого термина в настоящем раскрытии. Кроме того, полинуклеотид или полипептид, который вводят в организм путем трансформации, генетической манипуляции или любым другим рекомбинантным способом, следует понимать как «выделенный», даже если он все еще присутствует в указанном организме, который может быть живым или неживым, за исключением случаев, когда такая трансформация, генетическая манипуляция или другой рекомбинантный способ обеспечивают получение организма, который в остальном не отличим от встречающегося в природе организма.

«**Полипептид**» обозначает или включает полипептиды и белки.

«**Вариант**» полипептида включает инсерции, делеции и/или замены, как консервативные, так и неконсервативные. В частности, вариант полипептида может представлять собой вариант, не встречающийся в природе (то есть, который не встречается в природе или о наличии которого в природе не известно). Варианты могут иметь по меньшей мере 50% идентичности последовательности с эталонной последовательностью, например по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5%.

«**Идентичность последовательности**» или «**идентичность**» может быть определена с помощью алгоритма поиска гомологии Смита-Уотермана, реализованного в программе MPSRCH (Oxford Molecular), с использованием аффинного поиска пропусков с параметрами штраф за открытие пропуска = 12 и штраф за продление пропуска = 1, или с помощью алгоритма глобального выравнивания Нидлмана-Вунша (см., например, Rubin (2000) *Pediatric. Clin. North Am.* 47:269-285) с использованием параметров по умолчанию (например, со штрафом за открытие пропуска = 10,0 и со

штрафом за продление пропуска = 0,5, с использованием матрицы оценки EBLOSUM62). Этот алгоритм удобно реализован в инструменте Needle пакета EMBOSS. Если не указано иное, в случаях, когда настоящая заявка ссылается на идентичность последовательности в отношении конкретной эталонной последовательности, предполагается, что идентичность рассчитывают в пределах всей длины этой эталонной последовательности. В качестве альтернативы, процент идентичности можно определить способами, хорошо известными в данной области техники, например с помощью программы LALIGN (Huang and Miller, Adv. Appl. Math. (1991) 12:337-357, раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки) на веб-сайте онлайн-ресурса ExPASy www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html с использованием в качестве параметров опции глобального выравнивания, матрицы оценки BLOSUM62, штрафа за открытие пропуска –14, штрафа за продление пропуска – 4. В качестве альтернативы, процент идентичности последовательности между двумя полипептидами может быть определен с использованием подходящих компьютерных программ, например AlignX, Vector NTI Advance 10 (от Invitrogen Corporation) или программы GAP (от University of Wisconsin Genetic Computing Group).

Следует понимать, что процент идентичности рассчитывают по отношению к полимерам (например, полипептиду или полинуклеотиду), последовательность которых была выровнена.

Фрагменты и варианты могут быть получены с использованием методов белковой инженерии и сайт-направленного мутагенеза, хорошо известных в данной области техники (например, см. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3rd edition, Sambrook & Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки).

Специалистам в данной области техники будет понятно, что полипептид согласно настоящему изобретению или его фрагмент, вариант или слияние могут содержать одну или более аминокислот, которые являются модифицированными или дериватизированными.

Химические производные одной или более аминокислот могут быть получены путем осуществления реакции с функциональной боковой группой. Такие дериватизированные молекулы включают, например, молекулы, в которых свободные аминогруппы были дериватизированы с образованием гидрохлоридов аминов, *n*-толуолсульфонильных групп, карбоксибензоксигрупп, *m*-бутилоксикарбонильных

групп, хлорацетильных групп или формильных групп. Свободные карбоксильные группы могут быть дериватизированы с образованием солей, метиловых и этиловых сложных эфиров или других типов сложных эфиров и гидразидов. Свободные гидроксильные группы могут быть дериватизированы с образованием О-ацильных или О-алкильных производных. В качестве химических производных также включены пептиды, которые содержат встречающиеся в природе аминокислотные производные двадцати стандартных аминокислот. Например: 4-гидроксипролин может замещать пролин; 5-гидроксилизин может замещать лизин; 3-метилгистидин может замещать гистидин; гомосерин может замещать серин и орнитин может замещать лизин. Производные также включают пептиды, содержащие одно или более добавлений или одну или более делеций при условии сохранения требуемой активности. Другими включенными модификациями являются амидирование, N-концевое ацилирование (например, ацетилирование или амидирование тиогликолевой кислотой), амидирование концевой карбоксильной группы (например, с помощью аммиака или метиламина) и подобные концевые модификации.

Кроме того, специалистам в данной области техники будет понятно, что также могут быть подходящими пептидомиметические соединения. Таким образом, «полипептид» включает пептидомиметические соединения, демонстрирующие активность эндолизина. Термин «пептидомиметик» относится к соединению, которое имитирует конформацию и желаемые характеристики конкретного полипептида в качестве терапевтического агента.

Например, полипептиды, описанные в настоящем документе, включают не только молекулы, в которых аминокислотные остатки соединены пептидными (-CO-NH-) связями, но также и молекулы, в которых пептидная связь обращена. Такие ретроинверсо-пептидомиметики могут быть получены с использованием способов, известных в данной области техники, например таких как описанные в Meziere et al. (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237, раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Такие ретроинверсные пептиды, содержащие связи NH-CO вместо пептидных связей CO-NH, намного более устойчивы к протеолизу. В качестве альтернативы, полипептид согласно настоящему изобретению может представлять собой пептидомиметическое соединение, в котором один или более аминокислотных остатков связаны посредством связи $-\gamma(\text{CH}_2\text{NH})-$ вместо обычной амидной связи.

Следует понимать, что полипептид можно легко блокировать по его N- или C-

концу, например путем амидирования, чтобы способствовать уменьшению подверженности экзопролеолитическому расщеплению.

Как обсуждается в настоящем документе, для модификации полипептидов согласно настоящему изобретению можно применять различные неcodируемые или модифицированные аминокислоты, такие как D-аминокислоты и N-метиламинокислоты. Кроме того, предполагаемая биологически активная конформация может быть стабилизирована посредством ковалентной модификации, такой как циклизация или введение лактамных, дисульфидных или других типов мостиков. Способы синтеза циклических гомодетных пептидов и циклических гетеродетных пептидов, включая содержащие дисульфидные, сульфидные и алкиленовые мостики пептиды, раскрыты в US 5643872. Другие примеры способов циклизации обсуждаются и раскрыты в US 6008058, соответствующее раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Еще одним подходом к синтезу циклических стабилизированных пептидомиметических соединений является метатезис с замыканием цикла (RCM).

«Слияние» полипептида включает полипептид, слитый с любым другим полипептидом. Например, указанный полипептид может содержать одну или более дополнительных аминокислот, вставленных внутрь и/или находящихся на N- и/или C-концах аминокислотной последовательности полипептидов согласно настоящему изобретению.

Таким образом, как описано в настоящем документе, в одном воплощении полипептид согласно первому аспекту настоящего изобретения содержит полипептид согласно настоящему изобретению, с которым слит ферментативный домен из другого источника (например, из источника, отличного от полипептида согласно первому аспекту настоящего изобретения). Примеры подходящих ферментативных доменов включают: L-аланоил-D-глутаматэндопептидазу; D-глутамил-m-DAP-эндопептидазу; эндопептидазу, специфичную в отношении межпептидного мостика; N-ацетил-β-D-глюкозаминидазу (мурамоилгидролазу); N-ацетил-β-D-мурамидазу (лизоцим); литическую трансгликозилазу. Также можно использовать N-ацетилмурамоил-L-аланинамидазу из других источников (см. Loessner, 2005, *Current Opinion in Microbiology* 8: 480-487, раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки).

Например, указанный полипептид может быть слит с таким полипептидом как глутатион-S-трансфераза (GST) или белок A для облегчения очистки указанного полипептида. Примеры таких слитых молекул GST хорошо известны специалистам в

данной области техники. Аналогичным образом, указанный полипептид может быть слит с олигогистидиновой меткой, такой как His₆, или с распознаваемым антителом эпитопом, таким как хорошо известный эпитоп метки Мус. В объем настоящего изобретения также включены слияния с любым фрагментом, вариантом или производным указанного полипептида. Следует понимать, что предпочтительными являются слияния (или их варианты или производные), которые сохраняют желаемые свойства, например антигенную активность. Также особенно предпочтительно, чтобы слияния были такими, которые являются подходящими для применения в способах, описанных в настоящем документе.

Например, слияние может содержать дополнительную часть, которая придает желаемое свойство указанному полипептиду согласно настоящему изобретению; например, эта часть может быть полезной для детекции или выделения полипептида, стимулирования захвата полипептида клетками или направлении секреции белка из клетки. Указанная часть может представлять собой, например, группировку биотина, радиоактивную группировку, флуоресцентную группировку, например низкомолекулярный флуорофор или флуорофор на основе зеленого флуоресцентного белка (GFP), как хорошо известно специалистам в данной области техники. Указанная группировка может представлять собой иммуногенную метку, например метку Мус, известную специалистам в данной области техники, или может представлять собой липофильную молекулу или полипептидный домен, которые способны стимулировать захват полипептида клетками, как известно специалистам в данной области техники.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что полипептиды согласно настоящему изобретению также включают фармацевтически приемлемые соли присоединения кислоты или основания полипептидов, описанных в настоящем документе. Кислоты, применяемые для получения фармацевтически приемлемых солей присоединения кислоты вышеупомянутых основных соединений, подходящих для применения в настоящем изобретении, представляют собой кислоты, образующие нетоксичные соли присоединения кислоты, то есть соли, содержащие фармакологически приемлемые анионы, такие как гидрохлоридные, гидробромидные, гидройодидные, нитратные, сульфатные, бисульфатные, фосфатные, кислые фосфатные, ацетатные, лактатные, цитратные, кислые цитратные, тартратные, битартратные, сукцинатные, малеатные, фумаратные, глюконатные, сахаратные, бензоатные, метансульфонатные, этансульфонатные, бензолсульфонатные, *n*-толуолсульфонатные и памоатные [то есть

1,1'-метилен-бис-(2-гидрокси-3-нафтоатные)] соли, среди прочего.

Фармацевтически приемлемые соли присоединения основания также можно применять для получения фармацевтически приемлемых солевых форм полипептидов. Химические основания, которые можно применять в качестве реагентов для получения фармацевтически приемлемых солей присоединения основания для соединений согласно настоящему изобретению, которые являются кислыми по своей природе, представляют собой основания, образующие нетоксичные соли присоединения основания с такими соединениями. Такие нетоксичные соли присоединения основания включают, без ограничения, соли, полученные из таких фармакологически приемлемых катионов как катионы щелочных металлов (например, калия и натрия) и катионы щелочноземельных металлов (например, кальция и магния), соли присоединения аммония или водорастворимого амина, такого как N-метилглюкамин (меглюмин), и соли низшего алканоламмония и другие соли присоединения основания с фармацевтически приемлемыми органическими аминами, среди прочего.

Полипептид или его фрагмент, вариант, слияние или производное также могут быть лиофилизированы для хранения и восстановлены в подходящем носителе перед применением. Можно использовать любой подходящий способ лиофилизации (например, сушку распылением, сушку осадка) и/или методики восстановления. Специалистам в данной области техники будет понятно, что лиофилизация и восстановление могут приводить к потере активности в различной степени и что для компенсации может потребоваться повышение используемых уровней. Предпочтительно лиофилизированный (высушенный сублимацией) полипептид утрачивает не более чем приблизительно 20%, или не более чем приблизительно 25%, или не более чем приблизительно 30%, или не более чем приблизительно 35%, или не более чем приблизительно 40%, или не более чем приблизительно 45% или не более чем приблизительно 50% от своей активности (до лиофилизации) при регидратации.

Предпочтительно полипептиды согласно настоящему изобретению обеспечены в очищенной или по существу очищенной форме, то есть по существу не содержат других полипептидов (например, не содержат встречающихся в природе полипептидов), в частности других полипептидов *E. coli* или клеток-хозяев, и обычно имеют чистоту по меньшей мере приблизительно 50% (по массе), например чистоту по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,5% или 100% по массе (то есть менее 50% от композиции состоит из других экспрессированных полипептидов). Таким

образом, антигены в композициях отделены от целого организма, с которым экспрессируется молекула антигена.

FimH в соответствии с пунктом (а) может представлять собой FimH из любого вида *Escherichia coli* или *Klebsiella pneumoniae* (или его вариант, фрагмент и/или слияние), но, в качестве альтернативы или дополнительно, (а) содержит или состоит из:

(А) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 (номер доступа в Genbank: ELL41155.1 (FimH *E. coli* J96)), SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 100 (номер доступа в Genbank: ABG72591.1 (FimH UPEC 536)), SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102 (номер доступа в Genbank: AAN83822.1 (FimH CFT073)), SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104 (номер доступа в Genbank: AJE58925.1 (FimH *E. coli* 789)), SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106 (номер доступа в Genbank: AAC35864.1, соответствует последовательности нуклеиновой кислоты AF089840.1 (FimH IHЕ3034)) или SEQ ID NO: 107,

(В) аминокислотной последовательности, содержащей от 1 до 10 одиночных аминокислотных изменений по сравнению с SEQ ID NO: 1 (номер доступа в Genbank: ELL41155.1 (FimH *E. coli* J96)), SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 100 (номер доступа в Genbank: ABG72591.1 (FimH UPEC 536)), SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102 (номер доступа в Genbank: AAN83822.1 (FimH CFT073)), SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104 (номер доступа в Genbank: AJE58925.1 (FimH *E. coli* 789)), SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106 (номер доступа в Genbank: AAC35864.1, соответствует последовательности нуклеиновой кислоты AF089840.1 (FimH IHЕ3034)) или SEQ ID NO: 107, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 одиночных аминокислотных изменений,

(С) аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 (номер доступа в Genbank: ELL41155.1 (FimH *E. coli* J96)), SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 100 (номер доступа в Genbank: ABG72591.1 (FimH UPEC 536)), SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102 (номер доступа в Genbank: AAN83822.1 (FimH CFT073)), SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104 (номер доступа в Genbank: AJE58925.1 (FimH *E. coli* 789)), SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106 (номер доступа в Genbank: AAC35864.1, соответствует последовательности нуклеиновой кислоты AF089840.1 (FimH IHЕ3034)) или SEQ ID NO: 107, например 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, и/или

(D) фрагмента из по меньшей мере 10 последовательных аминокислот из SEQ ID NO: 1 (номер доступа в Genbank: ELL41155.1 (FimH *E. coli* J96)), SEQ ID NO: 2, SEQ

ID NO: 100 (номер доступа в Genbank: ABG72591.1 (FimH UPEC 536)), SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102 (номер доступа в Genbank: AAN83822.1 (FimH CFT073)), SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104 (номер доступа в Genbank: AJE58925.1 (FimH *E. coli* 789)), SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106 (номер доступа в Genbank: AAC35864.1, соответствует последовательности нуклеиновой кислоты AF089840.1 (FimH IHE3034)) или SEQ ID NO: 107, например по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 275, 280, 290 или 300 последовательных аминокислот.

MKRVITLFAVLLMGWSVNAWSFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNL
 VVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRV
 VYNSRTRDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYA
 NNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYLSGTTADAGN
 SIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSVAVSLGLTANYARTGGQVT
 AGNVQSIIGVTFVYQ

[SEQ ID NO: 1] - GenBank: ELL41155.1 (подчеркнут сигнальный пептид)

FACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVT
 LQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTRDKPWPVALYLTPVSSA
 GGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLP
 PDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGT
 IPANNTVSLGAVGTSVAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQ

[SEQ ID NO: 2] - GenBank: ELL41155.1, без 21 ак сигнального пептида

MIVMKRVITLFAVLLMGWSVNAWSFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQ
 NLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYNGSSYPFPTTSETP
 RVVYNSRTRDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNI
 YANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYLSGTTADA
 GNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSVAVSLGLTANYARTGGQ
 VTAGNVQSIIGVTFVYQ

[SEQ ID NO: 100] - номер доступа в Genbank: ABG72591.1 (FimH UPEC 536)
 (подчеркнут сигнальный пептид)

FACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVT
 LQRGSAYGGVLSNFSGTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTRDKPWPVALYLTPVSSA
 GGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLP
 PDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGT
 IPANNTVSLGAVGTSVAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQ

[SEQ ID NO: 101] - номер доступа в Genbank: ABG72591.1 (FimH UPEC 536), без сигнального пептида

MIVMKRVITLFAVLLMGWSVNAWSFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQ
 NLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSSFSGTVKYNGSSYPFPTTSETP
 RVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNI
 YANNDVVVPTGGCDASARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYLSSGTTADA
 GNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQ
 VTAGNVQSIIGVTFVYQ

[SEQ ID NO: 102] - номер доступа в Genbank: AAN83822.1 (FimH CFT073) (подчеркнут сигнальный пептид)

FACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVT
 LQRGSAYGGVLSSFSGTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSA
 GGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDASARDVTVTL
 PDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYLSSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGT
 IPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQ

[SEQ ID NO: 103] - номер доступа в Genbank: AAN83822.1 (FimH CFT073), без сигнального пептида

MIVMKRVITLFAVLLMGWSVNAWSFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVNVGQ
 NLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETP
 RVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNI
 YANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYLSSGTTADA
 GNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQ
 VTAGNVQSIIGVTFVYQ

[SEQ ID NO: 104] - номер доступа в Genbank: AJE58925.1 (FimH *E. coli* 789) (подчеркнут сигнальный пептид)

FACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVT
 LQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSA
 GGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTL
 PDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYLSSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGT
 IPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQ

[SEQ ID NO: 105] - номер доступа в Genbank: AJE58925.1 (FimH *E. coli* 789), без сигнального пептида

MKRVITLFAVLLMGWSVNAWSFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNL

VVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGAAYGGVLSSFSGTVKYNGSSYPFPTTSETPR
 VVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIY
 ANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLDPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYILSGTTADAG
 NSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSVAVSLGLTANYARTGGQV
 TAGNVQSIIGVTFVYQ

[SEQ ID NO: 106] - номер доступа в Genbank: AAC35864.1 (FimH IHE3034) (подчеркнут
 сигнальный пептид)

FACTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVT
 LQRGAAYGGVLSSFSGTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSS
 AGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTV
 TLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYILSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRN
 GTIIPANNTVSLGAVGTSVAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQ

[SEQ ID NO: 107] - номер доступа в Genbank: AAC35864.1 (FimH IHE3034), без
 сигнального пептида

В качестве альтернативы или дополнительно, полипептид представляет собой
 фрагмент, вариант, слияние и/или производное, способные индуцировать
 специфический иммунный ответ на полипептид, выбранный из группы, состоящей из
 SEQ ID NO: 1 (номер доступа в Genbank: ELL41155.1 (FimH *E. coli* J96)), SEQ ID NO: 2,
 SEQ ID NO: 100 (номер доступа в Genbank: ABG72591.1 (FimH UPEC 536)), SEQ ID NO:
 101, SEQ ID NO: 102 (номер доступа в Genbank: AAN83822.1 (FimH CFT073)), SEQ ID
 NO: 103, SEQ ID NO: 104 (номер доступа в Genbank: AJE58925.1 (FimH *E. coli* 789)), SEQ
 ID NO: 105 или SEQ ID NO: 106 (номер доступа в Genbank: AAC35864.1, соответствует
 последовательности нуклеиновой кислоты AF089840.1 (FimH IHE3034)), SEQ ID NO:
 107.

«Специфический иммунный ответ» обозначает или включает способность
 индуцировать иммунный ответ у субъекта, у которого вырабатывается антитело
 (например, стимулируется высвобождение антитела), способное связываться с
 указанной аминокислотной последовательностью. Предпочтительно, чтобы антитело
 было способно связываться *in vivo*, то есть в физиологических условиях, при которых
 аминокислотная последовательность или полипептид существуют на теле или внутри
 тела субъекта. Такая специфичность связывания может быть определена способами,
 хорошо известными в данной области техники, такими как, например, ELISA
 (твердофазный иммуноферментный анализ), иммуногистохимия, иммунопреципитация,

вестерн-блоты и проточная цитометрия, с использованием трансфицированных клеток, экспрессирующих полипептид согласно настоящему изобретению.

В качестве альтернативы или дополнительно, иммунный ответ представляет собой иммуноактивирующий ответ, например защитный иммунный ответ. Полипептид может быть способен вызывать защитный иммунный ответ *in vitro* и/или защитный иммунный ответ *in vivo* при введении субъекту.

В присутствии костимулирующих сигналов Т-клетки дифференцируются в конкретные фенотипические подтипы. Некоторые из этих подтипов участвуют в подавлении или прекращении естественных воспалительных сигналов. «Иммуноактивирующий ответ» обозначает и/или включает, что полипептид индуцирует или способен индуцировать иммунный ответ у субъекта, который не приводит к подавлению или прекращению воспаления или воспалительных сигналов и предпочтительно приводит к активации или усилению воспаления или воспалительных сигналов (например, цитокинов).

Защитный иммунный ответ *in vivo* может быть вызван у млекопитающего. В качестве альтернативы или дополнительно, млекопитающее выбрано из группы, состоящей из броненосца (*Dasyurus novemcinctus*), павиана (*Papio anubis*; *Papio cynocephalus*), верблюда (*Camelus bactrianus*, *Camelus dromedarius*, *Camelus ferus*), кошки (*Felis catus*), собаки (*Canis lupus familiaris*), лошади (*Equus ferus caballus*), хорька (*Mustela putorius furo*), козы (*Capra aegagrus hircus*), морской свинки (*Cavia porcellus*), золотистого хомячка (*Mesocricetus auratus*), кенгуру (*Macropus rufus*), ламы (*Lama glama*), мыши (*Mus musculus*), свиньи (*Sus scrofa domesticus*), кролика (*Oryctolagus cuniculus*), крысы (*Rattus norvegicus*), макака-резуса (*Macaca mulatta*), овцы (*Ovis aries*), отличных от человека приматов и человека (*Homo sapiens*).

В качестве альтернативы или дополнительно, два глициновых остатка линкера, соединяющего FimH_L с FimH_P, могут быть удалены для уменьшения гибкости FimH_L и ослабления связывания маннозы. Например, остатки глицина 196 и 197 части полипептида (а) по сравнению с SEQ ID NO: 1, остатки глицина 180 и 181 части полипептида (а) по сравнению с SEQ ID NO: 1, остатки глицина 183 и 184 части полипептида (а) по сравнению с SEQ ID NO: 100, остатки глицина 183 и 184 части полипептида (а) по сравнению с SEQ ID NO: 102, остатки глицина 183 и 184 части полипептида (а) по сравнению с SEQ ID NO: 104:

- (i) присутствуют; или

(ii) удалены.

В качестве альтернативы или дополнительно, одна или более аминокислот полипептида, которые, как известно или прогнозируется, являются N-гликозилированными или O-гликозилированными, заменены аминокислотами, не подверженными или в меньшей степени подверженными гликозилированию, например серином (S), аспарагиновой кислотой (D), аланином (A) или глутамином (Q). В качестве альтернативы или дополнительно, только часть полипептида (a) содержит замены аминокислот для уменьшения или устранения N- и/или O-гликозилирования.

N- и/или O-гликозилирование может быть определено с помощью любых подходящих способов, известных в данной области техники, например с помощью серверов NetNGlyc 1.0 и NetOGlyc 4.0 (доступны по адресам <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/> и <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) с использованием параметров по умолчанию.

В качестве альтернативы или дополнительно, часть полипептида (a) содержит одну или более из следующих аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 2: N28S, N91D, N249D, N256D, либо замены в положениях SEQ ID NO: 101, 103 и 105, соответствующих указанным положениям в SEQ ID NO: 2, например одну, две, три или четыре из указанных аминокислотных замен.

В качестве альтернативы или дополнительно, комплементирующая аминокислотная последовательность донорной цепи (b) содержит или состоит из:

- (1) 6-28 аминокислот из SEQ ID NO: 3; или ее фрагмента и/или варианта, или
- (2) 8-36 аминокислот из SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта.

ASATIQAADVTTITVNGKVVAKPCTVSTT

[SEQ ID NO: 3] - донорная цепь и фланкирующая область FimG (подчеркнута донорная цепь)

PSMDKSKLTENTLQLAIIISRIKLYYRPAKLALPPDQ

[SEQ ID NO: 4] - донорная цепь и фланкирующая область FimC (подчеркнута донорная цепь)

В качестве альтернативы или дополнительно, часть (b) содержит или состоит из 6-28 аминокислот из SEQ ID NO: 3 (или ее фрагмента и/или варианта), где указанные аминокислоты выбраны из группы, состоящей из:

- (1) аминокислот 1-28 из SEQ ID NO: 3; или ее фрагмента и/или варианта,
- (2) аминокислот 2-27 из SEQ ID NO: 3; или ее фрагмента и/или варианта,

- (3) аминокислот 3-26 из SEQ ID NO: 3; или ее фрагмента и/или варианта,
- (4) аминокислот 4-25 из SEQ ID NO: 3; или ее фрагмента и/или варианта,
- (5) аминокислот 5-24 из SEQ ID NO: 3; или ее фрагмента и/или варианта,
- (6) аминокислот 6-23 из SEQ ID NO: 3; или ее фрагмента и/или варианта,
- (7) аминокислот 7-22 из SEQ ID NO: 3; или ее фрагмента и/или варианта,
- (8) аминокислот 8-21 из SEQ ID NO: 3; или ее фрагмента и/или варианта,
- (9) аминокислот 9-20 из SEQ ID NO: 3; или ее фрагмента и/или варианта,
- (10) аминокислот 10-19 из SEQ ID NO: 3; или ее фрагмента и/или варианта,
- (11) аминокислот 11-18 из SEQ ID NO: 3; или ее фрагмента и/или варианта, и
- (12) аминокислот 12-17 из SEQ ID NO: 3; или ее фрагмента и/или варианта.

В качестве альтернативы или дополнительно, часть (b) содержит или состоит из 8-36 аминокислот из SEQ ID NO: 4 (или ее фрагмента и/или варианта), где указанные аминокислоты выбраны из группы, состоящей из:

- (1) аминокислот 1-36 SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,
- (2) аминокислот 2-35 SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,
- (3) аминокислот 3-34 SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,
- (4) аминокислот 4-33 SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,
- (5) аминокислот 5-32 SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,
- (6) аминокислот 6-31 SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,
- (7) аминокислот 7-30 SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,
- (8) аминокислот 8-29 SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,
- (9) аминокислот 9-28 SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,
- (10) аминокислот 10-27 SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,
- (11) аминокислот 11-26 SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,
- (12) аминокислот 12-25 SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,
- (13) аминокислот 13-24 SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,
- (14) аминокислот 14-23 SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,
- (15) аминокислот 15-24 SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта, и
- (16) аминокислот 16-23 SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта.

В качестве альтернативы или дополнительно, комплементирующая аминокислотная последовательность донорной цепи (b) содержит или состоит из:

- (A) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6,
- (B) аминокислотной последовательности, содержащей от 1 до 10 одиночных

аминокислотных изменений по сравнению с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 одиночных аминокислотных изменений,

(C) фрагмента из по меньшей мере 7 последовательных аминокислот из SEQ ID NO: 5, например по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12 или 13 последовательных аминокислот из SEQ ID NO: 5, и/или

(D) фрагмента из по меньшей мере 7 последовательных аминокислот из SEQ ID NO: 6, например по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 последовательных аминокислот из SEQ ID NO: 6.

ADVTTITVNGKVVAK [SEQ ID NO: 5] – донорная цепь FimG

ENTLQLAIIISRIKLYYRP [SEQ ID NO: 6] – донорная цепь FimC

В одном предпочтительном воплощении комплементирующая аминокислотная последовательность донорной цепи (b) содержит или состоит из SEQ ID NO: 5. В качестве альтернативы или дополнительно, комплементирующая аминокислотная последовательность донорной цепи (b) содержит или состоит из SEQ ID NO: 6.

В качестве альтернативы или дополнительно, комплементирующая аминокислотная последовательность донорной цепи (b) является:

- (1) непосредственно присоединенной к С-концу (a), или
- (2) присоединенной к С-концу (a) посредством первого линкера.

В качестве альтернативы или дополнительно, первый линкер (или «L») содержит или состоит из 2-20 аминокислот, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот. В качестве альтернативы или дополнительно, первый линкер начинается с пролина. В предпочтительном воплощении первый линкер начинается с пролина. В качестве альтернативы или дополнительно, первый линкер содержит или состоит из полярных аминокислот, например первый линкер полностью состоит из полярных аминокислот или, если первый линкер начинается с пролина, то остальные аминокислоты являются полярными. В качестве альтернативы или дополнительно, первый линкер содержит или состоит из:

- (1) PGDGN [SEQ ID NO: 7], или ее варианта или слияния, или
- (2) DNKQ [SEQ ID NO: 8], или ее варианта или слияния.

В одном предпочтительном воплощении первый линкер (или «L») содержит или состоит из SEQ ID NO: 7.

В качестве альтернативы или дополнительно, полипептид содержит аффинную метку для очистки белка на N-конце, С-конце и/или внутри последовательности,

например 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных остатков гистидина.

В качестве альтернативы или дополнительно, «X» содержит лидерную последовательность для клеточной секреции. В качестве альтернативы или дополнительно, полипептид содержит лидерную последовательность для клеточной секреции:

- (1) перед (a), или
- (2) на N-конце полипептида.

В качестве альтернативы или дополнительно, лидерная последовательность для клеточной секреции выбрана из группы, состоящей из:

- (1) METDTLLLWVLLLWVPGSTGD [SEQ ID NO: 9], или ее варианта или слияния,
- (2) METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRARTKLAL [SEQ ID NO: 10], или ее варианта или слияния,
- (3) MRLLAKIIICLMLWAICVA [SEQ ID NO: 11], или ее варианта или слияния,
- (4) MGWSCIIIFLVATATGVHS [SEQ ID NO: 12], или ее варианта или слияния,
- (5) METPAELLFLLLWLPDTTG [SEQ ID NO: 13], или ее варианта или слияния,
- (6) METDTLLLWVLLLWVPGSTG [SEQ ID NO: 108], или ее варианта или слияния, или
- (7) MEFGLSWVFLVAILEGVHC [SEQ ID NO: 14], или ее варианта или слияния.

В качестве альтернативы или дополнительно, «X» представляет собой остаток метионина (M), в частности, когда полипептид экспрессируется в клетках-хозяевах *E. coli*.

В качестве альтернативы или дополнительно, полипептид содержит домен в форме наночастицы на N-конце или C-конце. Таким образом, в одном воплощении «X» содержит домен в форме наночастицы или «Y» содержит домен в форме наночастицы. «**Домен в форме наночастицы**» обозначает или включает аминокислотные последовательности, способные к самосборке с образованием белковых комплексов, в частности, глобулярных белковых комплексов. «**Самосборка**» обозначает или включает сборку с участием доменов в форме наночастицы одного и того же типа (например, если домен в форме наночастицы представляет собой ферритиновый домен, способный к

самосборке с другими ферритиновыми доменами с образованием белковых комплексов, таких как глобулярные белковые комплексы). В частности, домены в форме наночастицы согласно настоящему изобретению способны к самосборке, когда они образуют часть полипептида согласно настоящему изобретению.

В качестве альтернативы или дополнительно, домен в форме наночастицы выбран из группы, состоящей из:

(a) ферритина (например, [SEQ ID NO: 15] или [SEQ ID NO: 109] (*Helicobacter pylori*), [SEQ ID NO: 16] (*Escherichia coli*) или любой из [SEQ ID NO: 149]-[SEQ ID NO: 152] (стабилизированного, из *Escherichia coli*)), или его варианта и/или фрагмента,

(b) iMX313 (например, [SEQ ID NO: 17]), или его варианта и/или фрагмента,

(c) mI3 (например, [SEQ ID NO: 18]), или его варианта и/или фрагмента,

(d) инкапсулина (например, [SEQ ID NO: 19]), или его варианта и/или фрагмента, или

(e) самособирающихся белков вирусной оболочки, таких как белок оболочки фага AP205 *Acinetobacter* (ссылка на последовательность в NCBI: NP_085472.1), корового белка вируса гепатита В (HВс) [SEQ ID NO: 110] или бактериофага Q β [SEQ ID NO: 111], или их варианта и/или фрагмента.

DIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFL
NENNVQVQLTSISAPENKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFL
QWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRK [SEQ ID NO: 15]
– ферритин *H. pylori*

DIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFL
NENNVQVQLTSISAPENKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFL
QWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS [SEQ ID NO:
109] – ферритин *H. pylori* (с концевым S)

LKPEMIEKLNEQMNLELYSSLLYQQMSAWCSYHTFEGAAFLRRHAQEEMTHMQR
LFDYLTDTGNLPRINTVESPFAYSSLDLDFQETYKHEQLITQKINELAHAAAMTNQDY
PTFNFLQWYVSEQHEEEKLFKSIIDKLSLAGKSGEGLYFIDKELSTLDTQN [SEQ ID
NO: 16] – ферритин *E. coli*

KKQGDADVCGEVAYIQSVVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLVQLGLSKEG
[SEQ ID NO: 17] – iMX313

MKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKKKALAVFLGGVHLEITFTVPDADTVIKELSFL

KEMGAIIGAGTVTSVEQARKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFAKEKGVFYMPGVMTPTE
LVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKGPFPNVKFVPTGGVNLNDNVCEWFKAG
VLAVGVGSALVKGTPVEVAEKAKAFVEKIRGCTE [SEQ ID NO: 18] – mi3

MEFLKRSFAPLTEKQWQEIDNRAREIFKTQLYGRKFVDVEGPGWEYAAHPLGEVE
VLSDENEVVKWGLRKSLPLIELRATFTLDLWELDNLERGKPNVDLSSLEETVRKVAE
FEDEVIFRGCEKSGVKGLLSFEERKIECGSTPKDLLEAIVRALSIFSKDGIEGPYTLVINT
DRWINFLKEEAGHYPLEKRVEECLRGGKIITTPRIEDALVVSERGGDFKLILGQDLSIG
YEDREKDAVRLFITETFTFQVVNPEALILLKF [SEQ ID NO: 19] – инкапсулин

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPVSRDLLDTASALYREALSPEHCSPHHTALRQAI
LCWGELMTLATWVGNNLEDASRDLVVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVL
EYLVSFVWIRTTPPAYRPPNAPILSTLPETTVV [SEQ ID NO: 110] – Hbc

MAKLETVTLGNIGKDQKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVPALEKRVTVSVSQP
SRNRKNYKVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQAYADVTFSTQYSTDEERAFVREL
AALLASPLLIDAIDQLNPAY [SEQ ID NO: 111] – Qbeta

LKPEMIEKLNEQMNLELYSSLLYQQMSAWCSYHGFEGAAAFRRHAQEEMTHMQR
LFDYLTDTGNLPRIDTIPSPFAEYSSLDELQFQETYKHEQLITQKINELAHAAMTNQDYP
TFNFLQWYVAEQHEEEKLFKSIIDKLSLAGKSGEGLYFIDKELSTLDTQN [SEQ ID
NO: 149] – 1EUM_0_5 – стабилизированный ферритин *E. coli*

LKPEMIEKLNEQMNLELYSSLLYQQMSAWCSYHGFEGAAAFRRHAQEEMTHMQR
LFDYLTDTGNLPRINTIPSPFAEYSSLDELQFQETYKHEQLITQKINELAHAAMTNQDYP
TFNFLQWYVAEQHEEEKLFKSIIDKLSLAGKSGEGLYFIDKELSTLDTQN [SEQ ID
NO: 150] – 1EUM_2 – стабилизированный ферритин *E. coli*

LKPEMIEKLNEQMNLELYSSLLYQQMSAWCSYHGFEGAAAFRRHAQEEMTHMQR
LFDYLTDTGNLPRINTVPSFAEYSSLDELQFQETYKHEQLITQKINELAHAAMTNQDY
PTFNFLQWYVAEQHEEEKLFKSIIDKLSLAGKSGEGLYFIDKELSTLDTQN [SEQ ID
NO: 151] – 1EUM_2_5 – стабилизированный ферритин *E. coli*

LKPEMIEKLNEQMNLELYSSLLYQQMSAWCSYHGFEGAAAFRRHAQEEMTHMQR
LFDYLTDTGNLPRINTVESFAEYSSLDELQFQETYKHEQLITQKINELAHAAMTNQDY
PTFNFLQWYVSEQHEEEKLFKSIIDKLSLAGKSGEGLYFIDKELSTLDTQN [SEQ ID
NO: 152] – 1EUM_6 – стабилизированный ферритин *E. coli*

В качестве альтернативы или дополнительно, домен в форме наночастицы является:

- (1) непосредственно присоединенным к полипептиду, или

(2) присоединенным к полипептиду посредством второго линкера.

В качестве альтернативы или дополнительно, второй линкер содержит или состоит из 2-20 аминокислот, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот. В качестве альтернативы или дополнительно, второй линкер содержит или состоит из остатков глицина (G) и/или серина (S), или содержит по меньшей мере 50% остатков глицина (G) и/или серина (S), например по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90% или 95% остатков глицина (G) и/или серина (S).

В качестве альтернативы или дополнительно, второй линкер выбран из группы, состоящей из:

- (a) GSSGSGSGS [SEQ ID NO: 112], или ее варианта или слияния,
- (b) GGSGS [SEQ ID NO: 113], или ее варианта или слияния,
- (c) GGS, или ее варианта или слияния,
- (d) SGSHHHHHHHGGS [SEQ ID NO: 114], или ее варианта или слияния,
- (e) AKFVAAWTLKAAA [SEQ ID NO: 115], или ее варианта или слияния,
- (f) GGGGSLVPRGSGGGGS [SEQ ID NO: 116], или ее варианта или слияния,
- (g) EAAAKEAAAKEAAAKA [SEQ ID NO: 117], или ее варианта или слияния,
- (h) SGSFVAAWTLKAAAGGS [SEQ ID NO: 118], или ее варианта или слияния, и
- (i) SGSGSGGGGGGS [SEQ ID NO: 119], или ее варианта или слияния.

Линкер AKFVAAWTLKAAA [SEQ ID NO: 115], также известный как Pan HLA DR-связывающий эпитоп (PADRE), представляет собой пептид, активирующий антигенспецифические CD4+ Т-клетки, который был предложен в качестве эпитоп-носителя, подходящего для применения в разработке синтетических и рекомбинантных вакцин, как раскрыто в "Linear PADRE T Helper Epitope and Carbohydrate B Cell Epitope Conjugates Induce Specific High Titer IgG Antibody Responses" 10.4049/jimmunol.164.3.1625, раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Линкеры GGGGSLVPRGSGGGGS [SEQ ID NO: 116] и EAAAKEAAAKEAAAKA [SEQ ID NO: 117] представляют собой жесткие линкеры, которые не способны к укладке в альфа-спираль.

В качестве альтернативы или дополнительно, домен в форме наночастицы расположен:

- (a) перед (a),
- (b) на N-конце полипептида,

- (c) после (b), или
- (d) на С-конце полипептида.

В еще одном аспекте предложен сконструированный *de novo* полипептидный мономер (и кодирующие его молекулы нуклеиновой кислоты), способный к самосборке в наночастицы (то есть белковые наночастицы). Также предложены клетки-хозяева, векторы или конструкции и способ получения или применения таких полипептидных мономеров и белковых наночастиц. Настоящее изобретение дополнительно относится к наночастицам (NP), которые имеют структуру поверхности, содержащую по меньшей мере один такой полипептидный мономер или состоящую из него, и которые возможно несут одну или более молекул антигена.

Полипептидный мономер согласно настоящему изобретению является мутированным по сравнению с соответствующим мономером дикого типа (то есть бактериальным ферритином *E. coli* [SEQ ID NO: 16]) и, таким образом, может иметь повышенную стабильность, такую как улучшенная термостабильность или стабильность сворачивания в ккал/моль по сравнению с соответствующим мономером дикого типа, и, таким образом, может образовывать самособранную наночастицу с улучшенной термостабильностью или стабильностью сворачивания в ккал/моль по сравнению с соответствующей наночастицей дикого типа.

«**Повышенная стабильность**» обозначает, что молекула характеризуется меньшей скоростью разворачивания, меньшей степенью неправильного сворачивания, меньшей степенью перемещения белковых доменов, меньшим количеством перестроек белковых доменов, увеличенным периодом полужизни (*in vitro* или *in vivo*), увеличенным сроком хранения, повышенной температурой плавления (T_m) (а именно по меньшей мере одной повышенной температурой плавления, если молекула имеет две или более), более низким значением свободной энергии сворачивания (ккал/моль), более низким значением свободной энергии связывания (как в случае субъединицы, которая связывает другие субъединицы с образованием макромолекулы) или комбинацией вышеперечисленного по сравнению с контрольной молекулой или соответствующей молекулой дикого типа в сопоставимых или одинаковых условиях (например, температуре и/или pH). Для ясности примера, если стабильность молекулы повышена за счет одной или более мутаций («стабилизирующих мутаций», таких как одна или более аминокислотных мутаций), то «**контрольная молекула**» или ее «**соответствующая молекула дикого типа**» означает молекулу, которая *не* содержит одной или более

стабилизирующих мутаций. В отношении настоящего изобретения мономер или наночастица могут быть описаны как имеющие повышенную стабильность (например, повышенную термостабильность, и/или повышенную стабильность сворачивания, и/или повышенную стабильность связывания) по сравнению с соответствующими молекулами дикого типа в сопоставимых (или одинаковых) условиях. В настоящем документе термин «условия» включает экспериментальные и физиологические условия. См., например, публикацию US 2011/0229507; Clapp *et al.*, 2011 J. Pharm. Sci. 100(2): 388-401, где обсуждается повышенная стабильность за счет адъювантов и оценивается стабильность антигена в условиях измененных pH, гидратации и температуры; и Rossi *et al.*, 2016 Infect. Immun. 84(6): 1735-1742. Для ясности, «стабильность» может быть определена как «**термостабильность**», которая обозначает устойчивость молекулы к разворачиванию при определенной температуре и которую обычно выражают в данной области техники с помощью температур(ы) плавления молекулы, в частности, повышения температуры плавления молекулы (у которой может быть более одной температуры плавления в случае олигомерных белков, таких как димеры или тримеры), см. Kumar *et al.* 2000 Prot. Eng. Des. Sel. "Factors enhancing protein thermostability" 13(3): 179-191; и Miotto *et al.* 2018 bioRxiv doi: 10.1101/354266 "Insights on protein thermal stability: a graph representation of molecule interactions"). В зависимости от контекста, можно сравнивать термостабильность двух или более молекул (таких как две или более *модифицированные* молекулы, каждая из которых содержит одну или более стабилизирующих мутаций), и можно сказать, что одна из них более термостабильна, чем другая (то есть имеет увеличенную или повышенную термостабильность по сравнению с другой). В настоящем изобретении стабильность, в частности термостабильность, может быть определена с помощью дельта-метода оценки стабильности (d-стабильность или dS), который представляет собой определяемую путем расчетов разницу между относительной термостабильностью мутантного белка *in silico* и стабильностью контрольного белка или соответствующего белка дикого типа (то есть нестабилизированного белка с мутациями). Способы определения d-стабильности известны (WO 2020/079586 (PCT/IB2019/058777), MALITO *et al.*) и могут включать использование таких инструментов как программное обеспечение Molecular Operating Environment (MOE) (ссылка: программное обеспечение Molecular Operating Environment (MOE); Chemical Computing Group Inc., доступно на веб-сайте WorldWideWeb(www).chemcomp.com). dS измеряется в ккал/моль. Более низкие

значения dS свидетельствуют о большей стабильности белка, тогда как более высокие значения dS свидетельствуют о меньшей стабильности белка. Можно указать, что мутантные полипептиды согласно настоящему изобретению имеют более высокую относительную термостабильность (в ккал/моль) по сравнению с немутантным полипептидом в одинаковых или сопоставимых экспериментальных условиях. Также можно указать, что мутантные полипептиды согласно настоящему изобретению характеризуются более низким значением dS , чем немутантный полипептид, в одинаковых или сопоставимых экспериментальных условиях. Из настоящего изобретения следует понимать, что мутантный полипептид, характеризующийся более низким значением dS по сравнению с немутантным полипептидом в одинаковых или сопоставимых экспериментальных условиях, является *более стабильным*, чем немутантный полипептид. Увеличение стабильности можно оценивать посредством дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), как описано в Bruylants *et al.* 2005 *Curr. Med. Chem.* 12: 2011-2020 и в "Characterizing Protein stability by DSC" от Calorimetry Sciences Corporation (Life Sciences Application Note, номер документа 20211021306, февраль 2006 года), или посредством дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF). Повышение (термо)стабильности может быть охарактеризовано как повышение сресуток точки теплового перехода (T_m) на по меньшей мере приблизительно 2°C согласно оценке в анализах DSC или DSF. См., например, Thomas *et al.*, 2013 *Hum. Vaccin. Immunother.* 9(4): 744-752. «Значительное» повышение или увеличение термостабильности определяют как повышение расчетной T_m комплекса (рассчитанной, например, в соответствии с протоколом, приведенным в Примере 4.7 WO 2020/079586 (PCT/IB2019/058777), MALITO *et al.*) на по меньшей мере 5°C. Для ясности, «стабильность» в настоящем документе может быть определена как **«стабильность сворачивания»**, которая относится к свободной энергии сворачивания молекулы (выраженной в килокалориях на моль (ккал/моль)) и которая может быть определена с использованием множества известных методик (см. раздел «Примеры» в настоящем документе, а также, например, Zhang *et al.* 2012 *Bioinformatics* 28(5): 664-671). В зависимости от контекста, можно сравнивать стабильность сворачивания двух или более молекул, и можно сказать, что одна из них *более стабильна*, чем другая, поскольку она характеризуется более *низким* значением свободной энергии сворачивания (в ккал/моль). Можно указать, что мономер или наночастица согласно настоящему изобретению имеет более высокую/повышенную стабильность сворачивания по сравнению с контрольной

молекулой или соответствующей молекулой дикого типа в одинаковых или сопоставимых условиях (например, экспериментальных условиях). «Значительное» повышение или увеличение стабильности сворачивания определяют как значение изменения свободной энергии сворачивания, которое на по меньшей мере 100 ккал/моль ниже, чем значение изменения свободной энергии сворачивания (в ккал/моль) молекулы сравнения в сопоставимых или одинаковых условиях.

В одном воплощении полипептидный мономер согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности, например по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16 и содержит одну или более мутаций из группы, состоящей из: глицина (G) в положении, которое соответствует остатку 34 в SEQ ID NO: 16 (мутация T34G), аспарагиновой кислоты (D) в положении, которое соответствует остатку 70 в SEQ ID NO: 16 (мутация N70D), изолейцина (I) в положении, которое соответствует остатку 72 в SEQ ID NO: 16 (мутация V72I), и аланина (A) в положении, которое соответствует остатку 124 в SEQ ID NO: 16 (мутация S124A).

В одном предпочтительном воплощении полипептидный мономер содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности, например по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16 и содержит глицин (G) в положении, которое соответствует остатку 34 в SEQ ID NO: 16 (мутация T34G), аспарагиновую кислоту (D) в положении, которое соответствует остатку 70 в SEQ ID NO: 16 (мутация N70D), изолейцин (I) в положении, которое соответствует остатку 72 в SEQ ID NO: 16 (мутация V72I), и аланин (A) в положении, которое соответствует остатку 124 в SEQ ID NO: 16 (мутация S124A). В одном воплощении полипептидный мономер содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности, например по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 149. В одном воплощении полипептидный мономер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 149.

В одном воплощении полипептидный мономер содержит аминокислотную

последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности, например по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16 и содержит глицин (G) в положении, которое соответствует остатку 34 в SEQ ID NO: 16 (мутация T34G), изолейцин (I) в положении, которое соответствует остатку 72 в SEQ ID NO: 16 (мутация V72I), и аланин (A) в положении, которое соответствует остатку 124 в SEQ ID NO: 16 (мутация S124A). В одном воплощении полипептидный мономер содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности, например по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 150. В одном воплощении полипептидный мономер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 150.

В одном воплощении полипептидный мономер содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности, например по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16 и содержит глицин (G) в положении, которое соответствует остатку 34 в SEQ ID NO: 16 (мутация T34G), и аланин (A) в положении, которое соответствует остатку 124 в SEQ ID NO: 16 (мутация S124A). В одном воплощении полипептидный мономер содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности, например по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 151. В одном воплощении полипептидный мономер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151.

В одном воплощении полипептидный мономер содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности, например по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16 и содержит глицин (G) в положении, которое соответствует остатку 34 в SEQ ID NO: 16 (мутация T34G). В одном воплощении полипептидный мономер содержит аминокислотную последовательность, которая имеет

по меньшей мере 80% идентичности последовательности, например по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 152. В одном воплощении полипептидный мономер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152.

Сконструированные *de novo* полипептидные мономеры согласно настоящему изобретению способны к самосборке в приблизительно сферические наночастицы (например, с диаметром структуры внешней поверхности от приблизительно 5 нм до приблизительно 30 нм, предпочтительно от приблизительно 15 до 20 нм). Таким образом, полипептидные мономеры согласно настоящему изобретению можно применять для получения самособранных белковых наночастиц, и возможно при этом самособранная белковая наночастица несет (например, экспонирует) по меньшей мере одну молекулу антигена, по меньшей мере одну молекулу иммуностимулятора или по меньшей мере одну молекулу антигена и по меньшей мере одну молекулу иммуностимулятора. В одном воплощении наночастицы согласно настоящему изобретению (например, приблизительно сферические наночастицы согласно настоящему изобретению) состоят из 24 мономерных субъединиц (например, где по меньшей мере одна мономерная субъединица представляет собой полипептидный мономер согласно настоящему изобретению) и имеют в основе геометрическую форму, которая характеризуется октаэдрической симметрией.

Наночастицы (встречающиеся в природе и рекомбинантные наночастицы, например наночастицы, сконструированные путем расчетов), способы их получения и их применение в качестве, например, каркасов (или «носителей») для одного или более антигенов или иммуностимуляторов (то есть «фармацевтически приемлемые наночастицы») известны в данной области техники.

Специалистам в данной области техники будет понятно (см., например, Ueda et al. 2020 eLife 9: e57659; Pan et al. 2020 Adv. Mater. 32:2002940), что белковую наночастицу согласно настоящему изобретению можно применять в качестве «каркаса», на поверхности которого она несет (посредством конъюгации, то есть соединения, прикрепления, образования связей, слияния, связывания или лигирования со структурой внешней поверхности наночастицы) антиген, иммуностимулятор, множество копий одного и того же антигена, множество копий одного и того же иммуностимулятора, смесь двух или более антигенов (например, двух, трех, четырех или пяти антигенов; то

есть двух-, трех-, четырех- или пентавалентный антиген), смесь двух или более иммуностимуляторов (например, двух, трех, четырех или пяти иммуностимуляторов; то есть двух-, трех-, четырех- или пентавалентный иммуностимулятор) или смесь одного или более антигенов с одним или более иммуностимуляторами.

В некоторых воплощениях при самосборке полипептидных мономеров их N-концы располагаются на наружной/внешней поверхности наночастицы, а их C-концы – на внутрилежащей/коровой/внутренней поверхности наночастицы. Таким образом, антиген или иммуностимулятор, связанный с N-концом полипептидного мономера, экспонируется на внешней поверхности собранной наночастицы. В других воплощениях при самосборке полипептидных мономеров их C-концы располагаются на наружной/внешней поверхности наночастицы, а их N-концы – на внутрилежащей/коровой/внутренней поверхности наночастицы. Таким образом, антиген или иммуностимулятор, связанный с C-концом полипептидного мономера, экспонируется на внешней поверхности собранной наночастицы. В некоторых других воплощениях антиген или иммуностимулятор связан с N-концом полипептидного мономера и антиген или иммуностимулятор связан с C-концом этого полипептидного мономера (антиген(ы) и/или иммуностимулятор(ы) являются одинаковыми или различными) таким образом, что антиген или иммуностимулятор экспонируется на внешней поверхности и переносится на внутренней поверхности собранной наночастицы.

Таким образом, в одном из воплощений настоящего изобретения предложена наночастица, несущая одну или более молекул (например, где молекула(ы) является(ются) гетерологичной(ыми) по сравнению с одним или более (например, всеми) мономерами наночастицы), и возможно где одна или более молекул экспонируется(ются) на внешней поверхности наночастицы. В случае, когда указанные одна или более экспонированных молекул (например, антиген(ы) и/или иммуностимулятор(ы)) представляют собой белки (например, все из них представляют собой белки), они могут быть экспрессированы в виде части полипептидных мономеров (то есть в виде мономеров слитых белков) таким образом, что самосборка наночастицы приводит к экспонированию белков на внешней поверхности наночастицы. В качестве альтернативы, экспонируемая белковая молекула может быть присоединена к собранной наночастице, например, путем химической или биологической конъюгации, как обсуждается в настоящем документе и как известно в данной области техники. В еще

одном воплощении настоящего изобретения экспонируемая молекула представляет собой поли- или олигосахарид (такой как бактериальный капсульный полисахарид); сахарид может быть связан с наночастицей с образованием «гликоконъюгата». См. Polonskaya et al. 2017 J. Clin. Invest. 127(4):1492-1504; Pan et al. 2020 Adv. Mater. 32:2002940.

В одном воплощении антиген представляет собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую или состоящую из (a) FimH; или варианта, фрагмента и/или слияния FimH, и (b) комплементирующей аминокислотной последовательности донорной цепи, где (b) расположена после (a) или иным описанным в настоящем документе образом. В одном воплощении антиген содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности, например по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 124. В одном воплощении антиген содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 124.

В одном воплощении наночастица содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности, например по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 130 или 153. В одном воплощении наночастица содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 130 или 153.

Таким образом, в некоторых воплощениях настоящего изобретения предложены полипептиды, способные к самосборке в наночастицу (то есть полипептидные мономеры), а также молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют такие полипептиды. В настоящем изобретении аминокислотная последовательность может содержать или дополнительно содержать метку (например, метку, обеспечивающую очистку, такую как гистидиновая метка (например, 6xHis-метка), энтерокиназная метка или метка тус) и линкер между полипептидным мономером и одной или более молекул (например, антигена), которые несет наночастица. Кроме того, в настоящем изобретении последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать аминокислотную последовательность, которая содержит метку и/или линкер.

В качестве альтернативы или дополнительно, полипептид содержит остаток фенилаланина (Phe, F) на N-конце полипептида FimH. В качестве альтернативы или

дополнительно, если полипептид содержит домен в форме наночастицы на С-конце или на N-конце, то полипептид содержит остаток фенилаланина (Phe, F) или аспарагиновой кислоты (Asp, D) на N-конце зрелого полипептида, то есть после расщепления или удаления лидерной последовательности в случае ее присутствия. Наличие остатка аспарагиновой кислоты (Asp, D) на N-конце зрелого полипептида, который содержит домен в форме наночастицы на С-конце или на N-конце, связано с улучшенной секрецией полипептида при экспрессии в клетке-хозяине млекопитающего.

В качестве альтернативы или дополнительно, полипептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая соответствует:

- (a) SEQ ID NO: 20, или ее варианту и/или фрагменту,
- (b) SEQ ID NO: 21, или ее варианту и/или фрагменту,
- (c) SEQ ID NO: 22, или ее варианту и/или фрагменту,
- (d) SEQ ID NO: 23, или ее варианту и/или фрагменту,
- (e) SEQ ID NO: 24, или ее варианту и/или фрагменту,
- (f) SEQ ID NO: 25, или ее варианту и/или фрагменту,
- (g) SEQ ID NO: 26, или ее варианту и/или фрагменту,
- (h) SEQ ID NO: 27, или ее варианту и/или фрагменту,
- (i) SEQ ID NO: 28, или ее варианту и/или фрагменту,
- (j) SEQ ID NO: 29, или ее варианту и/или фрагменту,
- (k) SEQ ID NO: 30, или ее варианту и/или фрагменту,
- (l) SEQ ID NO: 31, или ее варианту и/или фрагменту,
- (m) SEQ ID NO: 32, или ее варианту и/или фрагменту,
- (n) SEQ ID NO: 33, или ее варианту и/или фрагменту,
- (o) SEQ ID NO: 34, или ее варианту и/или фрагменту,
- (p) SEQ ID NO: 35, или ее варианту и/или фрагменту,
- (q) SEQ ID NO: 36, или ее варианту и/или фрагменту,
- (r) SEQ ID NO: 37, или ее варианту и/или фрагменту,
- (s) SEQ ID NO: 38, или ее варианту и/или фрагменту,
- (t) SEQ ID NO: 39, или ее варианту и/или фрагменту,
- (u) SEQ ID NO: 40, или ее варианту и/или фрагменту,
- (v) SEQ ID NO: 41, или ее варианту и/или фрагменту,
- (w) SEQ ID NO: 42, или ее варианту и/или фрагменту,
- (x) SEQ ID NO: 43, или ее варианту и/или фрагменту,

- (y) SEQ ID NO: 44, или ее варианту и/или фрагменту,
- (z) SEQ ID NO: 79, или ее варианту и/или фрагменту,
- (aa) SEQ ID NO: 80, или ее варианту и/или фрагменту,
- (bb) SEQ ID NO: 81, или ее варианту и/или фрагменту,
- (cc) SEQ ID NO: 82, или ее варианту и/или фрагменту,
- (dd) SEQ ID NO: 83, или ее варианту и/или фрагменту,
- (ee) SEQ ID NO: 84, или ее варианту и/или фрагменту,
- (ff) SEQ ID NO: 85, или ее варианту и/или фрагменту,
- (gg) SEQ ID NO: 86, или ее варианту и/или фрагменту,
- (hh) SEQ ID NO: 87, или ее варианту и/или фрагменту,
- (ii) SEQ ID NO: 88, или ее варианту и/или фрагменту,
- (jj) SEQ ID NO: 89, или ее варианту и/или фрагменту,
- (kk) любой из SEQ ID NO: 120-124, SEQ ID NO: 129-143 и 153, или ее варианту и/или фрагменту.

В одном предпочтительном воплощении полипептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая соответствует SEQ ID NO: 123 или SEQ ID NO: 124. В одном воплощении полипептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 70% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 123 или SEQ ID NO: 124, например 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 123 или SEQ ID NO: 124.

В качестве альтернативы или дополнительно, связывание маннозы полипептидом на по меньшей мере 20% ниже, чем таковое для нативного FimH в комплексе с нативным FimC (комплекса FimHC), например на по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% ниже.

Связывание маннозы может быть определено с использованием любых подходящих способов, известных в данной области техники, например для установления наличия связывания, специфичности связывания и констант связывания конструкций FimH с Man-BSA и Glc-BSA (отрицательным контролем) может быть использован поверхностный плазмонный резонанс, см., например, *Rabani et al.*, 2018, 'Conformational switch of the bacterial adhesin FimH in the absence of the regulatory domain: Engineering a minimalistic allosteric system' *J. Biol. Chem.*, 293(5):1835-1849, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

«**Нативный FimH**» обозначает или включает FimH дикого типа, в частности, FimH дикого типа, из которого имеет происхождение домен (а) полипептида согласно настоящему изобретению (возможно с удаленной нативной N-концевой секреторной последовательностью). В качестве альтернативы или дополнительно, указанный термин обозначает или включает FimH *E. coli* J96 (например, SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2), FimH *E. coli* UPEC 536 (например, SEQ ID NO: 100 или SEQ ID NO: 101), FimH *E. coli* CFT073 (например, SEQ ID NO: 102 или SEQ ID NO: 103), FimH *E. coli* 789 (например, SEQ ID NO: 104 или SEQ ID NO: 105), FimH *E. coli* IHЕ3034 (например, SEQ ID NO: 106 или SEQ ID NO: 107). В частности, настоящее изобретение включает FimH в высокоаффинной конформации, релаксированном (R) состоянии (см. выше).

«**Нативный FimC**» обозначает или включает FimC дикого типа (возможно с удаленной природной N-концевой секреторной последовательностью). В качестве альтернативы или дополнительно, указанный термин обозначает или включает FimC *E. coli* J96, FimC UPEC 536, FimC *E. coli* CFT073, FimC *E. coli* 789, FimC *E. coli* IHЕ3034.

«**FimH в комплексе с природным FimC**» и «**комплекс FimHC**» обозначают или включают FimH, связанный с FimC, который обнаруживают в периплазме бактерий, естественным образом экспрессирующих FimH и FimC, с применением способа и/или условий, описанных в настоящем документе в разделе «Примеры», способа и/или условий, описанных в (a) D. Choudhury, X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 285, 1061–1066 (1999), (b) C.-S. Hung, Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection. *Mol. Microbiol.* 44, 903–915 (2002), (c) I. Le Trong, Structural basis for mechanical force regulation of the adhesin FimH via finger trap-like β sheet twisting. *Cell* 141, 645–655 (2010), (d) G. Phan, Crystal structure of the FimD usher bound to its cognate FimC–FimH substrate. *Nature* 474, 49–53 (2011) или (e) S. Geibel, Structural and energetic basis of folded-protein transport by the FimD usher. *Nature* 496, 243–246 (2013).

В качестве альтернативы или дополнительно, иммуногенность полипептида против FimH на по меньшей мере 20% выше, чем таковая для нативного FimH в комплексе с нативным FimC (в частности, настоящее изобретение включает FimH в высокоаффинной конформации, релаксированном (R) состоянии (см. выше)), например на по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% или 500% выше. Иммуногенность может быть определена любым подходящим способом, известным в данной области техники, например методами ELISA или Luminox

(см. раздел «Примеры»).

В качестве альтернативы или дополнительно, аутоагрегация, индуцированная полипептидом, на по меньшей мере 20% ниже, чем таковая для нативного FimH, например на по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% ниже.

«Аутоагрегация, индуцированная полипептидом, на по меньшей мере X% ниже, чем таковая для нативного FimH» (где «X» представляет собой число от 20 до 100), обозначает или включает то, что полипептид, при экспрессии его бактериями вместо нативного FimH, индуцирует аутоагрегацию бактерий, которая на по меньшей мере X% ниже, чем аутоагрегация в остальном эквивалентных бактерий, экспрессирующих эквивалентный нативный FimH. **«Эквивалентный нативный FimH»** обозначает или включает FimH, являющийся нативным для используемых в исследовании бактерий, нативный FimH, из которого имеет происхождение полипептид согласно настоящему изобретению, и/или нативный FimH, с которым полипептид согласно настоящему изобретению имеет наибольшую идентичность последовательности. Для определения степени аутоагрегации могут быть использованы любые подходящие средства, известные в данной области техники, но в одном воплощении применяют способ, описанный в Schembri, Christiansen and Klemm, 2001, 'FimH-mediated autoaggregation of Escherichia coli' *Molecular Microbiology*, 41(6), 1419–1430, который включен в настоящий документ посредством ссылки; или Thomas *et al.*, 2002, 'Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force' *Cell*, 109(7):913-23, который включен в настоящий документ посредством ссылки; или Hartman *et al.*, 2012, 'Inhibition of bacterial adhesion to live human cells: Activity and cytotoxicity of synthetic mannosides' *FEBS Letters*, 586(10): 1459-1465, который включен в настоящий документ посредством ссылки; или Falk *et al.*, 1995, 'Chapter 9: Bacterial Adhesion and Colonization Assays' *Meth. Cell, Biol.*, 45:165-192, который включен в настоящий документ посредством ссылки; или Zanaboni *et al.*, 2016, 'A novel high-throughput assay to quantify the vaccine-induced inhibition of Bordetella pertussis adhesion to airway epithelia' *BMC Microbiol.*, 16:a215, который включен в настоящий документ посредством ссылки. В качестве альтернативы или дополнительно, адгезию бактерий определяют посредством анализа ВАИ следующим образом (кратко): штаммы UPEC, сконструированные для экспрессии флуоресцентного маркера mCherry, инкубируют в течение 30 мин с монослоями клеток SV-HUC-1 в 96-луночных планшетах в присутствии специфичных сывороток, полученных против производных FimH, или положительных/отрицательных контролей. После

осуществления адгезии клетки тщательно промывают для удаления несвязавшихся бактерий и фиксируют с помощью формальдегида. Наконец, регистрируют ассоциированный с адгезированными бактериями специфический флуоресцентный сигнал с использованием автоматизированного микроскопа для многопараметрического скрининга (Opera Phenix) и количественно оценивают с помощью программного обеспечения Harmony.

В качестве альтернативы или дополнительно, полипептид способен ингибировать адгезию бактерий на по меньшей мере 20%, например на по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или на 100%.

«Ингибирование адгезии бактерий» обозначает или включает адгезию, определенную опосредованно по подвижности бактерий или с помощью анализа(ов) адгезии бактерий, описанного(ых) выше (например, с помощью анализа ВАИ) и/или в разделе «Примеры» настоящего документа.

В качестве альтернативы или дополнительно, полипептид способен ингибировать гемагглютинацию эритроцитов морской свинки в по меньшей мере 2 раза, например в по меньшей мере 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз.

«Ингибирование гемагглютинации» обозначает или включает ингибирование гемагглютинации, определенное с помощью анализа ингибирования гемагглютинации (НАИ), описанного в Hultgren et al, Infect Immun 1986, 54, 613-620 и Jarvis C et al, ChemMedChem 2016, 11, 367-373 и/или в разделе «Примеры».

В качестве альтернативы или дополнительно, полипептид является растворимым, что означает или включает то, что по меньшей мере 50% масс./масс. полипептида (например, присутствующего в смеси и/или экспрессируемого клеткой) находится в растворимой форме, например по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% полипептида находится в растворимой форме.

Во втором аспекте настоящего изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид в соответствии с первым аспектом, например ДНК или РНК.

В качестве альтернативы или дополнительно, нуклеиновая кислота была оптимизирована по кодонам для экспрессии в выбранной прокариотической или эукариотической клетке, например клетке дрожжей (например, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), клетке насекомого (например, клетках Sf21 или клетках Sf9 *Spodoptera frugiperda*) или клетке млекопитающего (Expi293, Expi293GNTI (Life Technologies),

клетках яичника китайского хомячка (СНО) и эмбриональных клетках почки человека 293 (НЕК 293)). Под «**оптимизированным по кодонам**» подразумевается модификация применительно к частоте использования кодона, которая может увеличить эффективность трансляции и/или период полужизни нуклеиновой кислоты. Таблицы частоты использования/оптимизации кодонов для многих организмов хорошо известны и являются общедоступными (как представлено, например, в Athey et al. 2017 BMC Bioinf. 18:391). Оптимизация кодонов может быть выполнена с использованием любых подходящих способов, известных в данной области техники, например с помощью метода, разработанного компанией GeneArt.

В качестве альтернативы или дополнительно, нуклеиновая кислота содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, которая соответствует:

- (1) SEQ ID NO: 45, или ее варианту и/или фрагменту,
- (2) SEQ ID NO: 46, или ее варианту и/или фрагменту,
- (3) SEQ ID NO: 47, или ее варианту и/или фрагменту,
- (4) SEQ ID NO: 48, или ее варианту и/или фрагменту,
- (5) SEQ ID NO: 49, или ее варианту и/или фрагменту,
- (6) SEQ ID NO: 50, или ее варианту и/или фрагменту,
- (7) SEQ ID NO: 51, или ее варианту и/или фрагменту,
- (8) SEQ ID NO: 52, или ее варианту и/или фрагменту,
- (9) SEQ ID NO: 53, или ее варианту и/или фрагменту,
- (10) SEQ ID NO: 54, или ее варианту и/или фрагменту,
- (11) SEQ ID NO: 55, или ее варианту и/или фрагменту,
- (12) SEQ ID NO: 56, или ее варианту и/или фрагменту,
- (13) SEQ ID NO: 57, или ее варианту и/или фрагменту,
- (14) SEQ ID NO: 58, или ее варианту и/или фрагменту,
- (15) SEQ ID NO: 59, или ее варианту и/или фрагменту,
- (16) SEQ ID NO: 60, или ее варианту и/или фрагменту,
- (17) SEQ ID NO: 61, или ее варианту и/или фрагменту,
- (18) SEQ ID NO: 62, или ее варианту и/или фрагменту,
- (19) SEQ ID NO: 63, или ее варианту и/или фрагменту,
- (20) SEQ ID NO: 64, или ее варианту и/или фрагменту,
- (21) SEQ ID NO: 65, или ее варианту и/или фрагменту,
- (22) SEQ ID NO: 66, или ее варианту и/или фрагменту,

- (23) SEQ ID NO: 67, или ее варианту и/или фрагменту,
- (24) SEQ ID NO: 68, или ее варианту и/или фрагменту,
- (25) SEQ ID NO: 69, или ее варианту и/или фрагменту,
- (26) SEQ ID NO: 70, или ее варианту и/или фрагменту,
- (27) SEQ ID NO: 71, или ее варианту и/или фрагменту,
- (28) SEQ ID NO: 72, или ее варианту и/или фрагменту,
- (29) SEQ ID NO: 73, или ее варианту и/или фрагменту,
- (30) SEQ ID NO: 74, или ее варианту и/или фрагменту,
- (31) SEQ ID NO: 75, или ее варианту и/или фрагменту,
- (32) SEQ ID NO: 76, или ее варианту и/или фрагменту,
- (33) SEQ ID NO: 77, или ее варианту и/или фрагменту,
- (34) SEQ ID NO: 90, или ее варианту и/или фрагменту,
- (35) SEQ ID NO: 91, или ее варианту и/или фрагменту,
- (36) SEQ ID NO: 92, или ее варианту и/или фрагменту,
- (37) SEQ ID NO: 93, или ее варианту и/или фрагменту,
- (38) SEQ ID NO: 94, или ее варианту и/или фрагменту,
- (39) SEQ ID NO: 95, или ее варианту и/или фрагменту,
- (40) SEQ ID NO: 96, или ее варианту и/или фрагменту,
- (41) SEQ ID NO: 97, или ее варианту и/или фрагменту,
- (42) SEQ ID NO: 98, или ее варианту и/или фрагменту, и
- (43) SEQ ID NO: 99, или ее варианту и/или фрагменту.

Специалисту в данной области техники сразу будет понятно, что в случаях, когда нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению представляет собой РНК, Т заменен на U в последовательностях нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению (например, SEQ ID NO: 45-99).

В третьем аспекте настоящего изобретения предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту согласно второму аспекту. В качестве альтернативы или дополнительно, вектор представляет собой плазмиду, например экспрессионную плазмиду. В качестве альтернативы или дополнительно, плазида выбрана из группы, состоящей из pCDNA3.1 (Life Technologies), pCDNA3.4 (Life Technologies), pFUSE, pBROAD, pSEC, pCMV, pDSG-IBA и pHEK293 Ultra и тому подобного. В качестве альтернативы или дополнительно, плазида является подходящей для экспрессии в бактериальных клетках-хозяевах и выбрана из группы, состоящей из pACYCDuet-1,

pTrcHis2A, pET21, pET15TEV, pET22b+, pET303/CT-HIS, pET303/CT, pBAD/Myc-His A, pET303, pET24b(+) и тому подобного.

В качестве альтернативы или дополнительно, вектор представляет собой вирусный вектор, например РНК-содержащий вирусный вектор. В качестве альтернативы или дополнительно, вирусный вектор выбран из группы, состоящей из аденовирусных векторов и CHAD.

В четвертом аспекте настоящего изобретения предложена клетка, например клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту согласно второму аспекту или вектор согласно третьему аспекту.

Подходящие клетки-хозяева млекопитающих известны в данной области техники. В качестве альтернативы или дополнительно, клетка не обладает активностью N-ацетилглюкозаминилтрансферазы I (GnTI). В качестве альтернативы или дополнительно, клетка выбрана из группы, состоящей из Expi293, Expi293GNTI (Life Technologies), клеток яичника китайского хомячка (CHO), клеток NIH-3T3, клеток 293-T, клеток Vero, клеток HeLa, клеток PERC.6 (депонированных в ECACC (Европейской коллекции клеточных культур животных) под номером 96022940), клеток Hep G2, MRC-5 (CCL-171 в ATCC (Американской коллекции типовых культур)), WI-38 (CCL-75 в ATCC), фетальных клеток легкого макака-резус (CL-160 в ATCC), клеток почки быка Madin-Darby («MDBK»), клеток почки собаки Madin-Darby («MDCK») (например, MDCK (NBL2), CCL34 в ATCC; или MDCK 33016, DSM ACC 2219), клеток почки новорожденного хомяка (ВНК), таких как клетки ВНК21-F, клеток НКСС, эмбриональных клеток почки человека 293 (HEK 293) и т.п.

Подходящие бактериальные клетки-хозяева известны в данной области техники. Примеры бактериальных клеток-хозяев включают любые из следующих клеток и их производных: клетки *Escherichia coli* штаммов BL21(DE3), HMS174 (DE3), Origami 2 (DE3), BL21DE3T1r или T7 Shuffle Express.

В пятом аспекте настоящего изобретения предложен способ получения полипептида, определенного в первом аспекте, посредством экспрессии белка в клетке, определенной в четвертом аспекте.

В шестом аспекте настоящего изобретения предложена вакцина, содержащая полипептид, определенный в первом аспекте, нуклеиновую кислоту, определенную во втором аспекте, и/или вектор, определенный в третьем аспекте. В качестве альтернативы или дополнительно, вакцина содержит адъювант.

В одном воплощении вакцина согласно настоящему изобретению содержит полипептид, определенный в первом аспекте, и адъювант, содержащий любой из: 3D-MPL (3-деацелированного монофосфорилированного липида А), QS21 и липосом, например липосом, содержащих холестерин. В другом воплощении вакцина согласно настоящему изобретению содержит полипептид, определенный в первом аспекте, и адъювант, содержащий 3D-MPL, QS21 и липосомы, содержащие холестерин.

Авторами настоящего изобретения неожиданно было обнаружено, что вакцины, которые содержат адъювант, содержащий 3D-MPL, QS21 и липосомы, содержащие холестерин, такой как адъювант AS01, могут вызывать улучшенный иммунный ответ. **«Улучшенный иммунный ответ»** означает или включает повышенный уровень иммуноглобулина G (IgG) в сыворотке и/или в моче животного, такого как мыши, иммунизированного указанной вакциной, относительно уровня IgG в сыворотке и/или в моче животного, такого как мыши, иммунизированного эталонной вакциной. **«Повышенный уровень IgG в сыворотке и/или в моче»** обозначает или включает клетки повышение в по меньшей мере 2 раза, например в по меньшей мере 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз или 50 раз. Указанная эталонная или контрольная вакцина не содержит адъюванта, содержащего 3D-MPL, QS21 и липосомы, содержащие холестерин; например, указанная эталонная или контрольная вакцина содержит адъювант PHAD.

Авторами настоящего изобретения также неожиданно было обнаружено, что вакцины, содержащие полипептид, определенный в первом аспекте, и адъювант, содержащий 3D-MPL, QS21 и липосомы, содержащие холестерин, такой как адъювант AS01, способны вызывать защитный иммунный ответ после одной или двух доз.

Иммуногенные композиции (например, вакцины) будут фармацевтически приемлемыми. Они, как правило, будут содержать компоненты в дополнение к антигенам, например обычно они содержат один или более фармацевтических носителей, эксципиентов и/или адъювантов. Подробное обсуждение носителей и эксципиентов доступно в *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30, который включен в настоящий документ посредством ссылки. Подробные обсуждения адъювантов для вакцин доступны в *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X); и *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Т. 42 издания *Methods in Molecular Medicine*), ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan, которые включены в настоящий

документ посредством ссылки.

Композиции, как правило, будут введены млекопитающему в водной форме. Однако до введения композиция может находиться в неводной форме. Например, несмотря на то, что некоторые вакцины получают в водной форме, затем их разливают, распространяют и вводят также в водной форме, другие вакцины лиофилизируют в процессе получения и восстанавливают в водную форму во время применения. Таким образом, композиция согласно настоящему изобретению может быть высушена, например может представлять собой лиофилизированный состав. Композиция может содержать консерванты, такие как тиомерсал или 2-феноксиэтанол. Однако предпочтительно, чтобы вакцина по существу не содержала (то есть содержала менее 5 мкг/мл) ртутных веществ, например не содержала тиомерсала. Более предпочтительны вакцины, не содержащие ртути. Особенно предпочтительны вакцины, не содержащие консервантов. Для повышения термостабильности композиция может содержать термозащитный агент.

Для контроля тоничности предпочтительно включение физиологической соли, такой как натриевая соль. Предпочтительным является хлорид натрия (NaCl), который может присутствовать в количестве от 1 до 20 мг/мл, например приблизительно 10 ± 2 мг/мл NaCl. Другие соли, которые могут присутствовать, включают хлорид калия, дигидрофосфат калия, дегидрат динатрия фосфата, хлорид магния, хлорид кальция и т.д.

Композиции, как правило, будут иметь осмоляльность от 200 мОсм/кг до 400 мОсм/кг, предпочтительно 240-360 мОсм/кг и более предпочтительно в диапазоне 290-310 мОсм/кг.

Композиции могут содержать один или более буферов. Типичные буферы включают: фосфатный буфер; трис-буфер; боратный буфер; сукцинатный буфер; гистидиновый буфер (в частности, с адьювантом гидроксидом алюминия); или цитратный буфер. Буферы, как правило, будут включены в диапазоне 5-20 мМ.

pH композиции, как правило, будет составлять от 5,0 до 8,1 и более типично от 6,0 до 8,0, например от 6,5 до 7,5 или от 7,0 до 7,8.

Предпочтительно композиция является стерильной. Предпочтительно композиция является апиrogenной, например содержит менее 1 EU (единиц эндотоксина, стандартная мера) на дозу и предпочтительно менее 0,1 EU на дозу. Предпочтительно композиция не содержит глютена.

Композиция может содержать материал для однократной иммунизации, или

может содержать материал для многократных иммунизаций (то есть «многодозовый» набор). Включение консерванта является предпочтительным в случае многодозовых вариантов. В качестве альтернативы (или в дополнение к) включению консерванта в многодозовые композиции, эти композиции могут содержаться в контейнере, имеющем асептический адаптер для извлечения материала.

Вакцины для применения у человека обычно вводят в объеме приблизительно 0,5 мл, хотя детям может быть введена половина дозы (то есть приблизительно 0,25 мл).

Иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению также могут содержать один или более иммунорегулирующих агентов. Предпочтительно указанные один или более иммунорегулирующих агентов содержат один или более адъювантов.

Адъюванты

Вакцины и иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению также могут содержать адъювант в дополнение к антигену. Адъюванты используют в вакцинах для усиления и модулирования иммунного ответа на антиген. Адъюванты, описанные в настоящем документе, можно комбинировать с любым(и) из антигенов, описанных в настоящем документе.

Адъювант может представлять собой любой адъювант, известный специалисту в данной области техники, но адъюванты включают (без ограничения ими) эмульсии типа «масло-в-воде» (например, MF59 или AS03), липосомы, сапонины, агонисты TLR2 (Toll-подобный рецептор 2), агонисты TLR3, агонисты TLR4, агонисты TLR5, агонисты TLR6, агонисты TLR7, агонисты TLR8, агонисты TLR9, соли алюминия, наночастицы, микрочастицы, иммуностимулирующие комплексы (ISCOM), композиты фторида кальция и органических соединений или их комбинации.

Эмульсии типа «масло-в-воде»

В одном из воплощений настоящего изобретения предложена вакцина или иммуногенная композиция для применения в изобретении, содержащая эмульсию типа «масло-в-воде». Эмульсии типа «масло-в-воде» согласно настоящему изобретению содержат метаболизируемое масло и эмульгирующий агент. Для того, чтобы любая композиция типа «масло-в-воде» была подходящей для введения человеку, масляная фаза эмульсионной системы должна содержать метаболизируемое масло. Значение термина «метаболизируемое масло» хорошо известно в данной области техники. «Метаболизируемый» может быть определен как «способный быть трансформированным посредством метаболизма» (Dorland's Illustrated Medical

Dictionary, W.B. Sanders Company, 25th edition, 1974). Особенно подходящим метаболизируемым маслом является сквален. Сквален (2,6,10,15,19,23-гексаметил-2,6,10,14,18,22-тетракозагексаен) представляет собой ненасыщенное масло, которое обнаруживают в больших количествах в жире печени акулы и в меньших количествах в оливковом масле, масле зародышей пшеницы, масле из рисовых отрубей и дрожжах, и оно является особенно предпочтительным маслом для применения в эмульсии типа «масло-в-воде» согласно настоящему изобретению. Сквален является метаболизируемым масляным компонентом, поскольку он представляет собой промежуточное звено в биосинтезе холестерина (Merck index, 10th Edition, entry no. 8619). В некоторых воплощениях, где вакцины или иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению содержат эмульсию типа «масло-в-воде», метаболизируемое масло присутствует в вакцине или в иммуногенной композиции в количестве от 0,5% до 10% (об./об.) от общего объема композиции. Эмульсия типа «масло-в-воде» дополнительно содержит эмульгирующий агент. Эмульгирующий агент подходящим образом может представлять собой моноолеат полиоксиэтиленсорбитана (POLYSORBATE 80). Кроме того, указанный эмульгирующий агент подходящим образом присутствует в вакцине или иммуногенной композиции в количестве от 0,125 до 4% (об./об.) от общего объема композиции. Эмульсия типа «масло-в-воде» может содержать токол. Токолы хорошо известны в данной области техники и описаны в EP0382271 B1. Подходящим образом, токол может представлять собой альфа-токоферол или его производное, такое как сукцинат альфа-токоферола (также известный как сукцинат витамина E). Указанный токол подходящим образом присутствует в содержащей адъювант композиции в количестве от 0,25% до 10% (об./об.) от общего объема иммуногенной композиции. Эмульсия типа «масло-в-воде» также может содержать триолеат сорбитана (SPAN 85).

Способ получения эмульсий типа «масло-в-воде» хорошо известен специалистам в данной области техники. Как правило, способ включает смешивание масляной фазы (возможно содержащей токол) с поверхностно-активным веществом, таким как раствор PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор)/TWEEN80, с последующей гомогенизацией с использованием гомогенизатора; специалисту в данной области техники будет понятно, что способ, включающий двукратное пропускание смеси через иглу шприца, подходит для гомогенизации небольших объемов жидкости. Аналогичным образом, специалист в данной области техники может адаптировать процесс

эмульгирования в микрофлюидизаторе (например, в приборе M110S от компании Microfluidics, максимально 50 прогонов, в течение 2 минут при максимальном давлении на входе 6 бар (давление на выходе приблизительно 850 бар)) для получения меньших или больших объемов эмульсии. Адаптация может быть обеспечена с помощью рутинных экспериментов, включающих определение характеристик готовой эмульсии, до тех пор, пока не будет получен препарат с каплями масла требуемого диаметра.

В эмульсии типа «масло-в-воде» масло и эмульгатор должны находиться в водном носителе. Водный носитель может представлять собой, например, забуференный фосфатом физиологический раствор или цитрат. В частности, эмульсионные системы типа «масло-в-воде», применяемые в настоящем изобретении, характеризуются небольшим размером капель масла в субмикронном диапазоне. Подходящим образом, размеры капель будут находиться в диапазоне от 120 до 750 нм, более конкретно размеры будут составлять от 120 до 600 нм в диаметре. Еще более конкретно эмульсия типа «масло-в-воде» содержит капли масла, из которых по меньшей мере 70% из расчета на интенсивность имеют диаметр менее 500 нм, более конкретно по меньшей мере 80% из расчета на интенсивность имеют диаметр менее 300 нм, более конкретно по меньшей мере 90% из расчета на интенсивность имеют диаметр в диапазоне от 120 до 200 нм.

Размер капель масла, то есть диаметр, в соответствии с настоящим изобретением определяют по интенсивности. Существует несколько способов определения диаметра капель масла по интенсивности. Интенсивность измеряют с помощью анализатора размеров, подходящим образом методом динамического рассеяния света, такого как Malvern Zetasizer 4000 или предпочтительно Malvern Zetasizer 3000HS. Первая возможность заключается в определении z-среднего диаметра (ZAD) методом динамического рассеяния света (PCS – фотонная корреляционная спектроскопия); этот метод дополнительно дает индекс полидисперсности (PDI), и оба параметра ZAD и PDI рассчитывают с помощью кумулянтного алгоритма. Эти значения не требуют знания показателя преломления частиц. Второй способ заключается в расчете диаметра капли масла путем определения полного распределения частиц по размерам с помощью другого алгоритма, либо Contin, либо NNLS, либо автоматического алгоритма «Malvern» (алгоритм по умолчанию, обеспеченный в анализаторе размеров). В большинстве случаев, поскольку показатель преломления частиц сложной композиции неизвестен, то принимают во внимание только распределение интенсивности и, при необходимости, среднее значение интенсивности, возникающее из этого распределения.

ISCOM

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложены вакцины или иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению, содержащие ISCOM. ISCOM хорошо известны в данной области техники (см. Kersten & Crommelin, 1995, *Biochimica et Biophysica Acta* 1241: 117-138). ISCOM содержат сапонин, холестерин и фосфолипиды и образуют структуру наподобие открытой клетки, обычно размером приблизительно 40 нм. ISCOM образуются в результате взаимодействия сапонинов, холестерина и других фосфолипидов. Типичная реакционная смесь для получения ISCOM содержит 5 мг/мл сапонины и по 1 мг/мл холестерина и фосфолипида. Фосфолипиды, подходящие для применения в ISCOM, включают, без ограничения, фосфохолин (дидеканоил-L- α -фосфатидилхолин [DDPC], дилауроилфосфатидилхолин [DLPC], димиристоилфосфатидилхолин [DMPC], дипальмитоилфосфатидилхолин [DPPC], дистеароилфосфатидилхолин [DSPC], диолеоилфосфатидилхолин [DOPC], 1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилхолин [POPC], диэлаидоилфосфатидилхолин [DEPC]), фосфоглицерин (1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоглицерин [DMPG], 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоглицерин [DPPG], 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоглицерин [DSPG], 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфоглицерин [POPG]), фосфатидную кислоту (1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфатидную кислоту [DMPA], дипальмитоилфосфатидную кислоту [DPPA], дистеароилфосфатидную кислоту [DSPA]), фосфоэтанолламин (1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин [DMPE], 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин [DPPE], 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин [DSPE], 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин [DOPE]), фосфосерин, полиэтиленгликоль[PEG]-фосфолипид (mPEG-фосфолипид, полиглицеринфосфолипид, функционализированный фосфолипид, концевой активированный фосфолипид). В конкретных воплощениях ISCOM содержат 1-пальмитоил-2-олеоилглицеро-3-фосфоэтанолламин. В других конкретных воплощениях применяют высокоочищенный фосфатидилхолин, который может быть выбран из группы, состоящей из: фосфатидилхолина (из яйца), гидрогенизированного фосфатидилхолина (из яйца), фосфатидилхолина (из сои), гидрогенизированного фосфатидилхолина (из сои). В дополнительных конкретных воплощениях ISCOM содержат фосфатидилэтанолламин [POPE] или его производное. Ряд сапонинов является подходящим для применения в ISCOM. Адьювантная и гемолитическая активность отдельных сапонинов была широко изучена в данной области техники. Например, Quil

А (полученный из коры южноамериканского дерева *Quillaja Saponaria* Molina) и его фракции описаны в US 5057540 и \ "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.*, 1996, 12 (1-2): 1-55; и EP0362279 B1. ISCOM, содержащие фракции Quil A, использовали в производстве вакцин (EP0109942 B1). Сообщалось, что эти структуры обладают адьювантной активностью (EP0109942 B1; WO 96/11711). Фракции Quil A, производные Quil A и/или их комбинации являются подходящими препаратами сапонины для применения в ISCOM. Гемолитические сапонины QS21 и QS17 (фракции Quil A, очищенные посредством HPLC (высокоэффективной жидкостной хроматографии)) были описаны как эффективные адьюванты, и способ их получения раскрыт в US 5057540 и EP0362279 B1. В этих документах также описано применение QS7 (негемолитическая фракция Quil A), который действует как эффективный адьювант в системных вакцинах. Применение QS21 дополнительно описано в Kensil *et al.* (1991. *J. Immunology* vol 146, 431-437). Также известны комбинации QS21 и полисорбата или циклодекстрина (WO 99/10008). Системы адьювантов в виде частиц, содержащие фракции Quil A, такие как QS21 и QS7, описаны в WO 96/33739 и WO 96/11711, включенных в настоящее описание. Другие конкретные фракции Quil A, обозначенные как QH-A, QH-B, QH-C, и смесь QH-A и QH-C, обозначенная как QH-703, раскрыты в WO 96/011711 в форме ISCOM и включены в настоящее описание.

Микрочастицы

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложена вакцина или иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению, содержащая микрочастицы. Микрочастицы, композиции, содержащие микрочастицы, и способы получения микрочастиц хорошо известны в данной области техники (см. Singh *et al.* [2007 *Expert Rev. Vaccines* 6(5): 797-808] и WO 98/033487). В настоящем документе термин «микрочастица» относится к частице диаметром или длиной от приблизительно 10 нм до приблизительно 10000 мкм, полученной из полимерных материалов, которые имеют различные молекулярные массы и, в случае сополимеров, таких как PLG (полилактид-ко-гликолид), различные соотношения лактид:гликолид. В частности, микрочастицы будут иметь диаметр, который позволяет осуществлять парентеральное введение субъекту без закупорки устройства для введения и/или капилляров субъекта. Микрочастицы также известны как микросферы. Размер микрочастиц легко определяют посредством методик, хорошо известных в данной области техники, таких как фотонная корреляционная спектроскопия, лазерная дифрактометрия и/или сканирующая

электронная микроскопия. Микрочастицы для применения в настоящем изобретении будут сформированы из материалов, которые являются стерилизуемыми, нетоксичными и биоразлагаемыми. Такие материалы включают, без ограничения, поли(α -гидроксикислоту), полигидроксимасляную кислоту, поликапролактон, полиортоэфир, полиангидрид.

Липосомы

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложена вакцина или иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению, содержащая липосомы. Термин «липосомы» обычно относится к одно- или многослойным (в частности, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9- или 10-слойным, в зависимости от количества образующихся липидных мембран) липидным структурам, в которые заключена внутренняя водная фаза. Липосомы и липосомные композиции хорошо известны в данной области техники. Липиды, способные образовывать липосомы, включают все вещества, обладающие жирными или жироподобными свойствами. Липиды, которые могут составлять липидную фазу в липосомах, могут быть выбраны из группы, включающей глицериды, глицерофосфолипиды, глицерофосфинолипиды, глицерофосфонолипиды, сульфолипиды, сфинголипиды, фосфолипиды, изопренолипиды, стероиды, стеарины, стерины, археолипиды, синтетические катионные липиды и липиды, содержащие углеводы. Размер липосом может варьировать от 30 нм до нескольких мкм в зависимости от состава фосфолипидов и способа, используемого для их получения. В конкретных воплощениях настоящего изобретения размер липосомы будет находиться в диапазоне от 50 нм до 500 нм, а в других воплощениях – от 50 нм до 200 нм. Динамическое рассеяние лазерного излучения представляет собой метод, используемый для определения размера липосом, хорошо известный специалистам в данной области техники. Липосомы подходящим образом содержат нейтральный липид, например фосфатидилхолин, который подходящим образом не является кристаллическим при комнатной температуре, например фосфатидилхолин яичного желтка, диолеоилфосфатидилхолин (DOPC) или дилаурилфосфатидилхолин. В конкретном воплощении липосомы согласно настоящему изобретению содержат DOPC. Липосомы также могут содержать заряженный липид, который повышает стабильность структуры липосома-сапонин для липосом, состоящих из насыщенных липидов. В этих случаях количество заряженного липида подходящим образом составляет от 1 до 20% (масс./масс.), предпочтительно от 5 до 10%. Отношение стерина к фосфолипиду

составляет от 1 до 50% (моль/моль), предпочтительно от 20 до 25% (моль/моль).

Сапонины

В некоторых воплощениях настоящего изобретения вакцина или иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению содержит сапонин. В частности, подходящим сапонином для применения в настоящем изобретении является Quil A и его производные. Quil A представляет собой препарат сапонины, выделенный из южноамериканского дерева *Quillaja Saponaria* Molina, и он был впервые описан в Dalsgaard *et al.* в 1974 году ("Saponin adjuvants", *Archiv. für die gesamte Virusforschung*, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p243-254) как обладающий адьювантной активностью. Посредством HPLC были выделены очищенные фрагменты Quil A, которые сохраняют адьювантную активность без токсичности, ассоциированной с Quil A (EP0362278), например QS7 и QS21 (также известные как QA7 и QA21). QS21 представляет собой природный сапонин, полученный из коры *Quillaja saponaria* Molina, который индуцирует CD8+ цитотоксические Т-клетки (CTL), клетки Th1 и гуморальный иммунный ответ с преобладанием IgG2a и является особым сапонином в контексте настоящего изобретения. Сапониновый адьювант в составе иммуногенных композиций согласно настоящему изобретению представляет собой, в частности, иммунологически активные фракции Quil A, такие как QS7 или QS21, подходящим образом QS21. В конкретных воплощениях вакцины и/или иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению содержат иммунологически активную фракцию сапонины в по существу чистой форме. В частности, вакцины или иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению содержат QS21 в по существу чистой форме, то есть QS21 имеет чистоту по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, например чистоту по меньшей мере 95% или чистоту по меньшей мере 98%.

В конкретном воплощении QS21 обеспечивают с экзогенным стеринем, таким как, например, холестерин. Подходящие стеринны включают β -ситостерин, стигмастерин, эргостерин, эргокальциферол и холестерин. В еще одном конкретном воплощении содержащая адьювант композиция содержит холестерин в качестве стерина. Эти стеринны хорошо известны в данной области техники, например холестерин раскрыт в Merck Index, 11th Edition, page 341 как природный стерин, обнаруженный в животном жире.

В одном воплощении липосомы согласно настоящему изобретению, содержащие

сапонин, подходящим образом содержат нейтральный липид, например фосфатидилхолин, который подходящим образом не является кристаллическим при комнатной температуре, например фосфатидилхолин яичного желтка, диолеилфосфатидилхолин (DOPC) или дилаурилфосфатидилхолин. Липосомы также могут содержать заряженный липид, который повышает стабильность структуры липосома-QS21 для липосом, состоящих из насыщенных липидов. В этих случаях количество заряженного липида подходящим образом составляет от 1 до 20% (масс./масс.), в частности, от 5 до 10% (масс./масс.). Отношение стерина к фосфолипиду составляет от 1 до 50% (моль/моль), предпочтительно от 20 до 25% (моль/моль).

В случае, когда активная фракция сапонины представляет собой QS21, соотношение QS21:стерин, как правило, будет составлять величину порядка от 1:100 до 1:1 (масс./масс.), подходящим образом от 1:10 до 1:1 (масс./масс.) и предпочтительно от 1:5 до 1:1 (масс./масс.). Если подходящим образом присутствует избыток стерина, то соотношение QS21:стерин составляет по меньшей мере 1:2 (масс./масс.). В одном воплощении соотношение QS21:стерин составляет 1:5 (масс./масс.). Стерин подходящим образом представляет собой холестерин.

Другие подходящие для применения сапонины получают из растений *Aesculus hippocastanum* или *Gyophilla struthium*. Другие сапонины, которые были описаны в литературе, включают эсцин, который был описан в Merck index (12th Edition: entry 3737) как смесь сапонинов, встречающихся в семенах конского каштана, лат.: *Aesculus hippocastanum*. Описано его выделение посредством хроматографии и очистки (Fiedler, *Arzneimittel-Forsch.* 4, 213 (1953)) и с использованием ионообменных смол (Erbring *et al.*, US 3238190). Фракции эсцина были очищены и демонстрировали биологическую активность (Yoshikawa *et al.*, 1996, *Chem Pharm Bull* (Tokyo), 44(8): 1454-1464). Сапоальбин из *Gypsophilla struthium* (R. Vochten *et al.*, 1968, *J. Pharm. Belg.* 42: p213-226) также был описан, например, применительно к получению ISCOM.

Сапонин, такой как QS21, можно применять в количествах от 1 до 100 мкг на каждую дозу содержащей адьювант композиции для человека. QS21 можно применять в количестве приблизительно 50 мкг, например от 40 до 60 мкг, подходящим образом от 45 до 55 мкг или от 49 до 51 мкг, или 50 мкг. В еще одном воплощении доза содержащей адьювант композиции для человека содержит QS21 в количестве приблизительно 25 мкг, например от 20 до 30 мкг, подходящим образом от 21 до 29 мкг или от 22 до 28 мкг или от 28 до 27 мкг или от 24 до 26 мкг, или 25 мкг.

Агонист TLR4

В некоторых воплощениях вакцина или иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению содержит агонист TLR4. «Агонист TLR» обозначает компонент, который способен вызывать сигнальный ответ посредством сигнального пути TLR либо в качестве непосредственного лиганда, либо опосредованно за счет образования эндогенного или экзогенного лиганда (Sabroe *et al*, 2003, *Jl* p1630-5). Агонист TLR4 способен вызывать сигнальный ответ посредством сигнального пути TLR4. Подходящим примером агониста TLR4 является липополисахарид, подходящим образом нетоксичное производное липида А, в частности монофосфориллипид А или, более конкретно, 3-деацилированный монофосфориллипид А (3D-MPL).

3D-MPL продается компанией GlaxoSmithKline Biologicals под названием MPL и упоминается в тексте настоящего документа как MPL или 3D-MPL. См., например, US 4436727; US 4877611; US 4866034 и US 4912094. 3D-MPL в первую очередь стимулирует ответы CD4+ Т-клеток, имеющих фенотип IFN-гамма (Th1). 3D-MPL может быть получен в соответствии со способами, раскрытыми в GB 2220211 А. По химическому составу 3D-MPL представляет собой смесь 3-деацилированного монофосфориллипид А с 4, 5 или 6 ацилированными цепями. В композициях согласно настоящему изобретению 3D-MPL в виде мелких частиц можно применять для получения водной содержащей адъювант композиции. 3D-MPL в виде мелких частиц имеет такой размер частиц, что он может быть стерильно отфильтрован через 0,22 мкм фильтр. Такие препараты описаны в WO 94/21292. Предпочтительно для получения водных содержащих адъювант композиций согласно настоящему изобретению применяют порошкообразный 3D-MPL.

Другие агонисты TLR4, которые можно применять, представляют собой алкилглюкозаминидфосфаты (AGP), такие как описанные в WO 98/50399 или US 6303347 (также раскрыты способы получения AGP), подходящим образом RC527 или RC529, или фармацевтически приемлемые соли AGP, раскрытые в US 6764840.

Другие подходящие агонисты TLR4 являются такими, как описано в WO 03/011223 и WO 03/099195, такими как соединение I, соединение II и соединение III, раскрытые на страницах 4-5 WO 03/011223 или на страницах 3-4 WO 03/099195, и, в частности, соединения, раскрытые в WO 03/011223, такие как ER803022, ER803058, ER803732, ER804053, ER804057m ER804058, ER804059, ER804442, ER804680 и ER804764. Например, один подходящий агонист TLR4 представляет собой ER804057.

Агонист TLR4, такой как липополисахарид, например 3D-MPL, можно применять в количествах от 1 до 100 мкг на дозу содержащей адьювант композиции для человека. 3D-MPL можно применять в количестве приблизительно 50 мкг, например от 40 до 60 мкг, подходящим образом от 45 до 55 мкг или от 49 до 51 мкг, или 50 мкг на дозу для человека. В еще одном воплощении доза содержащей адьювант композиции для человека содержит 3D-MPL в количестве приблизительно 25 мкг, например от 20 до 30 мкг, подходящим образом от 21 до 29 мкг или от 22 до 28 мкг или от 28 до 27 мкг или от 24 до 26 мкг, или 25 мкг.

Известны синтетические производные липида А, которые считаются агонистами TLR 4 и включают, без ограничения:

OM174 (2-дезоксиглюкопиранозил-2-[(R)-3-додеканоилокситетрадеканоиламино]-4-о-фосфоно-β-D-глюкопиранозил)-2-[(R)-3-гидрокситетрадеканоиламино]-α-D-глюкопиранозилдигидрофосфат), (WO 95/14026)

OM294 DP (3S,9R)-3-[(R)-додеканоилокситетрадеканоиламино]-4-оксо-5-аза-9(R)-[(R)-3-гидрокситетрадеканоиламино]декан-1,10-диол-1,10-бис(дигидрофосфат) (WO 99/64301 и WO 00/0462)

OM197 MP-Ac DP (3S,9R)-3-(R)-додеканоилокситетрадеканоиламино]-4-оксо-5-аза-9-[(R)-3-гидрокситетрадеканоиламино]декан-1,10-диол-1-дигидрофосфата 10-(6-аминогексаноат) (WO 01/46127)

PHAD (фосфорилированный гексаацилдисахарид)

Другие подходящие лиганды TLR4, способные вызывать сигнальный ответ посредством TLR4 (Sabroe *et al*, JI 2003 p1630-5), представляют собой, например, липополисахарид грамотрицательных бактерий и его производные или их фрагменты, в частности нетоксичное производное LPS (такое как 3D-MPL). Другие подходящие агонисты TLR представляют собой: белок теплового шока (HSP) 10, 60, 65, 70, 75 или 90; белок А сурфактанта, гиалуроновые олигосахариды, фрагменты гепарансульфата, фрагменты фибронектина, фибриногеновые пептиды и b-дефензин-2, мурамилдипептид (MDP) или белок F респираторно-синцитиального вируса (RSV). В одном воплощении агонист TLR представляет собой HSP 60, 70 или 90.

Агонисты TLR

Вместо агониста TLR4 в вакцинах или иммуногенных композициях согласно настоящему изобретению можно применять другие природные или синтетические агонисты молекул TLR. Они включают, без ограничения, агонисты TLR2, TLR3, TLR5,

TLR6, TLR7, TLR8 и TLR9.

В одном воплощении настоящего изобретения применяют агонист TLR, который способен вызывать сигнальный ответ посредством TLR1 (Sabroe *et al*, JI 2003, p1630-5). Подходящим образом, агонист TLR, способный вызывать сигнальный ответ посредством TLR1, выбран из: триацилированных липопептидов (LP); фенолорастворимого модулина; LP *Mycobacterium tuberculosis*; тригидрохлорида LP S-(2,3-бис(пальмитоилокси)-(2-RS)-пропил)-N-пальмитоил-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4)-OH (Pam3Cys), который имитирует ацетилованный N-конец бактериального липопротеина, и LP OspA из *Borrelia burgdorferi*.

В еще одном воплощении применяют агонист TLR, который способен вызывать сигнальный ответ посредством TLR2 (Sabroe *et al*, JI 2003, p1630-5). Подходящим образом, агонист TLR, способный вызывать сигнальный ответ посредством TLR2, представляет собой один или более из липопротеина, пептидогликана, бактериального липопептида из *M. tuberculosis*, *B. burgdorferi*, *T. pallidum*, пептидогликанов из видов, относящихся к *Staphylococcus aureus*, липотейхоевых кислот, маннуриновых кислот, поринов *Neisseria*, бактериальных фимбрий, факторов вирулентности *Yersinia*, вирионов CMV, гемагглютинаина вируса кори и зимозана из дрожжей.

В еще одном воплощении применяют агонист TLR, который способен вызывать сигнальный ответ посредством TLR3 (Sabroe *et al*, JI 2003, p1630-5). Подходящим образом, агонист TLR, способный вызывать сигнальный ответ посредством TLR3, представляет собой двухцепочечную РНК (dsРНК) или полиинозиновую-полицитидиловую кислоту (Poly IC), молекулярный паттерн нуклеиновой кислоты, ассоциированный с вирусной инфекцией.

В альтернативном воплощении применяют агонист TLR, который способен вызывать сигнальный ответ посредством TLR5 (Sabroe *et al*, JI 2003, p1630-5). Подходящим образом, агонист TLR, способный вызывать сигнальный ответ посредством TLR5, представляет собой бактериальный флагеллин. Указанный агонист TLR5 может представлять собой флагеллин или может представлять собой фрагмент флагеллина, который сохраняет активность агониста TLR5. Флагеллин может включать полипептид, выбранный из группы, состоящей из *H. pylori*, *S. typhimurium*, *V. cholera*, *S. marcescens*, *S. flexneri*, *T. pallidum*, *L. pneumophila*, *B. burgdorferi*, *C. difficile*, *R. meliloti*, *A. tumefaciens*; *R. lupine*; *B. clarridgeiae*, *P. mirabilis*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa* и *E. coli*.

В конкретном воплощении флагеллин выбран из группы, состоящей из

флагеллина В *S. typhimurium* (номер доступа в Genbank AF045151), фрагмента флагеллина В *S. typhimurium*, FliC *E. coli* (номер доступа в Genbank AB028476); фрагмента FliC *E. coli*; флагеллина FliC *S. typhimurium* (ATCC14028) и фрагмента флагеллина FliC *S. typhimurium*.

В еще одном конкретном воплощении указанный агонист TLR5 представляет собой укороченный флагеллин, описанный в WO 09/156405, то есть флагеллин, в котором был удален гипервариабельный домен. В одном аспекте этого воплощения указанный агонист TLR5 выбран из группы, состоящей из: FliC_{Δ174-400}; FliC_{Δ161-405} и FliC_{Δ138-405}.

В еще одном конкретном воплощении указанный агонист TLR5 представляет собой флагеллин, описанный в WO 09/128950. В еще одном воплощении применяют агонист TLR, который способен вызывать сигнальный ответ посредством TLR6 (Sabroe *et al*, JI 2003, p1630-5). Подходящим образом, агонист TLR, способный вызывать сигнальный ответ посредством TLR6, представляет собой липопротеин микобактерий, диацилированный LP и фенолорастворимый модулин. Дополнительные агонисты TLR6 описаны в WO 03/043572.

В еще одном воплощении применяют агонист TLR, который способен вызывать сигнальный ответ посредством TLR7 (Sabroe *et al*, JI 2003, p1630-5). Подходящим образом, агонист TLR, способный вызывать сигнальный ответ посредством TLR7, представляет собой одноцепочечную РНК (ssРНК), локсорибин, аналог гуанозина по положениям N7 и C8, или имидазохинолиновое соединение или его производное. В конкретном воплощении агонист TLR представляет собой имиквимод. Другие агонисты TLR7 описаны в WO 02/085905.

В еще одном воплощении применяют агонист TLR, который способен вызывать сигнальный ответ посредством TLR8 (Sabroe *et al*, JI 2003, p1630-5). Подходящим образом, агонист TLR, способный вызывать сигнальный ответ посредством TLR8, представляет собой одноцепочечную РНК (ssРНК), имидазохинолиновую молекулу с противовирусной активностью, например резиквимод (R848); резиквимод также способен распознаваться TLR7. Другие агонисты TLR8, которые можно применять, включают агонисты TLR8, описанные в WO 04/071459.

В еще одном воплощении применяют агонист TLR, который способен вызывать сигнальный ответ, такой как агонист TLR, содержащий CpG-мотив. Термин «иммуностимулирующий олигонуклеотид» в настоящем документе используется для

обозначения олигонуклеотида, который способен активировать компонент иммунной системы. В одном воплощении иммуностимулирующий олигонуклеотид содержит один или более неметилированных цитозин-гуанозиновых (CpG) мотивов. В еще одном воплощении иммуностимулирующий олигонуклеотид содержит один или более неметилированных тимидин-гуанозиновых (TG) мотивов или может быть T-обогащенным. «T-обогащенный» означает, что нуклеотидный состав олигонуклеотида содержит более 50, 60, 70 или 80% тимидина. В одном воплощении олигонуклеотид не является иммуностимулирующим олигонуклеотидом и не содержит неметилированного CpG-мотива. В другом воплощении иммуностимулирующий олигонуклеотид не является T-обогащенным и/или не содержит неметилированного TG-мотива.

Олигонуклеотид может быть модифицирован для улучшения стабильности *in vitro* и/или *in vivo*. Например, в одном воплощении олигонуклеотиды модифицированы таким образом, что они содержат фосфоротиоатный остов, то есть межнуклеотидные связи. Другие подходящие модификации, включая дифосфоротиоатные, фосфоамидатные и метилфосфонатные модификации, а также альтернативные межнуклеотидные связи с олигонуклеотидами, хорошо известны специалистам в данной области техники и охватываются настоящим изобретением.

В другом воплощении вакцины или иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению дополнительно содержат иммуностимулятор, выбранный из группы, состоящей из: агониста TLR1, агониста TLR2, агониста TLR3, агониста TLR4, агониста TLR5, агониста TLR6, агониста TLR7, агониста TLR8, агониста TLR9 или их комбинации.

Композиты кальция

В некоторых воплощениях вакцина или иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению содержит композит фторида кальция, содержащий Ca, F и Z. В настоящем документе «Z» относится к органической молекуле. В настоящем документе «композит» представляет собой вещество, которое существует в форме твердого вещества в сухом виде и который является нерастворимым или малорастворимым в чистой воде. В некоторых аспектах Z содержит функциональную группу, которая при ионизации образует анион. Такие функциональные группы включают, без ограничения, одну или более функциональных групп, выбранных из группы, состоящей из: гидроксил, гидроксилата, гидроксо, оксо, N-гидроксилата, гидроксамата, N-оксида, бикарбоната, карбоната, карбоксилата, жирной кислоты,

тиолата, органического фосфата, дигидрофосфата, моногидрофосфата, моноэфиров фосфорной кислоты, диэфиров фосфорной кислоты, сложных эфиров фосфолипида, фосфоротиоатов, сульфатов, гидросульфатов, енолята, аскорбата, фосфоаскорбата, фенолята и иминолята.

В некоторых аспектах композиты фторида кальция, описанные в настоящем документе, содержат Z, где Z представляет собой анионную органическую молекулу, обладающую аффинностью в отношении кальция и образующую не растворимый в воде композит с кальцием и фторидом. В других аспектах композиты фторида кальция, описанные в настоящем документе, содержат Z, где Z может быть классифицирован как содержащий элемент химической категории, выбранный из группы, состоящей из: гидроксила, гидроксилатов, гидроксо, оксо, N-гидроксилата, гидроксамата, N-оксида, бикарбонатов, карбонатов, карбоксилатов и дикарбоксилата, солей карбоновых кислот, солей QS21, экстракта коры *Quillaja saponaria*, экстракта иммунологически активного сапонины, солей насыщенных или ненасыщенных жирных кислот, солей олеиновой кислоты, солей аминокислот, тиолатов, тиолактата, солей тиоловых соединений, солей цистеина, солей N-ацетилцистеина, L-2-оксо-4-тиазолидинкарбоксилата, фосфатов, дигидрофосфатов, моногидрофосфата, солей фосфорных кислот, моноэфиров фосфорных кислот и их солей, диэфиров фосфорных кислот и их солей, эфиров 3-O-деацил-4'-монофосфориллипида A, сложных эфиров 3D-MLA, MPL, сложных эфиров фосфолипидов, DOPC, диолеолифосфатидных производных, фосфатов из CpG-мотивов, фосфоротиоатов из семейства CpG, сульфатов, гидросульфатов, солей серных кислот, енолятов, аскорбатов, фосфоаскорбата, фенолята, α -токоферола, иминолятов, цитозина, метилцитозина, урацила, тимина, барбитуровой кислоты, гипоксантина, инозина, гуанина, гуанозина, 8-оксоаденина, ксантина, мочевой кислоты, птероевой кислоты, птероилглутаминовой кислоты, фолиевой кислоты, рибофлавина и люмифлавина. В других аспектах композиты фторида кальция, описанные в настоящем документе, содержат Z, где Z выбран из группы, состоящей из: N-ацетилцистеина; тиолактата; адипата; карбоната; фолиевой кислоты; глутатиона; и мочевой кислоты. В некоторых аспектах композиты фторида кальция, описанные в настоящем документе, содержат Z, где Z выбран из группы, состоящей из: N-ацетилцистеина; адипата; карбоната; и фолиевой кислоты. В других аспектах композиты фторида кальция, описанные в настоящем документе, содержат Z, где Z представляет собой N-ацетилцистеин, и композит содержит от 51% Ca, 48% F, не более 1% N-ацетилцистеина (масс./масс.) до

37% Ca, 26% F и 37% N-ацетилцистеина (масс./масс.). В других аспектах композиты фторида кальция, описанные в настоящем документе, содержат Z, где Z представляет собой тиолактат, и композит содержит от 51% Ca, 48% F, не более 1% тиолактата (масс./масс.) до 42% Ca, 30% F, 28% тиолактата (масс./масс.). В других аспектах композиты фторида кальция, описанные в настоящем документе, содержат Z, где Z представляет собой адипат, и композит содержит от 51% Ca, 48% F, не более 1% адипата (масс./масс.) до 38% Ca, 27% F, 35% адипата (масс./масс.). В других аспектах композиты фторида кальция, описанные в настоящем документе, содержат Z, где Z представляет собой карбонат, и композит содержит от 51% Ca, 48% F, не более 1% карбоната (масс./масс.) до 48% Ca, 34% F, 18% карбоната (масс./масс.). В других аспектах композиты фторида кальция, описанные в настоящем документе, содержат Z, где Z представляет собой фолиевую кислоту, и композит содержит от 51% Ca, 48% F, не более 1% фолиевой кислоты (масс./масс.) до 22% Ca, 16% F, 62% фолиевой кислоты (масс./масс.). В других аспектах композиты фторида кальция, описанные в настоящем документе, содержат Z, где Z представляет собой глутатион, и композит содержит от 51% Ca, 48% F, не более 1% глутатиона (масс./масс.) до 28% Ca, 20% F, 52% глутатиона (масс./масс.). В других аспектах композиты фторида кальция, описанные в настоящем документе, содержат Z, где Z представляет собой мочевую кислоту, и композит содержит от 51% Ca, 48% F и не более 1% мочевой кислоты (масс./масс.) до 36% Ca, 26% F и 38% мочевой кислоты (масс./масс.).

Соли алюминия

В одном воплощении вакцина или иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению содержит соль алюминия. Подходящие адъюванты, содержащие соли алюминия, хорошо известны специалистам в данной области техники и включают, без ограничения, фосфат алюминия, гидроксид алюминия или их комбинацию. Подходящие адъюванты, содержащие соли алюминия, включают, без ограничения, REHYDRAGEL HS, ALHYDROGEL 85, REHYDRAGEL PM, REHYDRAGEL AB, REHYDRAGEL HPA, REHYDRAGEL LV, ALHYDROGEL или их комбинацию.

В частности, соли алюминия могут обладать способностью к адсорбции белка, составляющей от 2,5 до 3,5, от 2,6 до 3,4, от 2,7 до 3,3 или от 2,9 до 3,2, от 2,5 до 3,7, от 2,6 до 3,6, от 2,7 до 3,5 или от 2,8 до 3,4 белка (BSA)/мл соли алюминия. В конкретном воплощении настоящего изобретения соль алюминия обладает способностью к

адсорбции белка, составляющей от 2,9 до 3,2 мг BSA/мг соли алюминия. Способность к адсорбции белка для соли алюминия может быть определена любыми способами, известными специалисту в данной области техники. Способность к адсорбции белка для соли алюминия может быть определена с применением способа, описанного в Примере 1 WO 12/136823 (где использован BSA), или его вариаций.

Соли алюминия, описанные в настоящем документе (то есть обладающие способностью к адсорбции белка, описанной в настоящем документе), могут иметь размер кристаллов, определенный посредством рентгеновской дифрактометрии, составляющий от 2,8 до 5,7 нм, например от 2,9 до 5,6 нм, от 2,8 до 3,5 нм, от 2,9 до 3,4 нм или от 3,4 до 5,6 нм или от 3,3 до 5,7 нм, как измерено посредством рентгеновской дифрактометрии. Рентгеновская дифрактометрия хорошо известна специалисту в данной области техники. В конкретном воплощении настоящего изобретения размер кристаллов определяют с применением способа, описанного в Примере 1 WO 12/136823, или его вариаций.

Полипептид(ы) и/или нуклеиновую(ые) кислоту(ы), описанные в настоящем документе, можно вводить субъекту посредством любого пути введения, например перорально, назально, сублингвально, внутривенно, внутримышечно, внутрикожно (например, посредством кожного пластыря с микровыступами) или трансдермально (например, посредством мази или крема).

В седьмом аспекте настоящего изобретения предложены полипептид, определенный в первом аспекте, нуклеиновая кислота, определенная во втором аспекте, вектор, определенный в третьем аспекте, и/или вакцина согласно шестому аспекту для применения в медицине.

В восьмом аспекте предложены полипептид, определенный в первом аспекте, нуклеиновая кислота, определенная во втором аспекте, вектор, определенный в третьем аспекте, и/или вакцина согласно шестому аспекту для применения в вызывании иммунного ответа у млекопитающего, например для лечения и/или предупреждения одного или более заболеваний.

В девятом аспекте предложено применение полипептида, определенного в первом аспекте, нуклеиновой кислоты, определенной во втором аспекте, вектора, определенного в третьем аспекте, и/или вакцины согласно шестому аспекту для вызывания иммунного ответа у млекопитающего, например для лечения и/или предупреждения одного или более заболеваний.

В десятом аспекте предложено применение полипептида, определенного в первом аспекте, нуклеиновой кислоты, определенной во втором аспекте, вектора, определенного в третьем аспекте, и/или вакцины согласно шестому аспекту для получения лекарственного средства для вызывания иммунного ответа у млекопитающего, например для лечения и/или предупреждения одного или более заболеваний.

В одиннадцатом аспекте предложен способ вызывания иммунного ответа у млекопитающего, включающий или состоящий из введения млекопитающему эффективного количества полипептида, определенного в первом аспекте, нуклеиновой кислоты, определенной во втором аспекте, вектора, определенного в третьем аспекте, и/или вакцины согласно шестому аспекту.

Применение или способ по любому из от седьмого до одиннадцатого аспектов, где указанные одно или более заболеваний представляют собой инфекцию мочевыводящих путей (UTI). В качестве альтернативы или дополнительно, UTI вызвана одной или более бактериями рода, выбранного из группы, состоящей из *Escherichia* и *Klebsiella*. В качестве альтернативы или дополнительно, одна или более бактерий выбраны из группы, состоящей из *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*. В качестве альтернативы или дополнительно, *Escherichia coli* представляет собой уропатогенную *Escherichia coli* (UPEC). В качестве альтернативы или дополнительно, одна или более бактерий выбрана из группы, состоящей из *E. coli* J96, *E. coli* UPEC 536, *E. coli* CFT073, *E. coli* UMN026, *E. coli* клон Di14, *E. coli* клон Di2, *E. coli* CFT073; *E. coli* IA139, *E. coli* 536, *E. coli* NA114 и *E. coli* UTI89. В качестве альтернативы или дополнительно, одна или более бактерий выбрана из группы, состоящей из следующих штаммов *K. pneumoniae*: C3091, 3824, 3857, 3858, 3859, 3860, 3861, 3928, 3950, 3951, 4041, 4121, 4133, sp3, sp7, sp10, sp13, sp14, sp15, sp19, sp20, sp22, sp25, sp28, sp29, sp30, sp31, sp32, sp33, sp34, sp37, sp39, sp41, cas119, cas120, cas121, cas122, cas123, cas124, cas125, cas126, cas127, cas128, cas663, cas664, cas665, cas666, cas667, cas668, cas669, cas670, cas671, cas672, cas673, cas674, cas675, cas676, cas677, cas678, cas679, cas680, cas681, cas682, Кр342 и MGH78578.

Далее будут описаны предпочтительные неограничивающие примеры, воплощающие некоторые аспекты настоящего изобретения, со ссылкой на следующие таблицы и графические материалы.

Фиг. 1А и Фиг. 1В. Схематическое представление конструкций FimH.

Фиг 1А. Структура стабилизированного FimH (PDB: 4XO9). Упрощенное

представление FimH, стабилизированного донорной цепью FimGFimG (выделена синим цветом – указана стрелками). Домен FimH_L выделен желтым цветом (верхняя часть), тогда как FimH_R выделен красным цветом (нижняя часть). Содержащий остатки глицина природный линкер между доменами представлен в виде зеленых стержней.

Фиг. 1В. Структура FimH_DG_PGDGN_Ferritin. Аминокислотная последовательность FimH_DG_PGDGN (голубой цвет) слита с ферритином (красный цвет). Линкер, состоящий из SGS-8H-GSG-, соединяет FimH с молекулой ферритина. Желтым цветом выделена лидерная последовательность IgK для экспрессии в клетках млекопитающих и секреции в среду, за ней следуют дополнительные N-концевые заряженные остатки. Модель 3D-структуры была получена с помощью стандартного программного обеспечения Rosetta. Упрощенное представление FimH_DG, экспонированного на поверхности ферритина. Присутствуют 24 субъединицы FimH, выделенные желтым/синим цветом, тогда как ферритин выделен красным цветом.

Фиг. 2А и Фиг. 2В. Экспрессия наночастиц FimH в *E. coli* приводит к образованию телец включения:

А) **Фиг. 2А.** Анализ посредством SDS-PAGE (электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия) для подвергнутых кипячению и восстановлению образцов FimH_DG_(GSG4)-Ferritin, FimHL cys-cys_QBeta, FimHL cys-cys_mI3 и FimHL-NOcys-MI3, экспрессированных в цитоплазме *E. coli*. Конструкции экспрессируются, но могут быть обнаружены только в нерастворимой фракции (8 M мочевины, U8M), но не в растворимой фракции (Sol). Белки не могут быть обнаружены в общей фракции лизата (Tot) вследствие нерастворимости; в верхней части геля может быть обнаружено скопление нерастворимого вещества. Анализ посредством вестерн-блоттинга с использованием антитела к His для подвергнутых кипячению и восстановлению образцов FimHL-NOcys-MI3, экспрессированных в цитоплазме *E. coli*. Мутация внутреннего дисульфидного мостика в домене FimHL не приводила к улучшению растворимости, поскольку в растворимой фракции можно обнаружить только бледную полосу.

В) Анализ посредством SDS-PAGE для FimHL-MI3, экспрессированного в периплазме *E. coli*, и цитоплазматического FimHL-ferritin. Зоны, соответствующие слитым молекулам FimHL-MI3 и ферритина, были обнаружены в общем лизате и в нерастворимой фракции (U8M).

Фиг. 3. Прогнозирование сайтов N-гликозилирования FimH с использованием

программного обеспечения для прогнозирования NetNGly.

Фиг. 4. Экспрессия конструкций стабилизированного FimH (FimH_ΔGG_PG DGN_DG: 930SI; FimH_DNKQ_DG: 931SI; FimH_PG DGN_DG: 932SI) и комплекса FimHC в клетках млекопитающих.

Фиг. 5. Анализ посредством вестерн-блоттинга для конструкций, экспрессированных в клетках млекопитающих, содержащих дополнительные N-концевые аминокислоты.

А) ФИГ. 5А: Зона, соответствующая наночастице FIMH, была обнаружена только для FIMH_DG_PG DGN-ferritin(995SI) через 3 и 6 суток после трансфекции.

В) ФИГ. 5В: Упрощенное представление FimH из штамма 536, обозначены три отличающихся по сравнению с J96 остатка, которые представлены в виде стержней.

С) ФИГ. 5С: Обработка ПНГазой (пептид-N-гликозидаза) FIMH_DG_PG DGN_IMX313 и FIMH_DG_PG DGN_ferritin из штамма J96. После обработки был получен сдвиг FIMH_DG_PG DGN_IMX313 в направлении надлежащей MW (молекулярной массы), что позволяет предположить, что белок является гликозилированным в клетках млекопитающих. FIMH_DG_PG DGN_ferritin из штамма J96 не был обнаружен ни в необработанных, ни в обработанных ПНГазой образцах, что позволяет предположить, что этот белок деградирует.

Фиг. 6. Пептидное картирование посредством MS-спес (масс-спектрометрии).

Фиг. 7. Экспрессия кандидатов, не содержащих дополнительных N-концевых аминокислот, по данным вестерн-блоттинга.

Фиг. 8. Cryo-EM NS-EM (криоэлектронная микроскопия с негативным контрастированием) для кандидатов, содержащих дополнительные AA (аминокислоты) или без дополнительных AA на N-конце.

Фиг. 9. Cryo-EM NS-EM (негативное контрастирование) для кандидатов без дополнительных AA на N-конце.

А) ФИГ. 9А: Микроскопические изображения с негативным контрастированием для 1095SI FIMHL-ferritin (штамм 536) БЕЗ дополнительных аминокислот.

В) ФИГ. 9В: Микроскопические изображения с негативным контрастированием для FIMHL-MI3 (штамм J96) БЕЗ дополнительных аминокислот.

С) ФИГ. 9С: Микроскопические изображения с негативным контрастированием для 1184SI FIMH_DG_PG DGN_536-encapsuline БЕЗ дополнительных аминокислот.

Фиг. 10. 3D-карта иллюстрирует присутствие трех «якореподобных»

выступающих элементов на оси 3-го порядка.

Фиг. 11. Определение титров IgG посредством анализа ELISA. Сыворотки мышей исследовали на 21 (после дозы I, зеленый цвет), 35 (после дозы II, синий цвет) и 45 (после дозы III, красный цвет) сутки после вакцинации. В качестве покрытия для планшетов для ELISA использовали FimHL, полученный из *E. coli*.

Фиг. 12. Анализ ингибирования бактерий (BAI) на клетках SV-HUC. Адгезию бактерий определяли посредством микроскопического анализа (OPERA Phenix) с использованием клеток SV-HUC (ATCC). Объем или площадь флуоресценции адгезированных бактерий (мкм³ или мкм²) использовали в качестве результата считывания. В качестве контроля использовали пул сывороток, полученных против рекомбинантных белков FimHC, FimHL-cys (очищенных из *E. coli*). Пул сывороток, полученных против рекомбинантных белков FimH_PGDGN_DG(932SI), FimH_DNKQ_DG(931SI), FimH_DNKQ_DG_Deglyc(951SI) и FimH_PGDGN_DG-Ferritin(995SI), которые были очищены из системы экспрессии в клетках млекопитающих ExPIGnti, использовали для измерения способности этих сывороток ингибировать связывание бактерий с клетками SV-HUC. В качестве отрицательного контроля использовали пул сывороток, полученных против AS01.

Фиг. 13. Определение биохимических характеристик очищенного FimH_PGDGN_DG посредством SDS-PAGE, SE-UPLC (эксклюзионной сверхэффективной жидкостной хроматографии) и RP-UPLC (обращенно-фазовой сверхэффективной жидкостной хроматографии).

Фиг. 14. Определение биохимических характеристик очищенного FimH_DNKQ_DG посредством SDS-PAGE, SE-UPLC и RP-UPLC.

Фиг. 15. Определение биохимических характеристик очищенного FimH_DNKQ_DG_deglycosylated посредством SDS-PAGE, SE-UPLC и RP-UPLC.

Фиг. 16. Определение биохимических характеристик очищенного FIMH_DG_PGDGN_ferritin (последовательность из штамма UPEC 536), содержащего дополнительные АА на N-конце.

Фиг. 17: FimH-специфический общий IgG (ELISA). **Фиг. 17А)** Титры IgG к FimH в сыворотке мышей после дозы 3, нанесенные на график как функция дозы MPL. **Фиг. 17В)** Титры IgG к FimH в моче мышей, определенные после первой, второй и третьей доз вакцины. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку до иммунизации. Иммунизацию белком FimHC осуществляли в комбинации с адъювантами

с использованием количества белка 1,6 мкг.

Фиг. 18. FimH-специфический общий IgG (ELISA): сравнение систем экспрессии в клетках бактерий и млекопитающих для сывороток и мочи. Фиг. 18А)

Было сделано предположение, что титры антител имели логарифмически нормальное распределение, и были рассчитаны средние геометрические значения титров (GMT) и соответствующие им двусторонние 95% CI (доверительные интервалы). Для сравнения групп была подобрана модель ANOVA по значениям \log_{10} титров с использованием групп, временных точек и их взаимосвязи в качестве фиксированных факторов и повторным утверждением для временных точек. Была предположена неоднородность дисперсии величин между группами. С помощью этой модели были получены отношения средних геометрических значений и соответствующие им 95% CI. Гуморальный иммунный ответ на каждую композицию оценивали против FimHDG, использованного в качестве покрытия для планшетов для ELISA. Все статистические анализы осуществляли с помощью программного обеспечения SAS 9.4. **Фиг. 18В)** FimH-специфические общие IgG мочи.

Фиг. 19. FimH-специфические общие IgG. Результаты ELISA после дозы I:

Было сделано предположение, что титры антител имели логарифмически нормальное распределение, и были рассчитаны средние геометрические значения титров (GMT) и соответствующие им двусторонние 95% CI. Для сравнения групп была подобрана модель ANOVA по значениям \log_{10} титров с использованием групп, временных точек и их взаимосвязи в качестве фиксированных факторов и повторным утверждением для временных точек. Была предположена неоднородность дисперсии величин между группами. С помощью этой модели были получены отношения средних геометрических значений и соответствующие им 95% CI. Гуморальный иммунный ответ на каждую композицию оценивали против FimHDG, использованного в качестве покрытия для планшетов для ELISA. Все статистические анализы осуществляли с помощью программного обеспечения SAS 9.4.

Фиг. 20. FimH-DG вызывает функциональный иммунный ответ. Анализ ингибирования бактерий для выбранных конструкций в сравнении с FimHC. Относительная активность рассчитана как указано в примерах.

Фиг. 21. Способность антител к FimHDG ингибировать адгезию ExPEC в анализе ингибирования бактерий (BAI). Все кандидаты были приготовлены с добавлением AS01.

Фиг. 22. SPR-анализ для образцов FimH и взаимодействие с mAb926

(сенсограммы).

Для изучения взаимодействия FimH-кандидатов и mAb926 осуществляли SPR-анализ, в результате которого была получена сенсограмма, представляющая собой график зависимости ответа (ординаты) от времени (абсциссы), которая отображала протекание взаимодействия. Ответ измеряли в резонансных единицах (RU), которые являются прямо пропорциональными концентрации молекул на поверхности сенсорного чипа. Каждая сенсограмма состоит из двух частей, соответствующих фазам ассоциации и диссоциации взаимодействия. Ассоциация является первой фазой биомолекулярного взаимодействия, во время которой происходит связывание, когда аналит и лиганд сталкиваются вследствие диффузии и когда столкновение сопровождается правильной ориентацией и достаточным количеством энергии. Диссоциация является фазой, во время которой комплекс лиганд-аналит диссоциирует; профиль диссоциации может предоставить информацию об устойчивости комплекса: чем медленнее диссоциация, тем выше устойчивость комплекса, и наоборот.

Фиг. 23. Фиг. 23А: Анализ посредством SDS-PAGE для культурального супернатанта, экспрессирующего не содержащий меток FimHDG в клетках млекопитающих. Анализ посредством SDS-PAGE и анализ посредством SEC-UPLC для очищенного не содержащего меток FimHDG из клеток Expi293 и клеток ExpiCHO. Фиг. 23В: Профили в анализе нано-DSF и значения температуры плавления, полученные для не содержащего меток FimHDG, очищенного из клеток Expi293 и ExpiCHO, в сравнении с FimHDG, содержащим С-концевую His-метку. Фиг. 23С: SPR-анализ связывания mAb 926 и 475 с не содержащим меток FimHDG в сравнении с FimHDG-His. SPR-анализ связывания маннозы с не содержащим меток FimHDG в сравнении с FimHDG-His. Фиг. 23D: Анализ посредством SDS-Page для супернатантов от конструкций FimHDG-ferritin, содержащих разные линкеры и содержащих или не содержащих начальный остаток Asp. Анализ посредством вестерн-блоттинга для осадка из клеток млекопитающих с использованием FimH-специфичной антисыворотки мышей.

Фиг. 24. Расчеты с помощью программного обеспечения PROSS для симметричного (относительно других 23 цепей) мономера *E. coli* в октаэдрической наночастице (1EUM в PDB), выполненные для введения стабилизирующих мутаций с повышенной аффинностью или стабильностью (нижняя левая часть диаграммы).

Фиг. 25. Фиг. 25А: Анализ посредством SDS-PAGE для экстрактов общей (Т) и растворимой (S) фракций, содержащих ферритин WT (дикого типа) *E. coli* и различные

мутанты. Фиг. 25B: SEC-профиль для мутанта 0.5. Все конструкции имели профиль, содержащий интенсивный пик (отмечен стрелкой) в области мертвого объема колонки, что согласуется с формированием наночастицы.

Фиг. 26. Анализ посредством NS-EM (с негативным контрастированием) для ферритина WT *E. coli* и различных мутантов (0,5, 2, 2,5, 6).

Фиг. 27. Анализ посредством дифференциальной сканирующей флуориметрии для конструкций ферритина с тепловыми профилями. На графике слева показана зависимость производной интенсивности флуоресценции от температуры. В таблице справа в овале указан мутант (0,5) с наибольшей T_m .

Фиг. 28. Слева: анализ посредством вестерн-блоттинга с использованием антитела к His для супернатанта, экспрессирующего различные конструкции наночастиц FimH. Звездочкой отмечены наночастицы FimHDG-ferritin (мутант 0,5) *E. coli*. Справа: анализ посредством TEM (просвечивающей электронной микроскопии) демонстрирует присутствие правильно сформированных наночастиц ферритина.

ПРИМЕРЫ

Авторы настоящего изобретения сконструировали стабильный не связанный в комплекс (в отсутствие FimC) вариант полноразмерного FimH, в котором пептид донорной цепи FimG [SEQ ID NO: 5] был генетически слит посредством линкера из 4 или 5 остатков (DNKQ [SEQ ID NO: 8] или PGDGN [SEQ ID NO: 7]) с C-концом FimH_p с получением белка «FimH_DG», обладающего структурными и функциональными свойствами FimH в собранном пиле. Линкеры были сконструированы путем выбора высокополярных заряженных остатков (DNKQ) или встраивания остатка пролина (линкер PGDGN) в качестве первого остатка линкера, который, как прогнозируется, поддерживает поворот во вторичной структуре и способствует обеспечению правильной архитектуры белка. Кроме того, конструкция, в которой два остатка глицина, присутствующих в линкере, соединяющем FimH_L с FimH_p, были удалены для дополнительного уменьшения гибкости FimH_L и ослабления связывания маннозы (Фиг. 1A).

Более того, может быть использовано конструирование наночастиц для FimH для экспонирования множества копий стабилизированного FimH и дополнительного повышения его иммуногенности в качестве активатора для 1-2-дозовой вакцины.

Вирусоподобные частицы (VLP) и белковые наночастицы (NP) являются платформами для экспонирования других антигенов, которые имеют потенциал

индуцировать эффективные В- и Т-клеточные ответы. Им присуща способность к самосборке в высокосимметричные стабильные и организованные структуры. Несколько химерных VLP/NP находятся в стадии доклинических и клинических исследований во всем мире. В частности, ферритиновый каркас был генетически слит с вирусным гемагглютинином с получением частиц, которые были более иммуногенными, в присутствии адъюванта, в одной дозе по сравнению с вакциной против сезонного гриппа (Nature 2013, 49, 104). Тот же подход использовали в доклинических исследованиях многих других антигенов (Chen Y, et al. Vaccine. 2020 Jul 31;38(35):5647-5652). Задача состоит не только в том, чтобы сконструировать правильно собранную частицу, презентующую целевые антигены, но также и в том, чтобы полученная частица была подходящей для производства и масштабирования. Для изучения возможности самосборки NP и VLP для экспонирования FimH-кандидатов были сконструированы, путем генетического слияния, и исследованы различные химерные молекулы.

Наночастица ферритина *Helicobacter pylori* состоит из 24 субъединиц, всего восемь тримеров желаемого антигена могут экспонироваться в высокосимметричной октаэдрической структуре наночастиц ферритина в виде клетки (Фиг. 1В). Недавно путем расчетов была сконструирована белковая наноклетка i301, 60-мерная NP на основе 2-кето-3-дезоксифосфоглюконатаальдолазы (KDPG-альдолазы) *Thermotoga maritima* (Hsia Y, et al. Nature. 2016 Jul 7;535(7610):136-9). Стабильность i301 была дополнительно улучшена путем осуществления мутации по двум остаткам цистеина (mI3) (Bruun TUJ, et al. ACS Nano. 2018 Sep 25;12(9):8855-8866) и путем слияния белка SpyCatcher с N-концом белка.

Авторы настоящего изобретения сконструировали рекомбинантные плазмиды для генетического слияния ферритина, mI3 или инкапсулина со стабилизированным антигеном FimH_DG_PGDGN или антигенами FIMHL и FIMHLCys. Для разделения экспонируемого антигена и NP между двумя последовательностями был добавлен линкер.

Исследуемые линкеры содержат повторы остатков Gly и Ser, но также могут содержать внутреннюю 8xHis-метку для обеспечения очистки белка. Для повышения экспрессии белка и растворимости FimH-NP в цитоплазматическом пространстве *E. coli* конструкции FIMHL, содержащие мутации внутреннего мостика S_S (C24SC65S), также подвергали слиянию с ферритином и mI3 и исследовали в отношении экспрессии и растворимости.

Материалы и методы

Клонирование и экспрессия в клетках *E. coli*

Конструкции FimH-NP для экспрессии в клетках бактерий были синтезированы компанией Geneart в виде цепей ДНК и клонированы непосредственно в pET15-tev, pET21 или pET22 (см. таблицу 1) с помощью набора для клонирования In-Fusion от компании Takara. Другие конструкции были приобретены в виде синтетических генов у компании Geneart, при этом целевой белок был непосредственно клонирован в вектор экспрессии (pTRC-HIS2A от Life Technologies). Все синтетические гены были оптимизированы для экспрессии в клетках *E. coli* и содержали N-концевую, C-концевую или внутреннюю HIS-метку для обеспечения аффинной очистки белка. Экспрессию белков осуществляли в штаммах BL21DE3T1r (NEB) или T7 Shuffle Express с использованием среды HTMC и индукции с помощью IPTG (изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид) при 20°C в течение 24 ч.

После извлечения осадка его ресуспендировали в лизирующем буфере Cell Lytic Express (Merk) или растворе B-Per (Pierce) в течение 1 ч при 25°C. После центрифугирования присутствовал видимый осадок телец включения (IV), который повторно растворяли в 8 М мочеvine (U8M). Экспрессию и растворимость белков оценивали посредством SDS-PAGE для образцов, собранных из растворимой фракции (S) и нерастворимой фракции (IV).

Получение рекомбинантных белков в клетках млекопитающих

Конструкции FimH-NP для экспрессии в клетках млекопитающих (см. Таблицу 2) были синтезированы компанией Geneart в виде синтетических генов в векторах pCDNA3.1 или pCDNA3.4 (Life Technologies). Все последовательности были оптимизированы по кодонам для экспрессии в клетках млекопитающих и содержали N-концевую лидерную последовательность для секреции в клеточную среду. Эта последовательность представляет собой лидерную последовательность IgK мыши METDTLLLWVLLLWVPGSTGD [SEQ ID NO: 9] или лидерную последовательность IgK мыши, за которой следуют 15 дополнительных заряженных остатков AAQPARRARRTKLAL [SEQ ID NO: 78] (Фиг. 1B).

Для получения рекомбинантных FimH-NP клетки Expi293GnTI трансфицировали векторами экспрессии в соответствии с инструкциями производителя (Life Technologies). Линия клеток Expi293F GnTI получена из сконструированных клеток Expi293F, которые не обладают активностью N-ацетилглюкозаминилтрансферазы I (GnTI) и, как следствие,

не содержат сложных N-гликанов, что приводит к образованию гомогенно гликозилированных рекомбинантных белков.

Кратко, 30 мкг векторов pCDNA, экспрессирующих FimH-NP, трансфицировали 30 мл культуры, содержащей 75×10^6 клеток Expi293F, с использованием реагента ExpiFectamine 293. Клетки инкубировали при 37°C, 120 об/мин, 8% CO₂, и через 24 ч добавляли усилители трансфекции 1 и 2 ExpiFectamine 293. Далее клетки инкубировали при 37°C в течение 144 ч. Каждые 24 ч собирали аликвоты культур и подвергали их анализу на экспрессию NA посредством SDS-PAGE и вестерн-блоттинга (WB). Через 72 и 144 ч после трансфекции культуры клеток центрифугировали при 1000 об/мин в течение 7 мин, супернатанты собирали, объединяли в пул, осветляли посредством центрифугирования, фильтровали через 0,22 мкм фильтр и хранили при -20°C до очистки.

Для определения гликозилирования антигенов, экспрессированных в клетках млекопитающих, использовали ПНГазу F Proteomics Grade (P7367, Sigma) в соответствии с протоколом производителя.

Вестерн-блоттинг выполняли согласно стандартному протоколу с использованием меченных HRP (пероксидазой хрена) антител к His (Sigma) в разведении 1:1000 или антител к FimHL-cys, полученных в мышцах с использованием очищенного бактериального белка FimHL-cys и вторичных меченных HRP противомышиных антител.

Для очистки NP из культуральных супернатантов использовали аффинную хроматографию с Ni²⁺. Интересующие фракции объединяли в пул и концентрировали с использованием центрифужного концентратора с пределом отсечения по молекулярной массе 100 кДа (Millipore Amicon Ultra); для проверки чистоты белка осуществляли электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE). Рекомбинантные антигены FimH-NP и FimH-DG очищали посредством препаративной эксклюзионной хроматографии (SEC) в условиях уравнивания буфером PBS.

Во всех собранных фракциях определяли содержание FimH-NP или белка FimH-DG посредством SDS-PAGE, и интересующие фракции объединяли, фильтровали с использованием 0,22 мкм фильтра, разделяли на аликвоты и хранили при -20°C.

Для оценки размера и чистоты белка осуществляли аналитическую SEC-HPLC (эксклюзионную высокоэффективную жидкостную хроматографию) и обращенно-

фазовую RP-UPLC. Кроме того, FimH-NP подвергали анализу методом динамического рассеяния света для дополнительного определения молекулярной массы и сборки наночастиц, а идентичность белковых последовательностей оценивали посредством LC-MS (жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией).

Иммунизация

Двенадцать мышей CD1 (самок) в каждой из групп иммунизировали 15 микрограммами антигенов-кандидатов, экспрессированных в системах млекопитающих или бактериальных системах, с ASO1 в качестве адъюванта. Всем мышам три раза инокулировали путем подкожной инъекции (SC) 200 мкл (разведение в PBS) антигенной смеси или адъюванта в отдельности. Кровь собирали из хвостовой вены в 0 (до иммунизации), 21 (после дозы I), 35 (после дозы II) и 45 или 49 (после дозы III) сутки после вакцинации.

Анализ FimH-специфичных антител

FimH-специфичные IgG в сыворотках определяли посредством твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Кратко, 96-луночные микропланшеты покрывали 100 мкл антигена (1 мкг/мл) на каждую лунку 96-луночного планшета Nunc Maxsorp и инкубировали в течение ночи при 4°C. В каждую лунку добавляли 250 мкл содержащего PVP (поливинилпирролидон) насыщающего буфера, и планшеты инкубировали в течение 2 часов при 37°C. Лунки три раза промывали PBT (забуференный фосфатом физиологический раствор с добавлением твина). Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл разбавленных сывороток, и планшеты инкубировали в течение 2 часов при 37°C. Лунки три раза промывали PBT. В каждую лунку добавляли 100 мкл сыворотки, содержащей конъюгированное со щелочной фосфатазой вторичное антитело, разбавленной 1:2000 в буфере для разведения, и планшеты инкубировали в течение 90 минут при 37°C.

Лунки три раза промывали буфером PBT. В каждую лунку добавляли 100 мкл субстрата *n*-нитрофенилфосфата, и планшеты оставляли при комнатной температуре на 30 минут. В каждую лунку добавляли 100 мкл 4 н. NaOH и регистрировали OD (оптическую плотность) при 405/620-630 нм. Титры антител количественно определяли как разведение сыворотки, которому соответствует поглощение 0,4 OD, с использованием многорежимного устройства для прочтения микропланшетов.

Анализ ВАІ

Бактерии (UTI89 wt_mCherry, клон 2) культивировали путем 3 пересевов

статической жидкой культуры: условия роста для индуцирования экспрессии FimH. Анализ ВАI осуществляли при выбранных условиях: плотность бактерий 0,012 OD/мл и время инкубации 30 мин. Адгезию бактерий определяли посредством микроскопического анализа (OPERA Phenix). Клетки SV-HUC (ATCC) культивировали в полной среде для SV-HUC: F12K (Thermo Scientific) с добавлением 10% FBS (фетальной бычьей сыворотки) и антибиотиков. Среда перед инфицированием: полная среда без антибиотиков.

Исследованные сыворотки (инактивированные нагреванием):

Идентификатор сыворотки
Анти-FimHL-cys
Анти-AS01
FimH_PGDGN_DG (из млекопитающих)
FimH_DNKQ_DG (из млекопитающих)
FimH_DNKQ_DG Deglyc (из млекопитающих)
FimH_PGDGN_DG Fer, 15 мкг (из млекопитающих)
FimH_PGDGN_DG Fer, 3 мкг (из млекопитающих)

3 флакона T75 с клетками SV-HUC (3×10^6 клеток/мл, жизнеспособность 95%) обрабатывали трипсином (в течение 5 мин, при 37°C). Клетки высевали в 96-луночные планшеты, 60 лунок в каждой планшете засевали в количестве $3,5 \times 10^4$ клеток/лунка (VF = 200 мкл/лунка), и инкубировали при 37°C, 5% CO₂. Подготовка культуры бактерий состояла из трех пересевов статической жидкой культуры: штаммы UT189 инокулировали из чашки в 20 мл среды LB (в колбе объемом 125 мл) и инкубировали при 37°C, O/N, в статических условиях. Этот пересев, включающий разбавление/инкубацию, повторяли три раза.

Среду для клеток SV-HUC заменяли на среду перед инфицированием, не содержащую антибиотиков (200 мкл/лунка).

Готовили 2х растворы сыворотки в 96-луночном планшете с лунками с U-

образным дном, содержащими среду F12K или F12K + 10% FBS, как указано ниже, и далее разбавляли путем последовательных разведений.

1 мл полученной после третьего пересева культуры бактерий UTI 89 mcherry, клон 2 переносили в отдельные пробирки и центрифугировали при $4500 \times g$ в течение 5 мин при комнатной температуре. Бактерии промывали PBS и осаждали. Наконец, осадок бактерий ресуспендировали до плотности 0,5 OD₆₀₀/мл в среде для инфицирования.

Инфицирование осуществляли следующим образом: из каждого планшета отбирали среду и к каждому образцу добавляли 50 мкл 2х растворов сыворотки/маннозы (20% D-(+)-маннозы) или среды для инфицирования (положительный и отрицательный контроль), и затем к каждому образцу добавляли 50 мкл 2х инокулята или среды для инфицирования (отрицательный контроль). Планшеты инкубировали в течение 30 мин и добавляли разведения сывороток в количестве от 15% до 0,06%. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 30 мин, среду удаляли и лунки планшетов три раза промывали PBS. Бактерии фиксировали с использованием 4% раствора формальдегида (200 мкл/лунка). После инкубации в течение 20 мин фиксирующий раствор удаляли и образцы промывали 3 раза PBS (200 мкл/лунка). Раствор DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндола) (62248, ThermoScientific) разводили 1:5000 в PBS и добавляли по 100 мкл в каждую лунку. Образцы инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре (в темноте). Раствор DAPI удаляли, и в каждую лунку добавляли PBS (200 мкл/лунка). Образцы хранили при 4°C в темноте и выдерживали в течение 3 ч при RT (комнатной температуре) перед визуализацией с использованием OPERA Phenix. Вся площадь лунок была охвачена с использованием воздушного объектива с 10-кратным увеличением с использованием настройки Alexafluor488. Для каждого поля получали Z-стек (4 плоскости). Анализ данных осуществляли с использованием программного обеспечения Harmony. В качестве величины адгезии рассчитывали общую площадь флуоресценции бактерий (отдельный объект $\leq 100 \text{ мкм}^2$).

Результаты

Стабилизированные FimH в качестве мономерных антигенов, а также наночастицы стабилизированного FimH секретируются в виде растворимых белков в системе экспрессии млекопитающих и могут быть легко очищены посредством ИМАС (аффинной хроматографии на иммобилизованных ионах металла)

В качестве первой попытки были созданы и исследованы несколько конструкций FimH-NP в различных условиях. Промотор sT7 и pTac векторов pET и вектора

pTrcHIs2A, соответственно, использовали для определения экспрессии и растворимости антигенов-кандидатов в *E. coli*. Кроме того, были исследованы как цитоплазматическая, так и периплазматическая экспрессия, а также различные штаммы *E. coli*, такие как T7 Shuffle Express, оптимизированные для образования дисульфидных мостиков в цитоплазматическом пространстве. Для повышения экспрессии белка и растворимости FimH-NP в цитоплазматическом пространстве *E. coli* конструкции FimHL, содержащие мутации внутреннего мостика S_S, также подвергали слиянию с ферритином и mI3 и исследовали в отношении экспрессии и растворимости.

Однако ни одна из конструкций не обеспечивала экспрессию растворимых белков, что позволяет предположить, что система экспрессии в клетках *E. coli* может не являться оптимальной для получения наночастиц FimH. Мутация внутреннего дисульфидного мостика в домене FimHL не приводила к значительному улучшению растворимости, поскольку в растворимой фракции посредством вестерн-блоттинга была обнаружена только бледная полоса.

E. coli представляет собой прокариотическую систему экспрессии, которая особенно предпочтительна благодаря дешевизне культивирования и простоте процесса. Однако продуцирование белков клетками *E. coli* может приводить к образованию рекомбинантных белков, экспрессирующихся в основном в виде телец включения, которые являются нерастворимыми и неактивными и могут потребовать сложного процесса рефолдинга *in vitro* (Фиг. 2).

Для преодоления проблемы нерастворимости в *E. coli* авторами настоящего изобретения было принято решение перейти к системе экспрессии млекопитающих EXPI293F. Во-первых, последовательность FimH была проанализирована в отношении сайтов N- и O-гликозилирования, потенциально ответственных за гликозилирование. На Фиг. 3 показано положение предполагаемых сайтов N-гликозилирования. Сайты O-гликозилирования обнаружены не были (данные не показаны).

Для экспрессии бактериального белка в клетках млекопитающих с максимально уменьшенной степенью гликозилирования, происходящего в этой системе в отличие от системы *E. coli*, авторы настоящего изобретения использовали генетически мутированную линию клеток EXPI293F, называемую Expi293F GnTI (ThermoFisher). Эта линия клеток получена из конструированных клеток Expi293F, но не обладает активностью N-ацетилглюкозаминилтрансферазы I (GnTI), и поэтому не содержит сложных N-гликанов, что приводит к образованию гомогенно гликозилированных

рекомбинантных белков.

Полноразмерные белки FimH из штаммов 536 и/или J96 *E. coli*, стабилизированные донорной цепью FimG (FimH-DG), содержащие лидерную последовательность к-цепи Ig мыши для секреции (плюс дополнительные аминокислоты на N-конце домена FimH_L (в некоторых конструкциях; Таблица 1)), сами по себе или слитые с белковыми NP (ферритина, mI3, IMX313, инкапсулина и HBc) использовали для трансфекции клеток EXPI293 GNTI. Накопление секретируемых рекомбинантных белков характеризовали путем измерения их экспрессии в культуральных супернатантах через 72 ч и 144 ч после трансфекции посредством WB и SDS-PAGE. Оба анализа показали, что экспрессия FimH в растворимой форме могла быть получена на высоком уровне для некоторых конструкций, тогда для других не могла быть получена. Экспрессированные и растворимые стабилизированные белки FimH-DG и FimH-NP, содержащие C-концевую 6xHis-метку или внутреннюю 8xHis-метку, очищали из объединенных в пул культуральных сред через 72 ч и 144 ч после трансфекции посредством хроматографии на иммобилизованных ионах металла и препаративной SEC хроматографии. Анализ посредством SDS-PAGE для белков, продуцируемых в системе экспрессии млекопитающих, показал, что они мигрировали в соответствии с более высокой MW по сравнению с соответствующими бактериальными белками, что позволяет предположить, что они являлись гликозилированными. Соответственно, две конструкции, в которых отсутствовали остатки, предположительно подвергающиеся N-гликозилированию, были изменены с получением FimH_DNKQ_DG_deglyc и FimH_PG DGN_DG_deglyc, содержащих дополнительные N-концевые аминокислоты и следующие мутации: N28S, N91D, N249D, N256D (Таблица 1).

В анализе посредством вестерн-блоттинга для супернатантов от конструкций, экспрессированных в клетках млекопитающих, содержащих N-концевые дополнительные аминокислоты, была обнаружена свидетельствующая о наличии экспрессии зона, соответствующая FimH_DNKQ_DG, FimH_PG DGN_DG и комплексу FimHC. Напротив, FimH_ΔGG_PG DGN_DG (с делецией остатков Gly, соединяющих FimHL и FimHP) не были обнаружены через 3 и 6 суток после трансфекции (Фиг. 4). Белковые характеристики очищенных продуктов представлены на Фиг. 13-16.

Конструкции FimH_PG DGN_DG_Ferritin (штамм 536; 995SI), содержащие дополнительные N-концевые AA, были успешно экспрессированы и очищены. Напротив, все конструкции FimH, не стабилизированные донорной цепью FimG –

(936SI)-FimH-IMX313 j96; (935SI)-FimH_mi3 j96; (929SI)-FimHL-HIS-mI3 j96, все из которых содержали дополнительные N-концевые аминокислоты, не были обнаружены в культуральных супернатантах.

Обработка ПНГазой FimH_DG_PGDN_IMX313 и FimH_DG_PGDN_ferritin из штамма J96 выявила сдвиг зоны FimH_DG_PGDN_IMX313 в направлении подлежащей MW в обработанном образце, что позволяет предположить, что белок являлся гликозилированным в клетках млекопитающих. FIMH_DG_PGDN_ferritin из штамма J96 не был обнаружен ни в необработанных, ни в обработанных ПНГазой образцах, что позволяет предположить, что этот белок подвергся деградации. FimH_PGDN_DG_Ferritin (штамм J96) (1000SI) не был обнаружен в результате очистки собранных супернатантов через 3 и 6 суток, даже при детектировании белка незамедлительно после сбора образцов, вследствие деградации, и эта конструкция не была получена (Фиг. 5A-C).

Кроме того, в предсказанные сайты N-гликозилирования, представленные на Фиг. 3, были введены мутации по остаткам серина или аспарагиновой кислоты. Полученный кандидат FimH_DNKQ_DGDeglyc демонстрировал большее покрытие при пептидном картировании по сравнению с последовательностью WT. Этот результат указывает на то, что возможное гликозилирование могло осуществляться в соответствии с этими конкретными мутированными аминокислотами (Фиг. 6).

Кроме того, иллюстративные конструкции, представленные на Фиг. 7, были экспрессированы с удалением дополнительных N-концевых аминокислот (короткого лидера). FimH-DG_PDGN_ferritin (штамм 536, дополнительные N-концевые AA) был получен с чистотой 88% посредством RP-UPLC. (998SI) FimH_PGDN_DG-HIS-IMX313 j96 также хорошо экспрессировался и успешно был очищен.

Все эти конструкции были экспрессированы в виде секретлируемых растворимых белков в клеточной среде и далее были очищены, как описано ранее. В анализе супернатантов посредством вестерн-блоттинга с использованием антител к FimHL-cys, полученных против бактериального стабилизированного белка, были распознаны все исследованные NP, экспрессированные в клетках млекопитающих (Фиг. 7).

Для подтверждения правильности сборки FimH-NP очищенные белки исследовали с использованием аналитической SE-HPLC и анализа DLS. В ходе SE-HPLC они были элюированы в виде единственного большого нерезкого пика. На основании сравнения объема удерживания (Ev) для NP ферритина с Ev для стандартов

молекулярной массы (MW), подвергнутых анализу в тех же условиях, рассчитанная MW NP FimH-DG-PGDGN-ferritin соответствовала NP, состоящим из 24 субъединиц, что было подтверждено в анализе DLS.

Конструкция FimH-DG_PDGDN_ferritin SL (последовательность из штамма 536 или J96, не содержащая дополнительных N-концевых AA) обеспечивала высокий уровень экспрессии с конечной чистотой, оцененной посредством RP-HPLC.

Также были успешно очищены конструкции FimHL-NP, и определение биохимических характеристик подтвердило образование NP, состоящих из 24 субъединиц, для (1095SI) FimHL-HIS-Fer 536, и состоящих из 60 субъединиц, для (1096SI) FimHL-HIS-Mi3 J96.

Визуализация полученных NP FIMH-DG

Дополнительное подтверждение того, что рекомбинантный слитый белок FimH-DG_PDGDN_ferritin, содержащий дополнительные AA (Фиг. 9A-B), FIMH_DG_PGDN-HIS-Ferritin 536, содержащий короткий лидер, и FimH_PGDN_DG_HIS-Ferritin j96, продуцируемые в системе экспрессии млекопитающих, образуют стабильные правильно собранные NP, было получено путем визуализации очищенных белков с использованием просвечивающей электронной микроскопии (TEM) с негативным контрастированием. Как показано на Фиг. 8B, образец (995SI) FimH_PGDN_DG_Ferritin 536, содержащий дополнительные N-концевые AA, имел вид дифференциально ориентированной однородной популяции октаэдрических частиц, содержащих шипы. «Голые» частицы ферритина имели диаметр 13 нм, тогда как шиповидный ферритин имел диаметр 30-32 нм. Различие в диаметре (8,5 нм) соответствует длине FimH (рассчитанной с использованием модели FimH). Кроме того, (1142SI) FimH_DG_PGDN-HIS-Ferritin 536 правильно свернут и содержит восемь шипов из тримеров FimH. В образце отсутствовали «голые» частицы ферритина. Частицы имели диаметр 30-32 нм. Образец (1042SI) FimH_PGDN_DG_HIS-Ferritin j96 представлял собой смешанную популяцию NP с индивидуальными или агрегированными белками, правильно свернутыми шиповидными NP, демонстрировавшими восемь шипов, присутствием свернутых NP с множеством шипов и неправильно свернутыми NP. «Голые» частицы ферритина обнаружены не были (Фиг. 8D).

Cryo-EM NS-EM (негативное контрастирование) для (1095SI) FimHL-HIS-Fer 536 и (1096SI) FimHL (J96)-mI3-his показала, что NP, экспрессированные в системе

млекопитающих, были полностью собранными. FimHL-HIS-Mi3 J96(1096SI) представлял собой правильно свернутые наночастицы икосаэдрической формы, в высокосимметричные, размером 40 нм и содержащие шипы, с небольшим количеством агрегатов (Фиг. 9А и Фиг. 9В). Кроме того, 1185SI и 1184SI FIMH_DG_PG DGN_536-encapsuline, оба содержащие короткий лидер на N-конце, были правильно собранными (Фиг. 9С и D). Также были успешно очищены конструкции, содержащие стабилизированный FimH, слитый с IMX313, (1043SI) FimH_DG_PG DGN_IMX313_HIS J96 и (998SI) FimH_PG DGN_DG-HIS-IMX313 j96, и определение биохимических характеристик подтвердило образование высокомолекулярных (HMW) форм. Однако анализ этих конструкций посредством TEM показал присутствие только агрегированного белка (данные не показаны).

Структурные особенности в 3D (трехмерных) реконструкциях рекомбинантных NP FimH-DG-Ferritin

Метод реконструкции единичных частиц был применен к изображениям TEM для создания трехмерной структуры собранных октаэдрических частиц (995SI) FimH_PG DGN_DG_Ferritin (последовательность FimH из штамма 536). Кадрированные изображения единичных наночастиц FimH-DG_PG DGN_ferritin (размер изображения 64x64 пикселя) сначала были подвергнуты обработке с использованием полосового фильтра для увеличения соотношения сигнал/шум, затем выравнены по вращательным и поступательным движениям и, наконец, центрированы перед проведением MSA (многовариантного статистического анализа) для классификации. На Фиг. 10А показана выборка из наиболее преобладающих усредненных результатов 2D-классификации для FimH-DG_PG DGN_ferritin, которая представляет различные ориентации частицы на подложке из углеродной пленки. Реконструкция, созданная посредством 3D-EM (трехмерной электронной микроскопии) (фиг. 10В) для полученного растворимого FimH-DG_PG DGN_ferritin, подтвердила, что эта структура состояла из высокосимметричной октаэдрической структуры в виде клетки с присутствием трех «якореподобных» выступающих элементов на оси 3-го порядка.

Стабилизированные белки FIMH-DG и NP FIMH-DG_PG DGN-Ferritin обладают высокой иммуногенностью у мышей

Для оценки иммуногенности кандидатов, экспрессированных в системе млекопитающих (FimH_PG DGN_DG, FimH_DNKQ_DG, FimH_DNKQ_DGdeglyc и FimH_PG DGN_DG_Ferritin), отдельные сыворотки иммунизированных мышей

подвергали анализу посредством ELISA с использованием в качестве покрытия для планшетов лектинового домена FimH (FimHL), экспрессированного в *E. coli*. В целом, все кандидаты вызывали ответ IgG. FimH_PGDGN_DG и FimH_PGDGN_DG_Ferritin характеризовались сходными титрами IgG, однако NP-кандидат демонстрировал более однородный и компактный ответ после дозы II. Этот результат позволил предположить, что NP вызывали более ранний эффективный ответ по сравнению с кандидатом, экспрессируемым в виде рекомбинантного белка. FimH_PGDGN_DG_Ferritin, взятый для иммунизации в двух разных дозах (15 мкг и 3 мкг), показал, что более низкая доза (3 мкг) была сопоставима с более высокой дозой (15 мкг) в отношении общего ответа IgG, что указывает на то, что наночастицы ферритина, несущие рекомбинантный белок FimH_DG_PGDGN, обладали хорошей иммуногенностью даже в более низкой исследованной дозе 3 мкг. Кроме того, содержащая ферритин форма приводила к иммунному ответу с меньшим разбросом после второй дозы по сравнению с другими кандидатами, включая соответствующую в остальном конструкцию FimH, не содержащую домена в форме наночастицы (Фиг. 11).

Стабилизированные FimH-DG-кандидаты (продуцируемые в системе млекопитающих) демонстрируют более сильную способность ингибировать адгезию бактерий по сравнению с рекомбинантной (продуцируемой бактериями) формой

Способность сывороток, полученных против стабилизированных FimH-кандидатов, препятствовать адгезии бактерий к клеткам мочевого пузыря человека исследовали с использованием анализа ингибирования бактерий *in vitro*. Антитела к вакцинам-кандидатам FimH_PGDGN_DG и FimH_PGDGN_DG_Ferritin были более эффективны, чем антитела к FimH_DNKQ_DG или продуцируемому бактериями кандидату FimHL-cys, в отношении ингибирования адгезии бактерий к уротелиальным клеткам. Эти результаты показывают, что стабилизированные вакцины-кандидаты на основе FimH, экспрессированные в системе млекопитающих, имеют большой потенциал для дальнейшей разработки вакцин. Кроме того, линкер, использованный для стабилизации FimH, играл ключевую роль в функциональности полученных антител (Фиг. 12), при этом конструкции, содержащие линкер PGDGN, были ассоциированы с улучшенными результатами в отношении ингибирования адгезии бактерий.

Выводы

В настоящем исследовании были изучены новые FimH-кандидаты,

стабилизированные посредством стратегии использования донорной цепи. Вакцины-кандидаты были получены в виде индивидуальных рекомбинантных белков или собранных в наночастицы субъединиц, несущих FimH. Поскольку экспрессия в *E. coli* приводила к образованию нерастворимых продуктов, экспрессия растворимого антигена была обеспечена за счет использования системы экспрессии млекопитающих путем временной трансфекции клеток EXP1293-GNT1. Насколько известно авторам настоящего изобретения, эта система экспрессии никогда ранее не была использована для получения бактериальных белков. В этом случае система экспрессии млекопитающих улучшала растворимость белков, поскольку FimH, экспрессированные в *E. coli*, были нерастворимыми во всех исследованных условиях. Эта система экспрессии обеспечила получение всех стабилизированных антигенов FimH_DG в растворимой форме, а также различных наночастиц FIMH (FimHL-mI3, FimHL-Ferritin и FimHH_DG_PGDGN-ferritin). Напротив, когда нестабилизированный FimH был слит с NP, экспрессия не была обнаружена, что свидетельствует о том, что стабилизация посредством комплементирующей цепи FimG является необходимой для получения полноразмерного выделенного белка FimH в клетках млекопитающих и для экспонирования антигена на NP ферритина. Делеция двух остатков глицина, которые являются природным линкером между FimHL и FimHP, не приводила к экспрессии FimH_ΔGG_PGDGN_DG, содержащего дополнительные N-концевые АА, что позволяет предположить, что эта делеция была неблагоприятной для стабильности белка.

Сравнение MW бактериальных нерастворимых белков и соответствующих белков, экспрессированных в клетках млекопитающих, посредством SDS-PAGE показало, что они имели разную молекулярную массу, что позволяет предположить, что белки, экспрессированные в клетках млекопитающих, являются гликозилированными, как подтвердила обработка ПНГазой. Все конструкции с лидерной последовательностью (лидерная последовательность IgK мыши сама по себе или содержащая дополнительные аминокислоты) успешно секретировали конструкции FimH в среду для экспрессии. Однако ни одна из конструкций, содержащих дополнительные аминокислоты, не обеспечивала получение более однородных наночастиц (Фиг. 7 и Фиг. 9), и не были обнаружены «голые» NP ферритина.

Структурные данные подтвердили, что все наночастицы были правильно собраны, и были обнаружены шипы FimH на поверхности наночастиц ферритина (24 шипа) и mI3 (60 шипов).

Полученные авторами настоящего изобретения данные позволили предположить, что стабилизированные FimH-кандидаты, экспрессированные в системе млекопитающих, являлись иммуногенными, и образовавшиеся антитела были способны ингибировать адгезию бактерий к уротелиальным клеткам.

Эффект адьюванта AS01: улучшение в отношении FimHC и FimH-DG

Для оценки роли систем адьювантов PHAD и AS01 в развитии гуморального ответа белковый комплекс FimHC использовали в качестве модельного антигена и экспрессировали, как описано в Langermann S, et al. Science. 1997 Apr 25;276(5312):607-11. Определяли антитела IgG, образовавшиеся после вакцинации, и относительные титры наносили на график как функцию количества MPL, содержащегося в составах PHAD и AS01. В целом, AS01 индуцировал более сильный общий ответ IgG, чем PHAD, в сыворотках (после дозы 3) и моче (после доз 2 и 3) мышей. Более того, AS01B, использованный с 5 мкг MPL, обеспечивал такой же уровень IgG по сравнению с PHAD, содержащим 12,5 мкг MPL (Фиг. 17 А и Фиг. 17 В).

Улучшенная конструкция антигена и композиция с добавлением адьюванта вызывают функциональный иммунный ответ после введения 2 доз (вместо 3)

Для оценки иммунного ответа на комплекс FimHC и меченные His формы стабилизированного FimH (FimHDG, то есть FimH-PGDGN-DG, где DG обозначает комплементирующий пептид донорной цепи из FimG, FimHDG-Ferritin, то есть FimH-PGDGN-DG-линкер (с His-меткой)-Ferritin (из *H. pylori*)), различные дозы антигена (0,55 мкг или 1,6 мкг) с добавлением адьюванта PHAD или AS01 использовали для иммунизации мышей. Комплекс FimHC экспрессировали, как описано в Langermann S, et al. Science. 1997 Apr 25;276(5312):607-11. Белки экспрессировали в бактериальных системах или системах млекопитающих. После второй и третьей инъекций вакцин определяли титры FimH-специфичных общих IgG (посредством ELISA) в сыворотках и моче иммунизированных мышей. После дозы 2 и после дозы 3 определяли титры IgG в сыворотках, полученных против различных форм кандидата FimHDG, приготовленных с добавлением AS01 (Фиг. 18А). Значения титров IgG сравнивали со значениями, полученными при вакцинации FimHC, используемым в комбинации с тем же адьювантом AS01 и PHAD (с количествами MPL, сопоставимыми с количествами, присутствующими в AS01). Как показано на Фиг. 18А, при дозе антигена 0,55 мкг наблюдали явное усиление гуморального иммунного ответа на FimHC для AS01 по сравнению с PHAD после второго и третьего введений. Кроме того, наблюдали лучший

иммунный ответ на FimHDG-HisTag, экспрессированный в системе с использованием клеток бактерий и очищенный из нее, по сравнению с эталонным FimHC с добавлением адьюванта PHAD.

Наконец, оба стабилизированных FimH-кандидата, очищенные из клеток млекопитающих (FimHDG-HisTag, экспрессированный в клетках млекопитающих, и FimHDG-His Tag Ferritin), демонстрировали более сильный ответ, чем FimHDG, экспрессированный в *E. coli*. Как 1,6 мкг, так и 0,55 мкг конструкций FimHDG для экспрессии в клетках млекопитающих индуцировали уровни IgG, которые выходили на плато после второй и третьей иммунизаций. Кроме того, FimHDG при втором введении вызывал более сильный ответ по сравнению с 3 дозами FimHC-PHAD для обеих исследованных доз белков (отношение средних геометрических значений составляло 9,7 и 3, соответственно) (Фиг. 18А). Гуморальный иммунный ответ против FimHDG оценивали в моче, собранной после первой, второй и третьей доз в иммунизированных более высокой дозой белков группах. Было обнаружено, что в исследованных сыворотках более высокие титры IgG определялись у мышей, которых вакцинировали композициями FimHDG, экспрессированными в клетках млекопитающих (Фиг. 18В).

Для выбранных иммунизированных групп также определяли общий ответ IgG после дозы I. После дозы I наночастицы FimHDG-Ferritin индуцировали в два раза более высокие GMT, чем FimHDG без ферритина (при любой дозе антигена), хотя вариабельность была выше, чем в ответах после дозы 2 и после дозы 3 (что приводило к широкому 95% CI, включающему 1).

По сравнению с полученным в бактериях антигеном, форма, экспрессированная в клетках млекопитающих, с адьювантом ASO1 индуцировала более сильные ответы IgG после введения доз I и II (наблюдаемые отношения GMR (средних геометрических значений) находились в диапазоне от 7,1 до 60,8, при этом все нижние границы 95% CI превышали 1), тогда как после введения третьей дозы ответы были сходными (наблюдаемые GMR составляли приблизительно 1,5 раза) (Фиг. 19).

Сравнение различных линкеров конструкций (для экспрессии в клетках млекопитающих/бактерий) с точки зрения относительной активности

Для исследования эффекта различных линкеров FimHDG-кандидаты, экспрессированные в как в бактериальных системах, так и в системах млекопитающих, сравнивали с FimHC в отношении ингибирования адгезии бактерий к уроэпителиальным клеткам (BAI). На Фиг. 20 показано, что все конструкции FimHDG были более

функциональными, чем FimHC, независимо от используемой для их экспрессии системы (бактериальной или млекопитающих). Следует отметить, что конструкции FimHDG, содержащие линкер PGDGN, были более эффективными по сравнению с конструкциями с DNKQ. Эти данные позволяют предположить, что линкеры могут стабилизировать FimH в разных конформациях, которые, как следствие, вызывают разный ответ с образованием функциональных антител. Анализ ВАИ был разработан как анализ с множественными разведениями, в ходе которого исследуемые образцы совместно с эталонным пулом сывороток высевали при различных концентрациях для построения кривых зависимости ответа от дозы. Сигнал нормализовали между 0% и 100% перед расчетом титров. Титр выражали как относительную активность (RP) исследуемого образца по сравнению с эталонным пулом, которую определяли путем сравнения соответствующих кривых зависимости ответа от дозы. Более подробно, RP рассчитывали путем логарифмического преобразования значений разведений и подбора 4-параметрической логистической (4PL) модели с ограничениями (описанной в главе 5.3 Европейской фармакопеи), в которой, в соответствии с ограничениями, коэффициенты наклона кривых, верхняя асимптота и нижняя асимптота должны были быть равными для стандартных и исследуемых образцов. RP рассчитывали как соотношение значений EC_{50} для эталона и образца. EC_{50} рассчитывали по точке перегиба кривой, построенной с использованием 4PL модели с ограничениями, и выполняли обратное (антилогарифмическое) преобразование. Согласно требованиям модели, кривые для эталона и образцов должны были иметь одинаковый коэффициент наклона (параллельность) и одинаковый максимальный и минимальный уровень ответа на крайних участках (линейность). Пригодность предположения о параллельности и линейности определяли для каждого использования модели путем оценивания Р-значения для проверки отклонений от параллельности, Р-значения для проверки отклонений от линейности и соотношения коэффициентов наклона между эталоном и образцом.

FimH-DG вызывает функциональный иммунный ответ по результатам анализов ВАИ, НАИ и связывания конформационного mAb (моноклональное антитело)

Далее оценивали способность антител к FimHDG ингибировать адгезию ExPEC посредством анализа ингибирования бактерий (ВАИ). Данные о функциональности антител показали, что сыворотки, полученные против обеих конструкций FimHDG,

экспрессированных в клетках бактерий и млекопитающих, демонстрировали большую способность ингибировать адгезию бактерий, чем эталонные сыворотки против FimHC. Среди исследованных кандидатов FimHDG-ferritin демонстрировал по меньшей мере в 10 раз большую функциональность по сравнению с аналогичной конструкцией FimHDG (Фиг. 21). Сходные результаты были получены при проведении анализа HAI.

Комплекс FimHC экспрессировали, как описано в Langermann S, et al. Science. 1997 Apr 25;276(5312):607-11. «FimHDG» относится к FimH-PGDGN-DG, где DG обозначает комплементирующий пептид донорной цепи из FimG, «FimHDG-Ferritin» относится к FimH-PGDGN-DG-линкер(с His-меткой)-Ferritin (из *H. pylori*). Анализ ВАИ и расчет относительной активности осуществляли, как описано в предыдущем примере.

Связывание FimHDG и mAb962

Для изучения взаимодействия FimHDG (то есть FimH-PGDGN-DG, где DG обозначает комплементирующий пептид донорной цепи из FimG) и mAb926 (Dagmara I. Kisiela et al. (2015)) был проведен SPR-анализ. Мономерные формы FimHDG (то есть FimH-PGDGN-DG, где DG обозначает комплементирующий пептид донорной цепи из FimG), полученные из бактериальной системы или системы млекопитающих, демонстрировали сходное связывание с mAb с небольшими различиями в профилях ассоциации и диссоциации. FimHDG-Ferritin (FimH-PGDGN-DG-линкер(с His-меткой)-Ferritin (из *H. pylori*)) приводил к более стабильному взаимодействию по сравнению с мономерными формами, возможно, благодаря эффекту мультимеризации с повышенной авидностью. Напротив, более слабое взаимодействие mAb926 с FimHC по сравнению с FimHDG позволило предположить, что последний, как и ожидалось, был стабилизирован в конформации до связывания. Фактически, mAb926 было создано против лектинового домена стабилизированного FimH, обладающего значительно меньшей способностью связывать маннозу (конформация до связывания) (Dagmara I. Kisiela et al., (2013)), тогда как FimC стабилизирует FimH в его растянутой форме, подобной форме после связывания (Sauer et al., (2016), Nature Communications volume 7, Article number: 10738) (Фиг. 22). Комплекс FimHC экспрессировали, как описано в Langermann S, et al. Science. 1997 Apr 25;276(5312):607-11.

Оценка новых линкеров

Получение рекомбинантных белков в клетках млекопитающих

Для получения FimHDG (то есть FimH-PGDGN-DG, где DG обозначает комплементирующий пептид донорной цепи из FimG), а также наночастиц FimHDG, не

содержащих внутренних или С-концевых повторяющихся остатков His, были созданы новые конструкции, содержащие различные линкеры, разделяющие ген FimH_DG и мономер наночастиц (NP). Конструкции FimH-NP для экспрессии в клетках млекопитающих были синтезированы компаниями Geneart или Twist в виде синтетических генов в векторе pCDNA3.4 (LifeTechnologies). Все последовательности были оптимизированы по кодонам для экспрессии в клетках млекопитающих и содержали N-концевую лидерную последовательность для секреции в клеточную среду. Эта последовательность представляет собой лидерную последовательность IgK мыши METDTLLLWVLLLWVPGSTG или лидерную последовательность IgK мыши, за которой следует остаток аспарагиновой кислоты METDTLLLWVLLLWVPGSTGD для оценки значимости этого остатка для эффективной секреции белка. Для получения рекомбинантных FimH-NP клетки Expi293 и/или клетки ExpiCHO трансфицировали векторами экспрессии в соответствии с инструкциями производителя (Life Technologies), и культуральные супернатанты собирали через 5 суток после трансфекции. Очистку белка осуществляли посредством ионообменной хроматографии с последующей стадией очистки посредством препаративной SEC.

Анализ нано-DSF

Для оценки отслеживаемого по флуоресценции разворачивания конструкций FimHDG был проведен анализ нано-DSF. Образцы вручную вносили в стандартные капилляры для нано-DSF в трех повторностях и переносили в устройство для анализа нано-DSF Prometheus NT.48. Для измерения собственной флуоресценции триптофана использовали длину волны возбуждения 280 нм, а эмиссию флуоресценции триптофана измеряли при 330 нм, 350 нм, и определяли отношения для этих длин волн (350 нм/330 нм). Анализ данных осуществляли с использованием управляющего программного обеспечения Prometheus PR (NanoTemper Technologies) и строили график зависимости коэффициента флуоресценции от температуры.

SPR-анализ

Конструкции FimHDG разбавляли рабочим буфером HBS-EP+ (0,01 М HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), 0,15 М NaCl, 0,003 М EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) и 0,05% об./об. Surfactant P20) и иммобилизовали на поверхности сенсорного чипа NTA, который предварительно активировали путем введения 0,5 мМ раствора ионов Ni²⁺ и промывали 3 мМ EDTA. mAb иммобилизовали в концентрации 20 мкг/мл на поверхности сенсорного чипа CM5, покрытого вторичным

антителом к Fc IgG мыши. Каждый образец в фиксированной концентрации 50 нМ вводили на поверхность сенсорного чипа в течение 180 с. Фаза диссоциации продолжалась в течение 600 сек. Наконец, сенсорный чип регенерировали с использованием 10 мМ глицин-HCl, pH 1,7. Эксперименты осуществляли с использованием прибора Biacore T200 (GE Healthcare), и анализ данных осуществляли с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation 3.0 (GE Healthcare).

Результаты:

Для трансфекции клеток EXPI293 и ExpiCHO использовали не содержащий меток полноразмерный стабилизированный белок FimH-DG, содержащий лидерную последовательность к-цепи Ig мыши для секреции, сам по себе и слитый с белковыми NP (ферритина). Накопление секретируемых рекомбинантных белков характеризовали путем определения их экспрессии в культуральных супернатантах через 5 суток после трансфекции посредством SDS-PAGE. Анализ показал, что экспрессия растворимого FimHDG может быть получена на высоком уровне для не содержащей меток конструкции (фигура А) в клетках Expi293 и ExpiCHO. Белки дополнительно очищали из культуральных супернатантов и определяли их биохимические характеристики в сравнении с ранее очищенным меченым His FimHDG и FimHDG, экспрессированным в клетках бактерий и подвергнутым рефолдингу. Не содержащий меток FimHDG был получен из клеток EXpi293 и ExpiCHO с хорошим уровнем чистоты по данным SDS-Page и SE-UPLC. В анализе SDS-Page белки мигрировали в соответствии с более высокой молекулярной массой (приблизительно 42 кДа) по сравнению с теоретической молекулярной массой (31 кДа) вследствие гликозилирования, которое, в отличие от бактериальных клеток, происходит в клетках млекопитающих (Фиг. 23А).

Сворачивание не содержащего меток очищенного FimDG анализировали посредством нано-DSF, в ходе которого определяли температуру плавления и сравнивали ее с температурой, полученной для FimHDG-HIS. FimH-DG демонстрировал хорошую термостабильность в анализе нано-DSF с двумя тепловыми переходами, относящимися к лектиновому (Tm1) и пилиновому (Tm2) доменам, тогда как меченная His молекула FimHDF характеризовалась лишь одним переходом, вероятно, вследствие другой укладки. Кроме того, не содержащие меток белки демонстрировали более высокую стабильность (более высокие значения температуры плавления) в отношении перехода пилинового домена по сравнению с содержащими His-метку молекулами. Фиг. 23В. Укладка меченой His конструкции, отличная от укладки не содержащего меток

FimH DG, вероятно, обусловлена отсутствием как N-концевого остатка аспарагиновой кислоты, так и C-концевой His-метки.

SPR-анализ (Фиг. 23С) для не содержащих меток конструкций FimHDG, продуцируемых клетками млекопитающих, показал, что mAb 926 может связываться с конструкциями с различиями в профиле связывания по сравнению с меченным His белком FimHDG. Более того, не содержащие меток белки FimHDG демонстрируют слабые взаимодействия с mAb VH_475 и маннозой, в противоположность меченному His FimHDG, что согласуется с различной укладкой, наблюдаемой для не содержащей меток конструкции по сравнению с меченным His белком.

Для получения не содержащих меток NP FimHDG-ferritin His-метка была заменена на различные линкеры для разделения молекулы FimHDG и последовательности мономера наночастиц. Сконструированные и исследованные линкеры состоят из гибких остатков, таких как глицин и серин, благодаря чему соединенные белковые домены могут свободно перемещаться друг относительно друга. Авторами настоящего изобретения были исследованы линкеры разной длины, более длинные линкеры могут обеспечивать отсутствие стерического влияния двух соседних доменов друг на друга, но они могут быть более подверженными деградации. Линкер AKFVAAWTLKAAA, также известный как Pan HLA DR-связывающий эпитоп (PADRE), представляет собой пептид, активирующий антигенспецифические CD4+ Т-клетки, который был предложен в качестве эпитопа-носителя, подходящего для применения в разработке синтетических и рекомбинантных вакцин. Линкеры GGGGSLVPRGSGGGGS и EAAAKEAAAKEAAAKA представляют собой жесткие линкеры. Линкер AEAAAKEAAAKEAAAKA, стабилизированный солевыми мостиками Glu-Lys, образует структуру альфа-спирали (Marqusee & Baldwin, 1987). Поскольку не содержащий меток FimHDG и меченный His FimHDG различаются также по наличию начального остатка аспарагиновой кислоты, то некоторые из линкеров также были исследованы в отсутствие и в присутствии N-концевого остатка аспарагиновой кислоты. Плазмиды, кодирующие различные конструкции, использовали для трансфекции клеток Eхr1293. Через 5 суток после трансфекции лишь для конструкций, начинающихся с N-концевого остатка аспарагиновой кислоты (D) (не содержащих меток или содержащих His-метку), была обнаружена зона секретируемого белка в супернатанте, визуализированная в анализе SDS-PAGE (Фиг. 23D). Конструкции FimHDG_HIS_Ferritin 1619SI и 1042SI имеют одинаковую последовательность за исключением начального

остатка аспарагиновой кислоты, но только конструкция 1042SI секретировалась и присутствовала в культуральных супернатантах клеток EXPI, что подтверждает важное значение этого остатка на N-конце FimHDG для обеспечения эффективной секреции наночастиц FimHDG-ferritin. Среди различных исследованных линкеров секретированными оказались только конструкции не содержащих меток FimHDG-ferritin 1623SI и 1627SI из штаммов *E. coli* J96 и 536, которые содержат начальный остаток аспарагиновой кислоты. Также осуществляли анализ посредством вестерн-блоттинга для оценки экспрессии не содержащего меток FimHDG-ferritin 1433SI в отсутствие начального остатка Asp, подтвердивший, что белок экспрессируется во фракции осадка, но при этом не присутствует только в культуральном супернатанте.

Исследования *in silico* стабильности ферритина *E. coli*

Материалы и методы

Эволюционные ограничения для конструирования ферритина *E. coli* на основе последовательности и структуры

Задача этого исследования заключалась в выполнении конструирования симметричных систем, таких как самособирающиеся белковые наночастицы. Этот подход включал введение стабилизирующих мутаций с использованием комбинации основанных на вычислительной физике алгоритмов и эволюционной биоинформатики. Для решения указанной задачи конструирование консенсусной последовательности было выполнено для асимметричной единицы или мономера ферритина *E. coli* (PDB: 1EUM, WorldWideWeb(www.rcsb.org/structure/1EUM)) с использованием программного пакета Rosetta (Alford RF, et al. *J Chem Theory Comput.* 2017 Jun 13;13(6):3031-3048) для конструирования на основе термодинамических параметров, а также избыточных эволюционных гомологов (PSI-BLAST, Altschul SF, et al. *Nucleic Acids Res.* 1997 Sep 1;25(17):3389-402) для ограничения пространства мутаций. Разработанные модели были ограничены симметричным каркасом (DiMaio F, et al. *PLoS One.* 2011;6(6):e20450) для оптимизации энергетических параметров белковых субъединиц на геометрических поверхностях раздела. Далее этот основанный на симметрии конвейер был реализован в модифицированной версии инструмента структурной биоинформатики PROSS (Goldenzweig A, et al. *Mol Cell.* 2016 Jul 21;63(2):337-346), в результате чего был получен список *in silico* стабилизированных последовательностей (SEQ ID NO: 149-152 и **Фиг. 24**).

Экспрессия и очистка белков

Гены, кодирующие различные мутанты стабилизированного ферритина и ферритина дикого типа *E. coli*, клонировали в вектор pET15TEV, который содержал N-концевую 6xHis-метку и сайт для расщепления TEV-протеазой. Компетентные клетки *E. coli* BL21DE3t1r трансформировали плазмидами, кодирующими различные конструкции. Для экспрессии белка клетки выращивали при 20°C в среде HTMC ON (в течение ночи) и подвергали индуцированию с использованием 1 mM IPTG при 20°C в течение 24 часов. Растворимые белки экстрагировали путем химического лизиса с использованием реагента CeLyticTM Express (Sigma Aldrich) и очищали на никель-хелатной колонке с последующей препаративной эксклюзионной хроматографией с использованием колонки Superdex 200[®] Increase 10/300 GL (Cytiva), при этом чистоту подтверждали посредством SDS-PAGE (**Фиг. 25**).

Анализ посредством просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ)

Негативное контрастирование: 5 мкл образцов (разбавленных до 20 нг/мкл) наносили на 30 секунд на медную сеточку с 300 квадратными ячейками, подвергнутую действию тлеющего разряда. После удаления избытка образцов путем промокания сеточку обрабатывали красителем Nano-W (Ted Pella, Inc) в течение 30 секунд для негативного контрастирования. Анализ образцов осуществляли с использованием Tecnai G2 Spirit, и изображения получали с использованием CCD Veleta (**Фиг. 26**).

Анализ ThermoFluor

Анализ ThermoFluor представляет собой быстрый анализ для оценки стабильности белков, основанный на температуре. В соответствии с этим методом каждый образец разбавляли буферным раствором до конечной концентрации 0,2 мг/мл с добавлением 4 мкл красителя SYPRO Orange 1000X (Molecular Probes) до конечного объема 40 мкл. Полученную смесь вносили с использованием пипетки в лунки 96-луночного тонкостенного планшета для ПЦР (полимеразная цепная реакция) (Bio-Rad), при этом в контрольные образцы добавляли воду. Анализ каждого образца выполняли в трех повторностях. Для каждого белка определяли точку плавления (T_m) с использованием линейного изменения температуры от 25°C до 100°C при скорости приращения температуры 1°C в минуту, при этом измерение флуоресценции осуществляли для каждого шага в 1°C. Профиль разворачивания и температуру плавления регистрировали с использованием термоциклера для количественной ПЦР (Stratagene). Все эксперименты DSF осуществляли в трех повторностях. Значения производной интенсивности флуоресценции наносили на график как функцию

температуры, и указанная T_m представляет собой точку перегиба сигмовидной кривой, определенную с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (**Фиг. 27**).

Результаты

Рекомбинантное получение наночастиц стабилизированного in silico ферритина E. coli

Для получения стабилизированной наночастицы из *E. coli*, презентующей стабилизированный специфический антиген *E. coli* (FimHDG, то есть FimH-PGDGN-DG, где DG обозначает комплементирующий пептид донорной цепи из FimG), был выбран и оптимизирован путем расчетов нативный ферритиновый каркас для повторяющегося экспонирования FimH. Подход к конструированию на основании Rosetta поддерживал октаэдрическую симметрию и был сосредоточен на поверхностях раздела между мономером и 23 другими цепями в симметричной системе (**Фиг. 24**). Эта стратегия получения стабилизированного ферритина из *E. coli*, презентующего специфический антиген *E. coli* (FimH), является рациональным подходом для поддержания видоспецифичных или родоспецифичных конструкций путем использования нативного каркаса для повторяющегося экспонирования антигена.

Ферритин WT *E. coli* и четыре мутанта, представляющие все стабилизированные *in silico* последовательности, созданные с использованием PROSS (SEQ ID NO: 149-152), экспрессировались на высоком уровне и являлись растворимыми при получении в виде рекомбинантных меченных His белков в линии клеток *E. coli* (**Фиг. 25**). Конструкции были успешно очищены на стадии аффинной очистки с последующей препаративной эксклюзионной хроматографией. Для всех конструкций собирали пики, соответствующие фракциям с высокой молекулярной массой, и далее подвергали их анализу посредством электронной микроскопии для оценки правильного образования гомогенных и хорошо структурированных наночастиц. Анализ посредством ТЕМ показал, что все образцы содержали правильно свернутые наночастицы ферритина за исключением мутанта 2.5, который характеризовался неоднородной морфологией (**Фиг. 26**).

Для идентификации наиболее стабильной наночастицы ферритина *E. coli* оценивали термостабильность рекомбинантных конструкций ферритина (WT, 0.5, 2, 6) посредством дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF) с использованием красителя Sypro Orange, который связывается с гидрофобными остатками и позволяет обнаруживать появление их на поверхности в процессе разворачивания белка. Белки

ферритина демонстрировали очень высокую термостабильность, как и ожидалось для белковой наноклетки, при этом первый переход с разворачиванием наблюдали при температуре приблизительно 74°C-76°C. Проведенный анализ DSF показал, что мутантный белок (0.5) *E. coli* демонстрировал наибольший сдвиг в процессе термического разворачивания, что обусловило его выбор в качестве предпочтительной конструкции для слияния с антигеном FimHDG на основании этого повышения стабильности.

Получение стабилизированного ферритина *E. coli*, экспонирующего антиген FimHDG, в клетках млекопитающих

Для проверки возможности применения наночастиц стабилизированного и нативного ферритина в качестве каркаса для экспонирования антигена FimHDG (то есть FimH-PGDGN-DG, где DG обозначает комплементирующий пептид донорной цепи из FimG), а также в качестве альтернативы ферритину *H. pylori*, последовательность FimHDG (содержащая последовательность Igk для секреции) была генетически слита с геном стабилизированного ферритина (мутанта 0.5). Указанные две молекулы были разделены посредством линкера, содержащего последовательность из повторяющихся остатков гистидина для обеспечения аффинной очистки рекомбинантных секретлируемых наночастиц из культурального супернатанта клеток млекопитающих. Полученную конструкцию использовали для трансфекции клеток Expi293 Gnti, и накопление секретлируемого рекомбинантного белка характеризовали путем определения его экспрессии в культуральных супернатантах через 5 суток после трансфекции посредством вестерн-блоттинга с использованием антитела к His. Анализ показал, что наночастицы FimHDG-ferritin (мутант 0.5) успешно секретировались в супернатант от культуры клеток. Очищенные наночастицы FimHDG-ferritin (мутант 0.5) визуализировали посредством просвечивающей электронной микроскопии, которая подтвердила правильную морфологию наночастиц стабилизированного ферритина, имеющих размер приблизительно 20 нм и экспонирующих антиген FimHDG на своей поверхности (**Фиг. 28**).

Эти данные указывают на то, что наночастицы стабилизированного ферритина *E. coli*, экспонирующие FimHDG, могут быть успешно получены в клетках млекопитающих, что свидетельствует о возможности создания наночастиц антигенами и каркасами, которые являются нативными для целевого патогена.

Таблица 1(A): Исследованные FimH-NP, экспрессированные в клетках бактерий

Код RIMS	Название белка	Название вектора	Ожидаемая последовательность AA	Метка
1097SI	FIMH_DG_PGDGN_HIS-Ferritin 536	pTrcHis2 A	MFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVG QNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAY GGVLSSFSGTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSR TDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILR QTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVS ARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYL SGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTI IPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVT AGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTTITVNGKVVA KSGSHHHHHHHGGSDIIKLLNEQVNKEMNSSN LYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHA KKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQK AYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWY VAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQ YVKGIAKSRK [SEQ ID NO: 20]	Внут- ренняя His
1064SI	LS-FIMHL-IMX313-HIS	pET21	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAFacktangtaipigg gsanvyvnlapvvvngqnlvvdlstqifchndypetitdyvtlqrgsayg gvlnsfsgtvkyngssypfpttsetprvvynsrtdkpwvvalyltpvssag gvaikagsliavliqrtnnynsddfqfvwniyannndvvvptggSSGS GSGSKKQGDADVCGEVAYIQSVVSDCHVPTAE LRTLLEIRKLFLEIQKLVKVELQGLSKEGGGSGSH HHHHHHH [SEQ ID NO: 21]	C-His
955SI	FIMHL-S24S65-IMX313	pTrcHis2 A	MfaSktangtaipigggsanvyvnlapvvvngqnlvvdlstqifshnd ypetitdyvtlqrgsayggvlnsfsgtvkyngssypfpttsetprvvynsr dkpwvvalyltpvssaggvaikagsliavliqrtnnynsddfqfvwniy annndvvvptggSSGS GSGSKKQGDADVCGEVAYIQSVVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLVKVELQGLSKEGGGSGSHHHHHH [SEQ ID NO: 22]	C-His
954SI	FIMHL-S24S65-foldon-ferritin	pTrcHis2 A	MFASKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVG QNLVVDLSTQIFSHNDYPETITDYVTLQRGSAY GGVLSSFSGTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSR TDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILR QTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGSGYIPE APRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGSGHHHHHH GSGDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYT HSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVP VQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESIN NIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFK DILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRK [SEQ ID NO: 23]	Внут- ренняя
940SI	FIMHL-S24S65-Mi3	pTrcHis2 A	MFASKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVG QNLVVDLSTQIFSHNDYPETITDYVTLQRGSAY GGVLSSFSGTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSR TDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILR	C-His

			QTNNYNSDDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGSGGS GGSMKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKKKAL AVFLGGVHLIEITFTVPDADTVIKELSFLKEMGAI IGAGTVTSVEQARKAVESGAEFIVSPHLDEEISQ FAKEKGVFYMPGVMTPTTELVKAMKLGHTILKL FPGEVVGPFVKAMKGPFPNVKFVPTGGVNLD NVCEWFKAGVLA VGVGSALVKGTPVEVAEKA KAFVEKIRGCTEGSGSGSGSGSHHHHHH [SEQ ID NO: 24]	
939SI	FIMHL- mI3	pTrcHis2 A	MFACTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVG QNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAY GGVLSFSFGTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSR TDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLI AVLILR QTNNYNSDDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGSGGS GGSMKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKKKAL AVFLGGVHLIEITFTVPDADTVIKELSFLKEMGAI IGAGTVTSVEQARKAVESGAEFIVSPHLDEEISQ FAKEKGVFYMPGVMTPTTELVKAMKLGHTILKL FPGEVVGPFVKAMKGPFPNVKFVPTGGVNLD NVCEWFKAGVLA VGVGSALVKGTPVEVAEKA KAFVEKIRGCTEGSGSGSGSGSHHHHHH [SEQ ID NO: 25]	C-His
913SI	FimHL- NOCYS- MI3	pET21	MfaSktangtaipiggsanvyvnlavpavngqnlvvdlstqifshnd ypetitdyvtlqrgsayggvlsnfsqtkysgssypfpttsetprvvynsrt dkpwpvalyltpvssaggvaikagsliavlilrqtnnynsddfqfvwniy anndvvvptggGGSGSGSGSGSMKMEELFKKHKI VAVLRANSVEEAKKKALAVFLGGVHLIEITFTV PDADTVIKELSFLKEMGAIIGAGTVTSVEQARKA VESGAEFIVSPHLDEEISQFAKEKGVFYMPGVMT PTTELVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPFVKAMK GPFPNVKFVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLA VGV GSALVKGTPVEVAEKAKAFVEKIRGCTEGSGSG SGSGSHHHHHH [SEQ ID NO: 26]	C-His
904SI	FimHdelta GG_PG DG N_DG_mi3	pET21	Mfactangtaipiggsanvyvnlavpavngqnlvvdlstqifchndy petitdyvtlqrgsayggvlsnfsqtkysgssypfpttsetprvvynsrt kpwvalyltpvssaggvaikagsliavlilrqtnnynsddfqfvwniya nndvvvptcdvsardvtvlpdygsvpiptvycaksqnlgyylsgtta dagnsiftntasfpaqgvqvltrngtii panntvslgavgtsavslgtan yartggqvtagnvqsii gvtfvyqPGDGNADVTITVNGKVV AKGSGGGGMKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEA KKKALAVFLGGVHLIEITFTVPDADTVIKELSFL KEMGAIIGAGTVTSVEQARKAVESGAEFIVSPHL DEEISQFAKEKGVFYMPGVMTPTTELVKAMKLG HTILKLFPGEVVGPFVKAMKGPFPNVKFVPTG GVNLDNVCEWFKAGVLA VGVGSALVKGTPVE VAEKAKAFVEKIRGCTEGSGSGSGSGSHHHHHH [SEQ ID NO: 27]	C-His
888SI	FimHL-	pET15TE	MGSSHHHHHHHENLYFQGFACKTANGTAIPIGGG	N-His

	GSG4-Ferritin	V	SANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDY PETITDYVTLQRGSAYGGVLSSFSGTVKYNGSS YFPPTTSETPRVVYNSRDTKPWPVALYLTPVSSA GGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDDFQFVWNI YANNDVVVPTGSGGGGGDIKLLNEQVNKEMNS SNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYE HAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIF QKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQ WYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLA DQYVKGIAKSRK [SEQ ID NO: 28]	
887SI	pelBLS-FimHL-mI3	pET22	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAFacktangtaipigg gsanvyvnlavvvnvgqnlvdlstqifchndypetitdyvtlqrgsayg gvlsnfsgtkysgssyfppttsetprvvynsrtdkpwvalyltpvssag gvaikagsliavlilrqttnynsddfqfvwniyandvvvptggGSG MKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKKKALAVF LGGVHLIEITFTVPDADTVIKELSFLKEMGAIIGA GTVTSVEQARKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFAK EKGVFYMPGVMTPTLVKAMKLGHTILKLFPG EVVGPQFVKAMKGFPPNVKFPVPTGGVNLDNVC EWFKAGVLA VGVGSALVKGTPVEVAEKAKAF VEKIRGCTEGSGSGSGSHHHHHH [SEQ ID NO: 29]	C-His
837SI	FimH_DG_Ferritin (GSGGGG)	pET15TE V	MGSSHHHHHENLYFQGDVVVPTGGCDVSAR DVTVTLDPYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYLGS TTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIP ANNTVSLGAVGTSVAVSLGLTANYARTGGQVTA GNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAK GSGGGGGDIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSW CYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNEN NVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISE SINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEV LFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRK [SEQ ID NO: 30]	N-His
836SI	FimHL-C-C-MI3	pET21	MfacktangtaipigggsanvyvnlavCnvgqnCvvdltqifchn dypetitdyvtlqrgsayggvlsnfsgtkysgssyfppttsetprvvynsr tdkpwvalyltpvssaggvaikagsliavlilrqttnynsddfqfvwni yanndvvvptggGSGGGSGSGGSMKMEELFKKHKI VAVLRANSVEEAKKKALAVFLGGVHLIEITFTV PDADTVIKELSFLKEMGAIIGAGTVTSVEQARKA VESGAEFIVSPHLDEEISQFAKEKGVFYMPGVMT PTLVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMK GFPPNVKFPVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLA VGV GSALVKGTPVEVAEKAKAFVEKIRGCTEGSGSG SGSGSHHHHHH [SEQ ID NO: 31]	C-His
835SI	FimHL-C-C-qBeta	pET21	MfacktangtaipigggsanvyvnlavCnvgqnCvvdltqifchn dypetitdyvtlqrgsayggvlsnfsgtkysgssyfppttsetprvvynsr tdkpwvalyltpvssaggvaikagsliavlilrqttnynsddfqfvwni yanndvvvptggGSGGGSGSGGSAKLETVTLGNIG	Без метки

			KDGGKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVPAL EKRVTVSVSQPSRNRKQYKQVKIQNPTACTAN GSCDPSVTRQAYADVTFSTQYSTDEERAFVRT ELAALLASPLLIDAIDQLNPAY [SEQ ID NO: 32]	
--	--	--	---	--

Таблица 1(B): FimH, экспрессированные в *E. coli* в виде индивидуальных рекомбинантных белков

Код RIMS	Название белка	Название вектора	Ожидаемая последовательность AA	Метка
1023SI	FimH_D NKQ_DG citopl pET22b+	pET22b+	MFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQ NLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGG VLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDK PWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNN YNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVT VTLPDYPGSPVIPLTVYCAKSQNLGYILSGTTAD AGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTV SLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSII GVTFVYQDNKQADVTTITVNGKVVAKGSGHHHH HH [SEQ ID NO: 120]	C-His
1024SI	FimH_PG DGN_DG citopl pET22b+	pET22b+	MFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQ NLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGG VLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDK PWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNN YNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVT VTLPDYPGSPVIPLTVYCAKSQNLGYILSGTTAD AGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTV SLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSII GVTFVYQPGDGNADVTTITVNGKVVAKGSGHHH HHH [SEQ ID NO: 121]	C-His
1025SI	FimH_D GG_PG GN_DG citopl pET22b+	pET22b+	MFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQ NLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGG VLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDK PWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNN YNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTCDVSARDVTVT LPDYPGSPVIPLTVYCAKSQNLGYILSGTTADAG NSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSL GAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGV TFVYQPGDGNADVTTITVNGKVVAKGSGHHHHH H [SEQ ID NO: 122]	C-His
1122SI	FimH_PG DGN_DG citopl PET24 Tagless	pET24b(+)	MFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQ NLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGG VLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDK PWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNN YNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVT VTLPDYPGSPVIPLTVYCAKSQNLGYILSGTTAD AGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTV	Без метки

			SLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSII GVTFFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAK [SEQ ID NO: 123]	
	FimH_PG DGN_DG citopl tagless no Met		FACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQN LVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGV LSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKP WPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNN YNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVT VTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYLSGTTAD AGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTV SLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSII GVTFFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAK [SEQ ID NO: 124]	Без метки

Таблица 2: FimH, экспрессированные в клетках млекопитающих в виде индивидуальных рекомбинантных белков и в виде наночастиц

Код RIMS	Название белка		Ожидаемая последовательность AA	Экспрессия	Метка
1096SI	FIMHL-HIS-Mi3 J96	Короткий лидер	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANG TAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDL STQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLS NFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLIL RQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG GSGSHHHHHHHHGGSMKMEELFKKHKIVA VLRANSVEEAKKALAVFLGGVHLEITFT VPDADTVIKELSFLKEMGAIIGAGTVTSVEQ ARKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFAKEKGVF YMPGVMTPTELVKAMKLGHTILKLFPGEV VGPQFVKAMKGPFPNVKFVPTGGVNLNDV CEWFKAGVLA VGVGSALVKGTPVEVAEKA KAFVEKIRGCTE [SEQ ID NO: 33]	Да	Внутренняя HIS
1095SI	FIMHL-HIS-Fer 536	Короткий лидер	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANG TAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDL STQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLS SFSGTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLIL RQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG GSGSHHHHHHHHGGSDIIKLLNEQVNKEM NSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHA AEEYEHAKKLIIFLNENNVVQVLTSSISAPEH KFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIK SKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDK IELIGNENHGLYLADQYVKGIKSRK [SEQ ID NO: 34]	Да	Внутренняя HIS
1043SI	FIMH_D	Корот-	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANG	Да	C-His

	G_PGDN_IMX3_13_HIS_J96	Кий лидер	TAIPIGGGSANVYVN LAPVVNVGQNLVVDL STQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLS NFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLIL RQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG CDVSARDVTVTLDPDYPGSVPIPLTVYCAKS QNLGYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQG VGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSL GLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQP GDGNADVTTITVNGKVVAKGSSGSGSGSKK QGDADVCGEVAYIQSVVSDCHVPTAELRTL LEIRKLFLEIQKLKVELQGLSKEGGGSGSHH HHHH [SEQ ID NO: 35]		
1042SI	FimH_PG_DGN_DG_HIS-Ferritin_j96	Короткий лидер	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANG TAIPIGGGSANVYVN LAPVVNVGQNLVVDL STQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLS NFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLIL RQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG CDVSARDVTVTLDPDYPGSVPIPLTVYCAKS QNLGYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQG VGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSL GLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQP GDGNADVTTITVNGKVVAKSGSHHHHHHHH HGGSDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSS WCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLII FLNENNVVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKA YEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQ WYVAEQHEEEVLFDKILDKIELIGNENHGL YLADQYVKGIASRK [SEQ ID NO: 36]	Да	Внутренняя HIS
1142SI	FIMH_DG_PGDN-HIS-Ferritin_536	Короткий лидер	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANG TAIPIGGGSANVYVN LAPVVNVGQNLVVDL STQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLS SFSGTVKYNSSYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLIL RQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG CDVSARDVTVTLDPDYPGSVPIPLTVYCAKS QNLGYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQG VGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSL GLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQP GDGNADVTTITVNGKVVAKSGSHHHHHHHH HGGSDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSS WCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLII FLNENNVVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKA YEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQ WYVAEQHEEEVLFDKILDKIELIGNENHGL YLADQYVKGIASRK [SEQ ID NO: 37]	Да	Внутренняя HIS
1000SI	FimH_PG	Допол-	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRA	Нет	Внут-

	DGN_DG -HIS- Ferritin J96	Допол- нитель- ные AA	RRTKLALFACKTANGTAIPIGGGSANVYVN LAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETIT DYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYP FPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSS AGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQF VWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLP DYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYSGTTAD AGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPA NNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQV TAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNG KVVAKSGSHHHHHHHHGGSDIIKLLNEQV NKEMNSSNL YMSMSSWCYTHSLDGAGLFL FDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSIS APEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVD HAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFK DILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRK [SEQ ID NO: 38]		ренняя HIS
999SI	FimH_PG DGN_DG -HIS-MI3 j96	Допол- нитель- ные AA	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRA RRTKLALFACKTANGTAIPIGGGSANVYVN LAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETIT DYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYP FPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSS AGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQF VWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLP DYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYSGTTAD AGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPA NNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQV TAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNG KVVAKSGSHHHHHHHHGGSMKMEELFKK HKIVAVLRANSVEEAKKALAVFLGGVHLI EITFTVPDADTVIKELSFLKEMGAIIGAGVT SVEQARKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFAKE KGVFYMPGVMTPTTELVKAMKLGHTILKLF PGEVVGPFVKAMKGPFPNVKFPVPTGGVN LDNVCEWFKAGVLA VGVGSALVKGTPVEV AEKAKAFVEKIRGCTE [SEQ ID NO: 39]	Нет	Внут- ренняя HIS
998SI	FimH_PG DGN_DG -HIS- IMX313 j96	Допол- нитель- ные AA	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRA RRTKLALFACKTANGTAIPIGGGSANVYVN LAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETIT DYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYP FPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSS AGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQF VWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLP DYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYSGTTAD AGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPA NNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQV TAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNG KVVAKGSSGSGSGSKKQGDADVCGEVAYI	Да	C_his

			QSVVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLV VELQGLSKEGGGSGSHHHHHH [SEQ ID NO: 40]		
995SI	FimH_PG DGN_DG _Ferritin (536)	Допол- нитель- ные AA	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRA RRTKLALFACKTANGTAIPIGGGSANVYVN LAPAVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETIT DYVTLQRGSAYGGVLSFSFGTVKYNGSSYP FPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSS AGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQF VWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLP DYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYS GTTAD AGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPA NNTVSLGAVGTS AVSLGLTANYARTGGQV TAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNG KVVAKSGSHHHHHHHHGGSDIHKLLNEQV NKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFL FDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSS APEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNVD HAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFK DILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRK [SEQ ID NO: 41]	Да	Внут- ренняя HIS
936SI	FimH- IMX313 j96	Допол- нитель- ные AA	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRA RRTKLALfacktangtaipigggSANVYVNLAPVVNVGQNL VVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSFGTVKYSGSS YFPPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIA VLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTCDVSARDVTVTLPD YPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYS GTTADAGNSIFTNTASFSPAQGV GVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTS AVSLGLTANYARTGGQV TAGNVQSIIGVTFVYQGGSGSGSGSKKQGDADVCGEVA YIQSVVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLV KVELQGLSKEGGGSGSHHHHHH [SEQ ID NO: 42]	Нет	C-His
935SI	FimH_mi 3 j96	Допол- нитель- ные AA	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRA RRTKLALfacktangtaipigggSANVYVNLAPVVNVGQNL VVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSFGTVKYSGSS YFPPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIA VLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTCDVSARDVTVTLPD YPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYS GTTADAGNSIFTNTASFSPAQGV GVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTS AVSLGLTANYARTGGQV TAGNVQSIIGVTFVYQGGSGGGMKMEELFKKHKIVAVL RANSVEEAKKKALAVFLGGVHLIEITFTVP DADTVIKELSFLKEMGAIIGAGTVTSVEQAR KAVESGAEFIVSPHLDEEISQFAKEKGVFYM PGVMTPTELVKAMKLGHTILKLPGEVVG PFVKAMKGPFPNVKFPVPTGGVNLDNVCEW FKAGVLA VGVGSALVKGTPVEVAEKAKAF VEKIRGCTEGSGSGSGSGSHHHHHHHH [SEQ ID NO: 43]	Нет	C-His

929SI	FIMHL-HIS-mI3 j96	Дополнительные АА	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRA RRTKLALFACKTANGTAIPIGGGSANVYVN LAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETIT DYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYP FPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSS AGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQF VWNIYANNDVVVPTGSGGHHHHHHHHHGS GSMKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKKK ALAVFLGGVHLEITFTVPDADTVIKELSFL KEMGAIIGAGTVTSVEQARKAVESGAEFIV SPHLDEEISQFAKEKGVFYMPGVMTPTELV KAMKLGHTILKLFPEVVGPQFVKAMKGP FPNVKFPVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLA VG VGSALVKGTPVEVAEKAKAFVEKIRGCTE [SEQ ID NO: 44]	Нет	Внутренняя HIS
951SI	FimH_D NKQ_DG _deglyc	Дополнительные АА	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRA RRTKLALFACKTASGTAIPIGGGSANVYVN LAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETIT DYVTLQRGSAYGGVLSDFSGTVKYSGSSYP FPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSS AGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQF VWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLP DYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYLSTGTTAD AGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRDGTIPA DNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQV TAGNVQSIIGVTFVYQDNKQADVTTITVNGK VVAKGS GHHHHHH* [SEQ ID NO: 79]	Да	C-His
932SI	FimH_PG DGN_DG	Дополнительные АА	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRA RRTKLALFACKTANGTAIPIGGGSANVYVN LAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETIT DYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYP FPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSS AGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQF VWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLP DYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYLSTGTTAD AGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPA NNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQV TAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTTITVNG KVVAKGS GHHHHHH* [SEQ ID NO: 80]	Да	C-His
931SI	FimH_D NKQ_DG	Дополнительные АА	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRA RRTKLALFACKTANGTAIPIGGGSANVYVN LAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETIT DYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYP FPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSS AGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQF VWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLP DYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYLSTGTTAD AGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPA	Да	C-His

			NNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQV TAGNVQSIIGVTFVYQDNKQADVTTITVNGK VVAKGSGHHHHHH* [SEQ ID NO: 81]		
930SI	FimH_De ltaGG_P GDGN_D G	Допол- нитель- ные AA	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRA RRTKLALFACKTANGTAIPIGGGSANVYVN LAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETIT DYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYP FPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSS AGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQF VWNIYANNDVVVPTCDVSARDVTVTLDPD PGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYSGLTADAG NSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANN TVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTA GNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTTITVNGKV VAKGSGHHHHHH* [SEQ ID NO: 82]	Нет	C-His
989SI	FimH_D GG_sl	Корот- кий лидер	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANG TAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDL STQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLS NFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLIL RQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTCD VSARDVTVTLDPDYPGSVPIPLTVYCAKSQ NLGYYSGLTADAGNSIFTNTASFSPAQGV VQLTRNGTIIPANN TVSLGAVGTSAVSLGLT ANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQPGD GNADVTTITVNGKVVAKGSGHHHHHH** [SEQ ID NO: 83]	Да	C-His
988SI	FimH_PG DGN_sl	Корот- кий лидер	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANG TAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDL STQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLS NFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLIL RQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG CDVSARDVTVTLDPDYPGSVPIPLTVYCAKS QNLGYYSGLTADAGNSIFTNTASFSPAQ GVGVQLTRNGTIIPANN TVSLGAVGTSAVSL GLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQ PGDGNADVTTITVNGKVVAKGSGHHHHHH* [SEQ ID NO: 84]	Да	C-His
987SI	FimH_D NKQ_sl	Корот- кий лидер	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANG TAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDL STQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLS NFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLIL RQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG CDVSARDVTVTLDPDYPGSVPIPLTVYCAKS QNLGYYSGLTADAGNSIFTNTASFSPAQ GVGVQLTRNGTIIPANN TVSLGAVGTSAVSL	Да	C-His

			GLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQD NKQADVTITVNGKVVAKSGSHHHHHH* [SEQ ID NO: 85]		
1183SI	FIMH_D G_PG DG N_536- MI3	Корот- кий лидер	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANG TAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDL STQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLS SFSGTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLIL RQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG CDVSARDVTVTLDPDYPGSVPIPLTVYCAKS QNLGYYS GTTADAGNSIFTNTASFSPAQG VGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTS AVSL GLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQP GDGNADV TITVNGKVVAKSGSHHHHHHH HGGSMKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAK KKALAVFLGGVHLIEITFTVPDADTVIKELS FLKEMGAIIGAGTVTSVEQARKAVESGAEFI VSPHLDEEISQFAKEKGVFYMPGVMTPTTEL VKAMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKG PFPNVK FVPTGGVNL DNVCEWFKAGVLAV GVGSALVKGTPVEVAEKAKAFVEKIRGCTE * [SEQ ID NO: 86]	Да	Внут- ренняя HIS
1184SI	FIMH_D G_PG DG N_536- encapsuli ne	Корот- кий лидер	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANG TAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDL STQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLS SFSGTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLIL RQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG CDVSARDVTVTLDPDYPGSVPIPLTVYCAKS QNLGYYS GTTADAGNSIFTNTASFSPAQG VGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTS AVSL GLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQP GDGNADV TITVNGKVVAKSGSHHHHHHH HGGSMFLKRSFAPL TEKQWQEIDNRAREI FKTQLYGRKFV DVEGYPY GWEYAAHPLGEV EVLSDENEVVKWGLR KSLPLIELRATFTLD LWELDNLERGKPNVDLSSLEETVRKVAEFE DEVIFRGCEKSGVKGLLSFEERKIECGSTPK DLLEAIVRALSIFSKD GIEGPYTLVINTDRWI NFLKEEAGHYPLEKRVEECLRGGKIITPRI EDALVVSERGGDFKLILGQDLSIGYEDREK DAVRLFITETFTFQVVNPEALILLKF* [SEQ ID NO: 87]	Да	Внут- ренняя HIS
1127SI	HBcFIM HLJ96	Корот- кий лидер	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDDIDPYKEF GASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREA LESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATW VGSNLEDPGSGGGGFACKTANGTAIPIGGG SANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCH	Нет	C-His

			NDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTV KYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPV ALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNN YNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGGSGGA SRELVVSYVNVNMGLKIRQLLWFHISCLTF GRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILS TLPETT VVGSGGGGHHHHH* [SEQ ID NO: 88]		
1126SI	HBcFIM HDGJ96	Корот- кий лидер	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDDIDPYKEF GASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREA LESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATW VGSNLEDPGSGGGGFACKTANGTAIPIGGG SANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCH NDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTV KYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPV ALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNN YNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSA RDVTVTLDPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGY YLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQL TRNGTIIPANNTVSLGAVGTS AVSLGLTAN YARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGN ADV TITVNGKVVAKGSGGGGASRELVVSY VNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEY LVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETT VV GSGGGGHHHHH [SEQ ID NO: 89]	Het	C-His
	D_FimH DG_Fer_ GSG4	Линкер GSGGG GG	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANG TAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDL STQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLS NFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLIL RQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG CDVSARDVTVTLDPDYPGSVPIPLTVYCAKS QNLGY YLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQG VGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTS AVSL GLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQP GDGNADV TITVNGKVVAKGSGGGGDIKLL NEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDG AGLFLFDHAAEEYEHA KKLIFLNENNV PV QLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISES INNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEE EVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGI AKSRK-- [SEQ ID NO: 129]		
	D_FimH DG_Fer0. 5_deglyc _tagless	Ферри- тин 0.5 <i>E. coli</i> без метки	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTAQG TAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDL STQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLS QFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLIL RQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG		

			CDVSARDVTVTLDPDYPGSVPIPLTVYCAKS QNLGYYSGLTADAGNSIFTNTASFSPAQG VGVQLTRQGTIIPAQNTVSLGAVGTSAVSL GLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQP GDGNADVTTITVNGKVVAKGSGGGGGGML KPEMIEKLNEQMNLELYSSLLYQQMSAWC SYHGFEGAAFLRRHAQEEMTHMQRLFDY LTDGTLPRIDTIPSPFAEYSSLDELQFQETK HEQLITQKINELAHAAMTNQDYPTFNFLQW YVAEQHEEEKLFSIIDKLSLAGKSGEGLYF IDKELSTLDTQN---- [SEQ ID NO: 130]		
FimHDG _deglyc_t agless	Мутация N-->Q для предот- враще- ния гликози- лирова- ния		METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTAQGT AIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLS TQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLS QFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLIL RQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG CDVSARDVTVTLDPDYPGSVPIPLTVYCAKS QNLGYYSGLTADAGNSIFTNTASFSPAQG VGVQLTRQGTIIPAQNTVSLGAVGTSAVSL GLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQP GDGNADVTTITVNGKVVAK---- [SEQ ID NO: 131]		
D_FimH DG_degl yc_tagles s	Началь- ный D; мутация N-->Q для предот- враще- ния гликози- лирова- ния		METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTAQG TAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDL STQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLS QFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLIL RQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG CDVSARDVTVTLDPDYPGSVPIPLTVYCAKS QNLGYYSGLTADAGNSIFTNTASFSPAQG VGVQLTRQGTIIPAQNTVSLGAVGTSAVSL GLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQP GDGNADVTTITVNGKVVAK---- [SEQ ID NO: 132]		
FimHDG _N7Q_ta gless			METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTAQGT AIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLS TQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLS NFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLIL RQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG CDVSARDVTVTLDPDYPGSVPIPLTVYCAKS QNLGYYSGLTADAGNSIFTNTASFSPAQG VGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSL GLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQP GDGNADVTTITVNGKVVAK---- [SEQ ID NO: 133]		
D_FimH	Мутация		METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTAQGT		

	DG_Fer_deglyc_tagless	N-->Q для предотвращения гликозилирования	TAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSQFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLDPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRQGTIIPAQNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTTITVNGKVVAKSGSGSGGGGGSDIIKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNNVVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIKSRK---- [SEQ ID NO: 134]		
	FimH_PG_DGN_DG_GGS4-Ferritnj96	FimHDG без метки	METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLDPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTTITVNGKVVAKGGSGGSGGGSGSDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNNVVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIKSRKS* [SEQ ID NO: 135]		
1397SI	FimH_PG_DGN_DG_j96	FimHDG без метки	METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLDPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTTITVNGKVVAK [SEQ ID NO: 136]		
	FIMHDG_PADRE-encapsuli	Линкер PADRE	METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSS		

ne536		<p>FSGTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDK PWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILR QTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGC DVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQ NLGYLLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGV GVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLG LTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQPG DGNADVTTITVNGKVVAKFVAAWTLKAAA MEFLKRSFAPLTEKQWQEIDNRAREIFKTQ LYGRKFVDVEGPYGWEYAAHPLGEVEVLS DENEVVKWGLRKSPLIELRATFTLDLWEL DNLERGKPNVDLSSLEETVRKVAEFEDEVIF RGCEKSGVKGLLSFEERKIECGSTPKDLLEA IVRALSIFSKDIEGPYTLVINTDRWINFLKE EAGHYPLEKRVEECLRGGKIITTPRIEDALV VSEGGDFKLILGQDLSIGYEDREKDAVRL FITETFTFQVVNPEALILLKF- [SEQ ID NO: 137]</p>		
FIMH_N OD- FERRIT N_J96	Комп- лексный линкер, содержа- щий G, S и H	<p>METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTANGT AIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLS TQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLS NFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLIL RQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG CDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKS QNLGYLLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQG VGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSL GLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQP GDGNADVTTITVNGKVVAKSGSHHHGSGGG GGSDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSW CYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFL NENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYE HEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWY VAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLA DQYVKGIAKSRK [SEQ ID NO: 138]</p>		
FIMH_D G_NOAL FA- ferritin_J 96	Жесткий линкер	<p>METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTANGT AIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLS TQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLS NFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLIL RQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG CDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKS QNLGYLLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQG VGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSL GLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQP GDGNADVTTITVNGKVVAKGGGSLVPRGS GGGGSDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSS WCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFL</p>		

			FLNENNVVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS-- [SEQ ID NO: 139]		
FIMH_N OD_S_HI S_FERRI TN_J96	HIS линкер- конце- вые SRKS		METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTANGT AIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLS TQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLS NFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLIL RQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG CDVSARDVTVTLDPDYPGSVPIPLTVYCAKS QNLGYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQG VGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTS AVSL GLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQP GDGNADVTTITVNGKVVAKSGSHHHHHHH HGGSDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSS WCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLI FLNENNVVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS-- [SEQ ID NO: 140]		
FIMH_D G_PGDN- PADRE- Ferritin53 6			METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTANGT AIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLS TQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLS FSGTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDK PWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILR QTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGC DVSARDVTVTLDPDYPGSVPIPLTVYCAKSQ NLGYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGV GVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTS AVSLG LTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQPG DGNADVTTITVNGKVVAKSGSFVAAWTLKA AAGGSDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSS WCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLI FLNENNVVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS- [SEQ ID NO: 141]		
fimh- DG_ferrit ina- linkerAlp ha	Жесткий линкер		METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTANGT AIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLS TQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLS NFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLIL RQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG CDVSARDVTVTLDPDYPGSVPIPLTVYCAKS QNLGYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQG VGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTS AVSL GLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQP		

			GDGNADVTTITVNGKVVAKAEAAAKEAAA KEAAAKADIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMS MSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAK KLIIFLNENNVVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIF QKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFN FLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNEN HGLYLADQYVKGIAKSRKS-- [SEQ ID NO: 142]		
FIMH- PADRE- Ferritin53 6_noSpaces	Линкер PADRE		METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTANGT AIPIGGGSANVYVNLAPVNVGQNLVVDLS TQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLS FSGTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDK PWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILR QTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGC DVSARDVTVTLDPDYPGSVPIPLTVYCAKSQ NLGYLLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGV GVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLG LTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQPG DGNADVTTITVNGKVVAKFVAAWTLKAAA DIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYT HSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNEN NVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQ HISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAE QHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQY VKGIAKSRKS-- [SEQ ID NO: 143]		
FIMH_D G_GSG4- ferritin_J 96			METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANGT TAIPIGGGSANVYVNLAPVNVGQNLVVDL STQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLS NFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLIL RQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG CDVSARDVTVTLDPDYPGSVPIPLTVYCAKS QNLGYLLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQG VGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSL GLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQP GDGNADVTTITVNGKVVAKSGSGSGGGGGG SDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYT HSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNEN NVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQ HISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAE QHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQY VKGIAKSRK-- [SEQ ID NO: 144]		
FIMH_D G_PGDN- SGS_PADRE- Ferritinj9			METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTANGT AIPIGGGSANVYVNLAPVNVGQNLVVDLS TQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLS NFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLIL RQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG		

6			<p>CDVSARDVTVTLDPDYPGSPVIPLTVYCAKS QNLGYLSTGTTADAGNSIFTNTASFSPAQG VGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSASVSL GLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQP GDGNADVTTITVNGKVVAKSGSFVAAWTLK AAAGGSDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSM SSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKK LIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQ KAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQ WYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGL YLADQYVKGIASRKS- [SEQ ID NO: 145]</p>		
fimh- ferritina- linkerNO Na	Жесткий линкер		<p>METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTANGT AIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLS TQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLS NFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLIL RQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG CDVSARDVTVTLDPDYPGSPVIPLTVYCAKS QNLGYLSTGTTADAGNSIFTNTASFSPAQG VGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSASVSL GLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQP GDGNADVTTITVNGKVVAKGGGSLVPRGS GGGSDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSS WCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIF LNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYE HEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWY VAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYL ADQYVKGIASRKS-- [SEQ ID NO: 146]</p>		
FIMH- Ferritinj9 6_noSpac es	Линкер PADRE		<p>METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTANGT AIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLS TQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLS NFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLIL RQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG CDVSARDVTVTLDPDYPGSPVIPLTVYCAKS QNLGYLSTGTTADAGNSIFTNTASFSPAQG VGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSASVSL GLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQP GDGNADVTTITVNGKVVAKFVAAWTLKAA ADIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCY THSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNE NNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHE QHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVA EQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQ YVKGIASRKS-- [SEQ ID NO: 147]</p>		
FIMH_D G_PG DG	C N- конце-		<p>METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANG TAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDL</p>		

N-GGS4-Ferritin536	Выим D	STQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLS SFSGTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLIL RQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG CDVSARDVTVTLDPDYPGSVPIPLTVYCAKS QNLGYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQG VGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSL GLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQP GDGNADVTVTITVNGKVVAKGGSGGSGGSGG SDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYT HSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNEN NVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQ HISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAE QHHEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQY VKGIAKSRK- [SEQ ID NO: 148]		
FimH_D G, сли- тый со стабили- зированной феррити- ном 0.5 <i>E. coli</i>		METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANG TAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDL STQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLS SFSGTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLIL RQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG CDVSARDVTVTLDPDYPGSVPIPLTVYCAKS QNLGYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQG VGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSL GLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQP GDGNADVTVTITVNGKVVAKSGSHHHHHHH HGGSMKPEMIEKLNEQMNLELYSSLLYQ QMSAWCSYHGFEGAAFLRRHAQEEMTH MQRLFDYLTDTGNLPRIDTIPSPFAEYSSLD ELFQETYKHEQLITQKINELAHAAMTNQDY PTFNFLQWYVAEQHHEEKLFKSIIDKLSLAG KSGEGLYFIDKELSTLDTQN- [SEQ ID NO: 153]		

Таблица 3 – последовательности нуклеиновых кислот конструкций

FIMH_ DG_536 - 1EUM_ 0_5	ATGGAAACCGATACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAG GCTCTACAGGCGATTTTGCCTGCAAGACCGCCAACGGCACAGCCATTCC TATTGGCGGAGGCAGCGCCAATGTGTACGTTAACCTGGCTCCTGCCGTG AACGTGGGCCAGAATCTGGTGGTGGATCTGAGCACCCAGATCTTTTGCC ACAACGACTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAG GCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGTCTAGCTTTAGCGGCACCGTGAAGTA CAACGGCAGCAGCTACCCATTTCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTG GTGTACAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGA CACCTGTTAGTTCTGCCGGCAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATT GCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACACTACAACAGCGACGACTTCC AGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGG CGGATGTGATGTGTCCGCCAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTAC
--------------------------------------	---

	<p>CCCGGCTCTGTGCCTATTCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGAGCCAGA ACCTGGGCTACTACCTGTCTGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCAT CTTTACCAACACCGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAG CTGACCCGGAACGGAACAATCATCCCCGCAACAATAACCGTGTCTCTGG GAGCTGTGGGCACCTCTGCTGTGTCTCTTGGCCTGACAGCCAATATGCC AGAACAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGC GTGACCTTCGTGTATCAGCCTGGCGACGGAAACGCCGATGTGACCATCA CAGTGAATGGCAAGGTGGTGGCCAAGAGCGGAAGCCACCACCATCATC ACCATCACCACGGCGGCTCTATGCTGAAGCCCAGATGATCGAGAAGCT GAACGAGCAGATGAACCTGGAAGTGTACAGCTCCCTGCTGTACCAGCAG ATGAGCGCCTGGTGTAGCTATCACGGATTTGAGGGCGCTGCCGCCTTTCT GAGAAGGCACGCCAAGAGGAAATGACCCACATGCAGCGGCTGTTTGA CTACCTGACCGATAACGGCAATCTGCCCAGAATCGACACAATCCCATCT CCATTCGCCGAGTACAGCAGCCTGGACGAGCTGTTCCAAGAAACCTACA AGCACGAGCAGCTGATCACCAGAAGATCAACGAACTGGCCCATGCCG CCATGACCAACCAGGACTACCCTACCTTCAACTTCTGCAGTGGTACGT GGCCGAGCAGCAGGGAAGAGAAGCTGTTCAAGAGCATCATCGACAA GCTGAGCCTGGCCGAAAGTCTGGCGAGGGCCTGTACTTTATCGACAAA GAGCTGAGCACACTGGATACCCAGAAGTGA [SEQ ID NO: 45]</p>
<p>FIMH_ DG_PG DGN_53 6-MI3</p>	<p>ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAG GCTCTACAGGCGATTTTGCCTGCAAGACCGCCAACGGCACAGCCATTCC TATTGGCGGAGGCAGCGCCAATGTGTACGTTAACCTGGCTCCTGCCGTG AACGTGGGCCAGAATCTGGTGGTGGATCTGAGCACCCAGATCTTTTGCC ACAACGACTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAG GCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGTCTAGCTTTAGCGGCACCGTGAAGTA CAACGGCAGCAGCTACCCATTTCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTG GTGTACAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGA CACCTGTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATT GCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACACTACAACAGCGACGACTTCC AGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGG CGGATGTGATGTGTCCGCCAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTAC CCCGGCTCTGTGCCTATTCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGAGCCAGA ACCTGGGCTACTACCTGTCTGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCAT CTTTACCAACACCGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAG CTGACCCGGAACGGAACAATCATCCCCGCAACAATAACCGTGTCTCTGG GAGCTGTGGGCACCTCTGCTGTGTCTCTTGGCCTGACAGCCAATATGCC AGAACAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGC GTGACCTTCGTGTATCAGCCTGGCGACGGAAACGCCGATGTGACCATCA CAGTGAATGGCAAGGTGGTGGCCAAGAGCGGAAGCCACCACCATCATC ACCATCACCACGGCGGCAGCATGAAGATGGAAGAAGTGTCAAGAAGC ACAAGATCGTCGCCGTGCTGCGGGCCAATTCTGTGGAAGAGGCCAAAAA AAAGGCCCTGGCCGTGTTTCTTGGCGGAGTGCACCTGATCGAGATCACC TTTACCGTGCCTGACGCCGACACCGTGATCAAAGAGCTGAGCTTCTGA AAGAGATGGGCGCCATCATCGGAGCCGGCACAGTGACATCTGTTGAGCA GGCCAGAAAGGCCGTGGAATCTGGCGCCGAGTTTATCGTGTCCCCTCAC CTGGATGAGGAAATCAGCCAGTTCGCCAAAGAAAAGGGCGTGTCTACA TGCCCGGCGTGATGACACCTACAGAGCTGGTCAAAGCCATGAAGCTGGG CCACACCATCCTGAAGCTGTTTCCAGGCGAAGTCGTGGGCCCTCAGTTC</p>

	GTGAAAGCTATGAAGGGCCATTTCCAAACGTGAAGTTCGTGCCACTG GCGGCGTGAACCTGGATAATGTGTGCGAGTGGTTCAAGGCTGGCGTGCT GGCTGTTGGAGTTGGCTCTGCTCTGGTCAAGGGCACACCTGTGGAAGTG GCTGAGAAGGCCAAGGCCTTCGTGGAAAAGATCAGAGGCTGCACCGAG TGA [SEQ ID NO: 46]
FIMH_ DG_PG DGN_53 6- encapsul ine	ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAG GCTCTACAGGCGATTTTGCCTGCAAGACCGCCAACGGCACAGCCATTCC TATTGGCGGAGGCAGCGCCAATGTGTACGTAACTGGCTCCTGCCGTG AACGTGGGCCAGAATCTGGTGGTGGATCTGAGCACCAGATCTTTTGCC ACAACGACTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAG GCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGTCTAGCTTTAGCGGCACCGTGAAGTA CAACGGCAGCAGCTACCCATTTCTACCACCAGCGAGACACCAGAGTG GTGTACAACAGCAGAACCAGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGA CACCTGTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATT GCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACACTACAACAGCGACGACTTCC AGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGG CGGATGTGATGTGTCCGCCAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTAC CCCGGCTCTGTGCCTATTCCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGAGCCAGA ACCTGGGCTACTACCTGTCTGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCAT CTTTACCAACACCGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAG CTGACCCGGAACGGAACAATCATCCCCGCCAACAATACCGTGTCTCTGG GAGCTGTGGGCACCTCTGCTGTGTCTCTTGGCCTGACAGCCAACACTATGCC AGAACAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGC GTGACCTTCGTGTATCAGCCTGGCGACGGAAACGCCGATGTGACCATCA CAGTGAATGGCAAGGTGGTGGCCAAGAGCGGAAGCCACCACCATCATC ACCATCACACGGCGGCAGCATGGAATTTCTGAAGAGAAGCTTCGCCCC ACTGACCGAGAAGCAGTGGCAAGAGATCGACAACCGGGCCAGAGAGAT CTTCAAGACCCAGCTGTACGGCCGGAAGTTCGTGGATGTGGAAGGCCCT TATGGCTGGGAGTATGCCGCTCATCCTCTGGGCGAAGTGGAAAGTGCTGA GCGACGAGAATGAGGTCGTGAAGTGGGGCCTGAGAAAGAGCCTGCCTC TGATCGAGCTGAGAGCCACCTTCACACTGGACCTGTGGGAACTCGACAA CCTGGAAAGGGGCAAGCCCAATGTGGACCTGAGCAGCCTGGAAGAGAC AGTGCGGAAGGTGGCCGAGTTCGAGGACGAAGTGATCTTCAGAGGCTG CGAGAAGTCTGGCGTGAAGGGCCTGCTGAGCTTCGAGGAACGGAAGAT CGAGTGTGGCAGCACCCCTAAGGATCTGCTGGAAGCCATCGTGCGGGCC CTGAGCATCTTCTCTAAGGATGGCATCGAGGGCCCCTACACACTGGTCA TCAACACCGACCGGTGGATCAACTTCCTGAAAGAGGAAGCCGGCCACTA TCCTCTGGAAAAGCGCGTGGAAGAGTGCCTGAGAGGCGGCAAGATCAT CACAACCCCTAGAATCGAGGACGCCCTGGTGGTTTCTGAGAGAGGCGGA GACTTCAAGCTGATCCTTGGCCAGGACCTGTCCATCGGCTACGAGGACA GAGAAAAGACGCCGTGCGGCTGTTTCATACCGAAACCTTCACCTTCCA AGTGGTCAACCCCGAGGCTCTGATTCTGCTGAAGTTCTGA [SEQ ID NO: 47]
HBcFIM HLJ96	ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAG GATCTACCGGCGACGACATCGACCCCTACAAAGAGTTTGGCGCCAGCGT CGAGCTGCTGAGCTTCTGCCTAGCGACTTCTTCCCTTCCATCCGGGATC TGCTGGATAACCGCTAGCGCCCTGTATAGAGAGGCCCTGGAAAGCCCTGA GCACTGCTCTCCACATCACACAGCCCTGAGACAGGCCATCCTGTGTTGG

	<p>GGCGAACTGATGAATCTGGCCACCTGGGTCGGAAGCAACCTGGAAGATC CTGGTTCTGGCGGCGGAGGCTTTGCCTGTAAAACAGCCAATGGCACCCG CATTCCTATCGGAGGCGGCAGCGCCAATGTGTACGTTAACCTGGCTCCT GTGGTCAACGTGGGCCAGAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCT TTTGCCACAACGACTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCA GAGAGGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTCCGGCACAGTG AAGTACAGCGGCAGCAGCTACCCATTTCTACCACCAGCGAGACACCCA GAGTGGTGTACAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTA CCTGACACCTGTTAGTTCTGCTGGCGGAGTGGCCATCAAGGCCGGATCT CTGATTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACACTACAACAGCGACG ACTTCCAGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCC TACAGGCGGAGGATCTGGCGGAGCTTCTAGAGAACTGGTCGTGTCCTAC GTGAACGTGAACATGGGCCTGAAGATCCGGCAGCTGCTCTGGTTTACA TCAGCTGTCTGACCTTCGGCCGGGAAACCGTGCTGGAATACCTGGTGTC CTTCGGCGTGTGGATCAGAACCCCTCCTGCCTATAGACCTCCTAACGCTC CCATCCTGAGCACACTGCCTGAGACAACAGTTGTTGGAAGCGGAGGCGG AGGCCACCACCATCACCATCAT [SEQ ID NO: 48]</p>
<p>HBcFIM HDGJ96</p>	<p>ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCCG GCAGCACCCGGCGACGACATCGACCCCTACAAGGAGTTCGGCGCCAGCGT GGAGCTGCTGAGCTTCCTGCCAGCGACTTCTTCCCCAGCATCCGGGAC CTGCTGGACACCGCCAGCGCCCTGTACCGGGAGGCCCTGGAGAGCCCCG AGCACTGCAGCCCCACCACACCGCCCTGCGGCAGGCCATCCTGTGCTG GGGCGAGCTGATGAACCTGGCCACCTGGGTGGGCAGCAACCTGGAGGA CCCCGGCAGCGGCGGCGGCGGCTTCGCTGCAAGACCGCCAACGGCACC GCCATCCCCATCGGCGGCGGCAGCGCCAACGTGTACGTGAACCTGGCCC CCGTGGTGAACGTGGGCCAGAACCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGAT CTTCTGCCACAACGACTACCCCGAGACCATCACCGACTACGTGACCCTG CAGCGGGGCAGCGCCTACGGCGGCGTGCTGAGCAACTTCAGCGGCACC GTGAAGTACAGCGGCAGCAGCTACCCCTTCCCCACCACCAGCGAGACCC CCCGGGTGGTGTACAACAGCCGGACCGACAAGCCCTGGCCCCTGGCCCT GTACCTGACCCCCGTGAGCAGCGCCGGCGGCGTGCCATCAAGGCCGGC AGCCTGATCGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACACTACAACAGCG ACGACTTCCAGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGT GCCACCGGCGGCTGCGACGTGAGCGCCCGGACGTGACCGTGACCCTG CCCGACTACCCCGGCAGCGTGCCCATCCCCCTGACCGTGTACTGCGCCA AGAGCCAGAACCTGGGCTACTACCTGAGCGGCACCACCGCCGACGCCG GCAACAGCATCTTACCAACACCGCCAGCTTCAGCCCCGCCAGGGCGT GGGCGTGCAGCTGACCCGGAACGGCACCATCATCCCCGCCAACAACACC GTGAGCCTGGGCGCCGTGGGCACCAGCGCCGTGAGCCTGGGCCTGACCG CCAACACTACGCCCGGACCGGCGGCCAGGTGACCGCCGGCAACGTGCAGA GCATCATCGGCGTGACCTTCGTGTACCAGCCCGGCGACGGCAACGCCGA CGTGACCATCACCGTGAACGGCAAGGTGGTGGCCAAGGGCAGCGGCGG CGGCGGCGCCAGCCGGGAGCTGGTGGTGAAGTACGTGAACGTGAACAT GGGCCTGAAGATCCGGCAGCTGCTGTGGTTCCACATCAGCTGCCTGACC TTCGGCCGGGAGACCGTGCTGGAGTACCTGGTGAAGCTTCGGCGTGTGGA TCCGGACCCCCCGCCTACCGGCCCCCCAACGCCCCATCCTGAGCAC CCTGCCCGAGACCACCGTGGTGGGCAGCGGCGGCGGCGGCCACCACCA CCACCACCAC [SEQ ID NO: 49]</p>

FIMHL- HIS-Mi3 J96	<p>ATGGA AACCGATA CACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAG GCTCTACAGGCGATTTTGCCTGCAAGACCGCCAACGGCACAGCCATTCC TATTGGCGGAGGCAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTGGCTCCTGTGGTC AACGTGGGCCAGAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCC ACAACGACTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAG GCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTCCGGCACAGTGAAGTA CAGCGGCAGCAGCTACCCATTTCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTG GTGTACAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGA CACCTGTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATT GCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACA ACTACAACAGCGACGACTTCC AGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAAG CGGCAGCCACCACCATCATCACCATCACCACGGCGGCAGCATGAAGATG GAAGA ACTGTTCAAGAAGCACAAGATCGTCGCCGTGCTGCGGGCCAATT CTGTGGAAGAGGCCAAAAAAAAGGCCCTGGCCGTGTTTCTTGCGGAGT GCACCTGATCGAGATCACCTTTACCGTGCCTGACGCCGACACCGTGATC AAAGAGCTGAGCTTCTGAAAGAGATGGGCGCCATCATCGGAGCCGGA ACCGTGACATCTGTTGAGCAGGCCAGAAAGGCCGTGGAATCTGGCGCCG AGTTTATCGTGTCCCCTCACCTGGATGAGGAAATCAGCCAGTTCGCCAA AGAAAAGGGCGTGTTCTACATGCCCGGCGTGATGACACCTACAGAGCTG GTCAAAGCCATGAAGCTGGGCCACACCATCCTGAAGCTGTTTCCAGGCG AAGTCGTGGGCCCTCAGTTCGTGAAAGCTATGAAGGGCCATTTCAAA CGTGAAGTTCGTGCCACTGGCGGCGTCAACCTGGATAATGTGTGCGAG TGGTTCAAGGCTGGCGTGCTGGCTGTTGGAGTGGGATCTGCTCTGGTCA AGGGCACACCTGTGGAAGTGGCTGAGAAGGCCAAGGCCTTCGTGGA AGATCAGAGGCTGCACCGAGTGA [SEQ ID NO: 50]</p>
FIMHL- HIS-Fer 536	<p>ATGGA AACCGATA CACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAG GCTCTACAGGCGATTTTGCCTGCAAGACCGCCAACGGCACAGCCATTCC TATTGGCGGAGGCAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTGGCTCCTGCCGTG AACGTGGGCCAGAATCTGGTGGTGGATCTGAGCACCCAGATCTTTTGCC ACAACGACTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAG GCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGTCTAGCTTTAGCGGCACCGTGAAGTA CAACGGCAGCAGCTACCCATTTCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTG GTGTACAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGA CACCTGTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATT GCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACA ACTACAACAGCGACGACTTCC AGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAAG CGGCAGCCACCACCATCATCACCATCACCACGGCGGCAGCGACATCATC AAGCTGCTGAACGAGCAAGTGAACAAAGAGATGAACAGCAGCAACCTG TACATGAGCATGAGCAGCTGGTGCTACACACACAGCCTGGATGGCGCCG GACTGTTCTGTTTGATCATGCCGCCGAGGAATACGAGCACGCCAAGAA GCTGATCATCTTCTGAACGAGAACAACGTGCCCGTGACGCTGACATCT ATCAGCGCCCCTGAGCACAAGTTCGAGGGCCTGACACAGATCTTCCAGA AGGCCTACGAACACGAGCAGCACATCAGCGAGAGCATCAACAACATCG TGGACCACGCCATCAAGAGCAAGGATCACGCCACCTTCAACTTTCTGCA GTGGTACGTGGCCGAACAGCACGAGGAAGAGGTGCTGTTCAAGGACAT CCTGGACAAGATCGAGCTGATCGGCAACGAGAACCACGGCCTGTACCTG GCCGATCAGTATGTGAAGGGAATCGCCAAGAGCCGGAAGTGA [SEQ ID NO: 51]</p>

<p>FIMH_ DG_PG DGN_I MX313_ HIS J96</p>	<p>ATGGA AACCGATA CACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCAG GATCTACAGGGGATTTTGCCTGCAAGACCGCCAATGGCACAGCCATTCC TATTGGCGGGCGGAAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTGGCTCCTGTGGTC AACGTGGGCCAGAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCC ACAACGACTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAG GCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTCCGGCACAGTGAAGTA CAGCGGCAGCAGCTACCCATTTCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTG GTGTACAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGA CACCTGTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATT GCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACA ACTACAACAGCGACGACTTCC AGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGG CGGATGTGATGTGTCCGCCAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTAC CCCGGCTCTGTGCCTATTCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGTCTCAGAA CCTGGGCTACTACCTGAGCGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCATC TTTACCAACACCGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGC TGACCCGGAACGGAACAATCATCCCCGCCAACAATACCGTGTCTCTGGG AGCTGTGGGCACCTCTGCTGTGTCTCTTGGCCTGACAGCCA ACTATGCCA GAACAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGCGT GACCTTCGTGTATCAGCCTGGCGACGGAAATGCCGACGTGACCATCACA GTGAATGGCAAGGTGGTGGCCAAGGGCAGCTCAGGCTCTGGCTCTGGAT CTAAAAACAGGGCGACGCCGATGTGTGTGGCGAGGTGGCATATATCCA GAGCGTGGTGTCCGATTGTCACGTGCCAACCGCCGAGCTGAGAACCCTG CTGGAATCCGGAAGCTGTTCTCGAAATTCAGAAGCTGAAGGTTCGAGC TGCAGGGCCTGTCTAAAGAAGGCGGAGGAAGCGGATCTCACCACCACC ATCACC ACTGATGA [SEQ ID NO: 52]</p>
<p>FimH_P GDGN_ DG_HIS -Ferritin j96</p>	<p>ATGGA AACCGATA CACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCAG GATCTACAGGGGATTTTGCCTGCAAGACCGCCAATGGCACAGCCATTCC TATTGGCGGGCGGAAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTGGCTCCTGTGGTC AACGTGGGCCAGAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCC ACAACGACTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAG GCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTCCGGCACAGTGAAGTA CAGCGGCAGCAGCTACCCATTTCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTG GTGTACAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGA CACCTGTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATT GCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACA ACTACAACAGCGACGACTTCC AGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGG CGGATGTGATGTGTCCGCCAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTAC CCCGGCTCTGTGCCTATTCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGTCTCAGAA CCTGGGCTACTACCTGAGCGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCATC TTTACCAACACCGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGC TGACCCGGAACGGAACAATCATCCCCGCCAACAATACCGTGTCTCTGGG AGCTGTGGGCACCTCTGCTGTGTCTCTTGGCCTGACAGCCA ACTATGCCA GAACAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGCGT GACCTTCGTGTATCAGCCTGGCGACGGAAATGCCGACGTGACCATCACA GTGAATGGCAAGGTGGTGGCCAAGAGCGGAAGCCACCACCATCATCAC CATCACCACGGCGGCAGCATGAAGATGGAAGA ACTGTTCAAGAAGCAC AAGATCGTCGCCGTGCTGCGGGCCAATTCTGTGGAAGAGGCCAAAAA AAGGCCCTGGCCGTGTTTCTTGGCGGAGTGCACCTGATCGAGATCACCT</p>

	TTACCGTGCCTGACGCCGACACCGTGATCAAAGAGCTGAGCTTCCTGAA AGAGATGGGCGCCATCATCGGAGCCGGAACCGTGACATCTGTTGAGCAG GCCAGAAAGGCCGTGGAATCTGGCGCCGAGTTTATCGTGTCCCCTCACC TGGATGAGGAAATCAGCCAGTTCGCCAAAGAAAAGGGCGTGTTCTACAT GCCCCGGCGTGATGACACCTACAGAGCTGGTCAAAGCCATGAAGCTGGGC CACACCATCCTGAAGCTGTTTCCAGGCGAAGTCGTGGGCCCTCAGTTCG TGAAAGCTATGAAGGGCCATTTCCAAACGTGAAGTTCGTGCCACTGG CGGCGTCAACCTGGATAATGTGTGCGAGTGGTTCAAGGCTGGCGTGCTG GCTGTTGGAGTTGGCTCTGCTCTGGTCAAGGGCACACCTGTGGAAGTGG CTGAGAAGGCCAAGGCCTTCGTGGAAAAGATCAGAGGCTGCACCGAGT GATGA [SEQ ID NO: 53]
FIMH_ DG_PG DGN- HIS- Ferritin 536	ATGGA AACGATA CACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCAG GATCTACAGGGGATGTTTGCTGCAAGACCGCCAATGGCACAGCCATTC CTATTGGCGGCGGAAGCGCCAATGTGTACGTAACTGGCTCCTGCCGT GAACGTGGGCCAGAATCTGGTGGTGGATCTGAGCACCCAGATCTTTTGC CACAACGACTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGA GGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGTCTAGCTTTAGCGGCACCGTGAAGT ACAACGGCAGCAGCTACCCATTTCTACCACAGCGAGACACCCAGAGT GGTGTACAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTG ACACCTGTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGA TTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACA ACTACAACAGCGACGACTT CCAGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACA GGCGGATGTGATGTGTCCGCCAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATT ACCCCGGCTCTGTGCCTATTCCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGTCTCAG AACCTGGGCTACTACCTGAGCGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGC ATCTTTACCAACACCGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGC AGCTGACCCGGAACGGAACAATCATCCCCGCCAACAATACCGTGTCTCT GGGAGCTGTGGGCACCTCTGCTGTGTCTCTTGGCCTGACAGCCA ACTAT GCCAGAACAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATC GGCGTGACCTTCGTGTATCAGCCTGGCGACGGAAATGCCGACGTGACCA TCACAGTGAATGGCAAGGTGGTGGCCAAGAGCGGAAGCCACCACCATC ATCACCATCACACGGCGGCAGCGACATCATCAAGCTGCTGAACGAGCA AGTGAACAAAGAGATGAACAGCAGCAACCTGTACATGAGCATGAGCAG CTGGTGCTACACACACAGCCTGGATGGCGCCGACTGTTCCCTGTTTGATC ATGCCGCCGAGGAATACGAGCACGCCAAGAAGCTGATCATCTTCCTGAA CGAGAACAACGTGCCCGTCCAGCTGACATCTATCAGCGCCCCTGAGCAC AAGTTCGAGGGCCTGACACAGATCTTCCAGAAGGCCTACGAACACGAGC AGCACATCAGCGAGAGCATCAACAACATCGTGGACCACGCCATCAAGA GCAAGGATCACGCCACCTTCAACTTTCTGCAGTGGTACGTGGCCGAACA GCACGAGGAAGAGGTGCTGTTCAAGGACATCCTGGACAAGATCGAGCT GATCGGCAACGAGAACCACGGCCTGTACCTGGCCGATCAGTATGTGAAG GGAATCGCCAAGAGCCGCAAGTGA [SEQ ID NO: 54]
FimH_P GDGN_ DG- HIS- Ferritin J96	ATGGA AACGATA CACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCAG GATCTACAGGGGATGCCGCTCAACCTGCTCGGAGAGCCAGAAGAACA AGCTGGCCCTGTTTGCTGCAAGACCGCCAATGGCACAGCCATTCCTATT GGCGGCGGAAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTGGCTCCTGTGGTCAACG TGGGCCAGAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAA CGACTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAGGCTCT

	<p>GCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTTCCGGCACAGTGAAGTACAGCG GCAGCAGCTACCCATTTCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTGGTGTA CAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCT GTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATTGCCG TGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACACTACAACAGCGACGACTTCCAGTT CGTGTGGAACATCTACGCCAACACGACGTGGTGGTGCCTACAGGCGGA TGTGATGTGTCCGCCAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCG GCTCTGTGCCTATTCCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGTCTCAGAACCTG GGCTACTACCTGAGCGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCATCTTTA CCAACACCGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGAC CCGGAACGGAACAATCATCCCCGCCAACAAATACCGTGTCTCTGGGAGCT GTGGGCACCTCTGCTGTGTCTCTTGGCCTGACAGCCAACATGCCAGAA CAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGCCGTGAC CTTCGTGTATCAGCCTGGCGACGGAAATGCCGACGTGACCATCACAGTG AATGGCAAGGTGGTGGCCAAGAGCGGAAGCCACCACCATCATCACCAT CACCACGGCGGCAGCGACATCATCAAGCTGCTGAACGAGCAAGTGAAC AAAGAGATGAACAGCAGCAACCTGTACATGAGCATGAGCAGCTGGTGC TACACACACAGCCTGGATGGCGCCGGACTGTTCTGTTTGATCATGCCG CCGAGGAATACGAGCACGCCAAGAAGCTGATCATCTTCTGAACGAGA ACAACGTGCCCGTCCAGCTGACATCTATCAGCGCCCCTGAGCACAAGTT CGAGGGCCTGACACAGATCTTCCAGAAGGCCTACGAACACGAGCAGCA CATCAGCGAGAGCATCAACAACATCGTGGACCACGCCATCAAGAGCAA GGATCACGCCACCTTCAACTTTCTGCAGTGGTACGTGGCCGAACAGCAC GAGGAAGAGGTGCTGTTCAAGGACATCCTGGACAAGATCGAGCTGATC GGCAACGAGAACCACGGCCTGTACCTGGCCGATCAGTATGTGAAGGGA ATCGCCAAGAGCCGCAAGTGA [SEQ ID NO: 55]</p>
<p>FimH_P GDGN_ DG- HIS-M13 j96</p>	<p>ATGGAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAG GATCTACAGGGGATGCCGCTAACCTGCTCGGAGAGCCAGAAGAACAA AGCTGGCCCTGTTTGCTGCAAGACCGCCAATGGCACAGCCATTCCTATT GGCGGCGGAAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTGGCTCCTGTGGTCAACG TGGGCCAGAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAA CGACTACCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAGGCTCT GCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTTCCGGCACAGTGAAGTACAGCG GCAGCAGCTACCCATTTCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTGGTGTA CAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCT GTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATTGCCG TGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACACTACAACAGCGACGACTTCCAGTT CGTGTGGAACATCTACGCCAACACGACGTGGTGGTGCCTACAGGCGGA TGTGATGTGTCCGCCAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCG GCTCTGTGCCTATTCCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGTCTCAGAACCTG GGCTACTACCTGAGCGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCATCTTTA CCAACACCGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGAC CCGGAACGGAACAATCATCCCCGCCAACAAATACCGTGTCTCTGGGAGCT GTGGGCACCTCTGCTGTGTCTCTTGGCCTGACAGCCAACATGCCAGAA CAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGCCGTGAC CTTCGTGTATCAGCCTGGCGACGGAAATGCCGACGTGACCATCACAGTG AATGGCAAGGTGGTGGCCAAGAGCGGAAGCCACCACCATCATCACCAT CACCACGGCGGCAGCATGAAGATGGAAGAAGTGTTCAGAAGCACAAG</p>

	<p>ATCGTCGCCGTGCTGCGGGCCAATTCTGTGGAAGAGGCCAAAAAAG GCCCTGGCCGTGTTTCTTGGCGGAGTGCACCTGATCGAGATCACCTTAC CGTGCCTGACGCCGACACCGTGATCAAAGAGCTGAGCTTCCTGAAAGAG ATGGGCGCCATCATCGGAGCCGGAACCGTGACATCTGTTGAGCAGGCCA GAAAGGCCGTGGAATCTGGCGCCGAGTTTATCGTGTCCCCTCACCTGGA TGAGGAAATCAGCCAGTTCGCCAAAGAAAAGGGCGTGTCTACATGCC GGCGTGATGACACCTACAGAGCTGGTCAAAGCCATGAAGCTGGGCCAC ACCATCCTGAAGCTGTTTCCAGGCGAAGTCGTGGGCCCTCAGTTCGTGA AAGCTATGAAGGGCCATTTCCAAACGTGAAGTTCGTGCCACTGGCGG CGTCAACCTGGATAATGTGTGCGAGTGGTTCAAGGCTGGCGTGCTGGCT GTTGGAGTTGGCTCTGCTCTGGTCAAGGGCACACCTGTGGAAGTGGCTG AGAAGGCCAAGGCCTTCGTGGAAAAGATCAGAGGCTGCACCGAGTGAT GA [SEQ ID NO: 56]</p>
FimH_P GDGN_ DG- HIS- IMX313 j96	<p>ATGGAAACCGATACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAG GATCTACAGGGGATGCCGCTAACCTGCTCGGAGAGCCAGAAGAACAA AGCTGGCCCTGTTTGCCTGCAAGACCGCCAATGGCACAGCCATTCCTATT GGCGGCGGAAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTGGCTCCTGTGGTCAACG TGGGCCAGAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAA CGACTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAGGCTCT GCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTCCGGCACAGTGAAGTACAGCG GCAGCAGTACCCATTTCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTGGTGTA CAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCT GTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATTGCCG TGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACACTACAACAGCGACGACTTCCAGTT CGTGTGGAACATCTACGCCAACACGACGTGGTGGTGCCTACAGGCGGA TGATGTGTCCGCCAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCG GCTCTGTGCCTATTCCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGTCTCAGAACCTG GGCTACTACCTGAGCGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCATCTTTA CCAACACCGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGAC CCGGAACGGAACAATCATCCCCGCCAACAATACCGTGTCTCTGGGAGCT GTGGGCACCTCTGCTGTGTCTCTTGGCCTGACAGCCAACCTATGCCAGAA CAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGCGTGAC CTTCGTGTATCAGCCTGGCGACGGAAATGCCGACGTGACCATCACAGTG AATGGCAAGGTGGTGGCCAAGGGCAGCTCAGGCTCTGGCTCTGGATCTA AAAAACAGGGCGACGCCGATGTGTGTGGCGAGGTGGCATATATCCAGA GCGTGGTGTCCGATTGTCACGTGCCAACCGCCGAGCTGAGAACCCTGCT GGAAATCCGGAAGCTGTTCTCGAAATTCAGAAGCTGAAGGTCGAGCTG CAGGGCCTGTCTAAAGAAGGCGGAGGAAGCGGATCTCACCACCACCAT CACCCTGATGAC [SEQ ID NO: 57]</p>
FimH_P GDGN_ DG_Ferr itin (536)	<p>ATGGAAACCGATACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAG GATCTACAGGGGATGCCGCTAACCTGCTCGGAGAGCCAGAAGAACAA AGCTGGCCCTGTTTGCCTGCAAGACCGCCAATGGCACAGCCATTCCTATT GGCGGCGGAAGCGCCAATGTGTACGTAAACCTGGCTCCTGCCGTGAACG TGGGCCAGAATCTGGTGGTGGATCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAA CGACTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAGGCTCT GCTTACGGCGGCGTGCTGTCTAGCTTTAGCGGCACCGTGAAGTACAACG GCAGCAGTACCCATTTCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTGGTGTA CAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCT</p>

	<p>GTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATTGCCG TGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACACTACAACAGCGACGACTTCCAGTT CGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGGCGGA TGTGATGTGTCCGCCAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCG GCTCTGTGCCTATTCCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGTCTCAGAACCTG GGCTACTACCTGAGCGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCATCTTTA CCAACACCGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGAC CCGGAACGGAACAATCATCCCCGCCAACAATACCGTGTCTCTGGGAGCT GTGGGCACCTCTGCTGTGTCTCTTGGCCTGACAGCCAACATGCCAGAA CAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGCGTGAC CTTCGTGTATCAGCCTGGCGACGGAAATGCCGACGTGACCATCACAGTG AATGGCAAGGTGGTGGCCAAGAGCGGAAGCCACCACCATCATCCAT CACCACGGCGGCAGCGACATCATCAAGCTGCTGAACGAGCAAGTGAAC AAAGAGATGAACAGCAGCAACCTGTACATGAGCATGAGCAGCTGGTGC TACACACACAGCCTGGATGGCGCCGGACTGTTCTGTTTGATCATGCCG CCGAGGAATACGAGCACGCCAAGAAGCTGATCATCTTCCTGAACGAGA ACAACGTGCCCGTCCAGCTGACATCTATCAGCGCCCCTGAGCACAAGTT CGAGGGCCTGACACAGATCTTCCAGAAGGCCTACGAACACGAGCAGCA CATCAGCGAGAGCATCAACAACATCGTGGACCACGCCATCAAGAGCAA GGATCACGCCACCTTCAACTTTCTGCAGTGGTACGTGGCCGAACAGCAC GAGGAAGAGGTGCTGTTCAAGGACATCCTGGACAAGATCGAGCTGATC GGCAACGAGAACCACGGCCTGTACCTGGCCGATCAGTATGTGAAGGGA ATCGCCAAGAGCCGCAAGTGA [SEQ ID NO: 58]</p>
FimH- IMX313 j96	<p>ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAG GATCTACAGGGGATGCCGCTAACCTGCTCGGAGAGCCAGAAGAACAA AGCTGGCCCTGTTTGCTGCAAGACCGCCAATGGCACAGCCATTCTATT GGCGGCGGAAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTGGCTCCTGTGGTCAACG TGGGCCAGAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAA CGACTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAGGCTCT GCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTTCCGGCACAGTGAAGTACAGCG GCAGCAGCTACCCATTTCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTGGTGTA CAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCT GTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATTGCCG TGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACACTACAACAGCGACGACTTCCAGTT CGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCACCTGTGAT GTGTCCGCTAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCGGCTCTGT GCCTATTCCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGTCTCAGAACCTGGGCTACT ACCTGAGCGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCATCTTTACCAACAC CGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGACCCGGAAC GGAACAATCATCCCCGCCAACAATACCGTGTCTCTGGGAGCTGTGGGCA CATCTGCAGTTTCTCTGGGCCTGACAGCCAACATGCCAGAACAGGCGG ACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGCGTGACATTCGTG TATCAGGGCAGCTCTGGCAGCGGCTCTGGATCTAAAAAACAGGGCGACG CCGATGTGTGTGGCGAGGTGGCATATATCCAGAGCGTGGTGTCCGATTG TCACGTGCCAACC GCCGAGCTGAGAACCCTGCTGGAAATCCGGAAGCTG TTCTCGAAATTCAGAAGCTGAAGGTGAGCTGCAGGGCCTGTCTAAAG AAGGCCGAGGAAGCGGATCTCACCACCACCATCACCCTGA [SEQ ID NO: 59]</p>

FimH_m i3 j96	<p>ATGGA AACCGATACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAG GATCTACAGGGGATGCCGCTCAACCTGCTCGGAGAGCCAGAAGAACAA AGCTGGCCCTGTTTGCCTGCAAGACCGCCAATGGCACAGCCATTCCCTATT GGCGGCGGAAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTGGCTCCTGTGGTCAACG TGGGCCAGAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAA CGACTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAGGCTCT GCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTTCCGGCACAGTGAAGTACAGCG GCAGCAGCTACCCATTTCCCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTGGTGTA CAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCT GTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATTGCCG TGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACACTACAACAGCGACGACTTCCAGTT CGTGTGGAACATCTACGCCAACACGACGTGGTGGTGCCACCTGTGAT GTGTCCGCTAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCGGCTCTGT GCCTATTCCCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGTCTCAGAACCTGGGCTACT ACCTGAGCGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCATCTTTACCAACAC CGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGACCCGGAAC GGAACAATCATCCCCGCCAACAAATACCGTGTCTCTGGGAGCTGTGGGCA CATCTGCAGTTTCTCTGGGCCTGACAGCCAACACTATGCCAGAACAGGCGG ACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGCGTGACCTTCGTG TACCAAGGATCTGGCGGAGGCGGCATGAAGATGGAAGA ACTGTTCAAG AAACACAAGATCGTGGCCGTGCTGCGGGCCAATTCTGTGGAAGAGGCCA AAAAAAGGCCCTGGCCGTGTTTCTCGGAGGCGTGCACCTGATCGAGAT CACCTTTACCGTGCCTGACGCCGACACCGTGATCAAAGAGCTGAGCTTC CTGAAAGAGATGGGCGCCATCATCGGAGCCGGAACCGTGACATCTGTTG AGCAGGCCAGAAAGGCCGTGGAATCTGGCGCCGAGTTTATCGTGTCCCC TCACCTGGATGAGGAAATCAGCCAGTTCGCCAAAGAAAAGGGCGTGTTT TACATGCCCGGCGTGATGACACCTACAGAGCTGGTCAAAGCCATGAAGC TGGGCCACACCATCCTGAAGCTGTTTCCAGGCGAAGTCGTGGGCCCTCA GTTTCGTGAAAGCTATGAAGGGCCCATTTCCAAACGTGAAGTTCGTGCC ACTGGCGGAGTGAATCTGGACAACGTGTGCGAGTGGTTCAAGGCTGGCG TGCTGGCTGTTGGAGTTGGCTCTGCTCTGGTCAAGGGCACACCTGTGGA AGTGGCTGAGAAGGCCAAGGCCTTTCGTGGAAAAGATCAGAGGCTGTAC CGAAGGCAGCGGCTCTGGAAGCGGATCTGGATCTCACCACCATCATCAC CATCACC ACTGA [SEQ ID NO: 60]</p>
FIMHL- HIS-m13 j96	<p>ATGGA AACCGATACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAG GATCTACAGGGGATGCCGCTCAACCTGCTCGGAGAGCCAGAAGAACAA AGCTGGCCCTGTTTGCCTGCAAGACCGCCAATGGCACAGCCATTCCCTATT GGCGGCGGAAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTGGCTCCTGTGGTCAACG TGGGCCAGAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAA CGACTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAGGCTCT GCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTTCCGGCACAGTGAAGTACAGCG GCAGCAGCTACCCATTTCCCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTGGTGTA CAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCT GTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATTGCCG TGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACACTACAACAGCGACGACTTCCAGTT CGTGTGGAACATCTACGCCAACACGACGTGGTGGTGCCACAGGATCT GGCGGACACCACCATCATCACCATCACCACGGCAGCGGCTCCATGAAGA TGGAAGA ACTGTTCAAGAAGCACAAAGATCGTCCCGTGCTGCGGGCCAA</p>

	<p>TTCTGTGGAAGAGGCCAAAAAAGGCCCTGGCCGTGTTTCTTGGCGGA GTGCACCTGATCGAGATCACCTTTACCGTGCCTGACGCCGACACCGTGA TCAAAGAGCTGAGCTTCTGAAAGAGATGGGCGCCATCATCGGAGCCGG AACCGTGACATCTGTTGAGCAGGCCAGAAAGGCCGTGGAATCTGGCGCC GAGTTTATCGTGTCCCCTCACCTGGATGAGGAAATCAGCCAGTTCGCCA AAGAAAAGGGCGTGTCTACATGCCCGGCGTGATGACACCTACAGAGCT GGTCAAAGCCATGAAGCTGGGCCACACCATCCTGAAGCTGTTTCCAGGC GAAGTCGTGGGCCCTCAGTTCGTGAAAGCTATGAAGGGGCCATTTCCAA ACGTGAAGTTCGTGCCCACTGGCGGGCGTCAACCTGGATAATGTGTGCGA GTGGTTCAAGGCTGGCGTGCTGGCTGTTGGAGTGGGATCTGCTCTGGTC AAGGGCACACCTGTGGAAGTGGCTGAGAAGGCCAAGGCCTTCGTGGAA AAGATCAGAGGCTGCACCGAGTGA [SEQ ID NO: 61]</p>
<p>FIMH_ DG_PG DGN_H IS- Ferritin 536</p>	<p>ATGTTTGCATGTA AACCGCAAATGGCACCGCAATTCCGATTGGTGGTG GTAGCGCAAATGTTTATGTTAATCTGGCACCGGCAGTTAATGTTGGTCA GAATCTGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTTGGCATAATGATTATC CGGAAACCATCACCGATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGG TGGTGTCTGAGCAGCTTTAGCGGCACCGTGAAATATAACGGTAGCAGC TATCCGTTTCCGACCACCAGTGAAACACCGCGTGTGTGTATAATAGCC GTACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGACACCGGTTAGCAG TGCCGGTGGTGTGCAATTAAGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTCT TGCGTCAGACCAATAACTATAACTCCGATGATTTTCAGTTTGTGTGGAAC ATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGTGGTTGTGATGTTAG CGCACGTGATGTTACCGTTACACTGCCGGATTATCCTGGTAGCGTTCCGA TTCCGCTGACCGTTTATTGTGCAAAAAGCCAGAACCTGGGTTATTATCTG AGCGGCACCACCGCAGATGCAGGTAATAGCATTTTTACCAATACCGCCA GCTTTAGTCCGGCACAAGGTGTTGGTGTTCAGCTGACCCGTAATGGCAC CATTATCCGGCAAATAATACCGTTAGCCTGGGTGCAGTTGGCACCCAGC GCAGTGAGCCTGGGTCTGACCGCCAATTATGCACGTACCGGTGGTCAGG TTACCGCAGGTAATGTTGAGAGCATTATTGGTGTACCTTTGTGTATCAG CCTGGTGTGTAATGCAGATGTGACCATTACCGTGAATGGTAAAGTTG TTGCCAAAAGCGGTAGTCATCATCACCCATCATCATCACGGTGGTAG CGATATCATCAAAGTCTGAATGAACAGGTGAACAAAGAAATGAATAG CAGCAACCTGTATATGAGCATGAGCAGCTGGTGTATACCCATAGCCTG GATGGTGCAGGTCTGTTTCTGTTTGTATCATGCAGCCGAAGAATATGAGC ACGCAAAAAAAGTATCATCTTCTGAATGAAAATAATGTTCCGGTGCA GCTGACCAGCATTAGCGCTCCGGAACATAAATTTGAAGGTCTGACACAG ATTTTTCAGAAAGCCTATGAACATGAACAGCACATTAGCGAAAGCATT ACAACATTGTGGATCACGCCATCAAAGCAAAGATCATGCAACCTTTAA CTTTCTGCAGTGGTATGTTGCAGAACAGCATGAAGAAGAAGTGCTGTTT AAAGACATCCTGGATAAAATTGAACTGATCGGCAACGAAAATCATGGTC TGTATCTGGCAGATCAGTATGTTAAAGGTATTGCGAAAAGCCGCAAATA A [SEQ ID NO: 62]</p>
<p>LS- FIMHL- IMX313 -HIS</p>	<p>ATGAAGTATCTGCTGCCGACCGCAGCAGCGGGTCTGCTGCTGCTGGCAG CACAGCCTGCAATGGCATTGTCATGTA AACCGCAAATGGCACCGCAAT TCCGATTGGTGGTGGTAGCGCAAATGTTTATGTTAATCTGGCACCGGTTG TTAATGTTGGTCAGAACTGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTTGC CATAATGATTATCCGGAACCATCACCGATTATGTTACCCTGCAGCGTG GTAGTGCATATGGTGGTGTCTGAGCAATTTTAGCGGCACCGTGAAATA</p>

	TAGCGGTAGCAGCTATCCGTTCCGACCACCAGTGAAACACCGCGTGTTGTGTATAATAGCCGTACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGACACCGGTGAGCAGTGCCGGTGGTGTGCAATTAAGCAGGTAGCCTGATGTCAGTTCTGATTCTGCGTCAGACCAATAACTATAACTCCGATGATTTTCAGTTTGTGTGGAACATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGTGGTAGCAGCGGTAGCGGTTACAGGTAGCAAAAACAGGGTGATGCAGATGTTTGTGGTGAAGTTGCATATATTCAGAGCGTTGTTAGCGATTGTCATGTCCGACAGCAGAACTGCGTACCCTGCTGGAAATTCGTAAACTGTTTCTGGAAATCCAGAAGCTGAAAGTTGAACTGCAGGGTCTGAGCAAAGAAGGTGGCGGAAGCGGTAGCCATCACCATCACCATCACTGA [SEQ ID NO: 63]
FIMHL-S24S65-IMX313	ATGTTTGCAAGCAAACCGCAAATGGCACCGCAATTCGATTGGTGGTGTAGCGCAAATGTTTATGTTAATCTGGCACCGGTTGTTAATGTTGGTCAGAACTCTGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTAGCCATAATGATTATCCGGAAACCATCACCGATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGGTGGTGTCTGAGCAATTTTAGCGGCACCGTGAAATATAGCGGTAGCAGCTATCCGTTTCCGACCACCAGTGAAACACCGCGTGTTGTGTATAATAGCCGTACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGACACCGGTTAGCAGTGCCGGTGGTGTGCAATTAAGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTCTGCGTCAGACCAATAACTATAACTCCGATGATTTTCAGTTTGTGTGGAACATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGTGGTAGTAGCGGTA GTGGTAGCGGTTCAAAAAAACAGGGTGATGCAGATGTTTGTGGTGAAGTTGCATATATTCAGAGCGTTGTTAGCGATTGTCATGTGCCGACCGCAGAACTGCGTACCCTGCTGGAAATTCGTAAACTGTTTCTGGAAATCCAGAAGCTGAAAGTTGAACTGCAGGGTCTGAGTAAAGAAGGTGGTGGTAGTGGTAGCCATCACCATCATCATCACTAATAA [SEQ ID NO: 64]
FIMHL-S24S65-foldon-ferritin	ATGTTTGCAAGCAAACCGCAAATGGCACCGCAATTCGATTGGTGGTGTAGCGCAAATGTTTATGTTAATCTGGCACCGGCAGTTAATGTTGGTCA GAATCTGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTAGCCATAATGATTATCCGGAAACCATCACCGATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGGTGGTGTCTGAGCAGCTTTAGCGGCACCGTGAAATATAACGGTAGCAGCTATCCGTTTCCGACCACCAGTGAAACACCGCGTGTTGTGTATAATAGCCGTACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGACACCGGTTAGCAGTGCCGGTGGTGTGCAATTAAGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTCTGCGTCAGACCAATAACTATAACTCCGATGATTTTCAGTTTGTGTGGAACATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGTTACAGTTATATTCCGGAAGCACCGCGTGATGGTCAGGCATATGTTTCGTAAAGATGGTGAATGGTCTGCTGAGCACCTTTTTAGGTAGCGGTCATCATCACCATCATCATGGTAGCGGTGATATCATTAAACTGCTGAATGAACAGGTGAACAAAGAGATGAATAGCAGCAATCTGTATATGAGCATGAGCAGCTGGTGTATACCCATAGCCTGGATGGTGCAGGTCTGTTTCTGTTTGTATCATGCAGCCGAAGAATATGAGCACGCAAAAAAACTGATCATCTTCTGAATGAAAATAATGTTCCGGTTCAGCTGACCAGCATTAGCGCTCCGGAACATAAATTTGAAGGTCTGACACAGATTTTTCAGAAAGCCTATGAACATGAACAGCACATTAGCGAAAGC ATTAACAACATTGTGGATCACGCCATCAAAGCAAAGATCATGCAACCTTTAACTTTCTGCAGTGGTATGTTGCAGAACAGCATGAAGAAGAAGTGCTGTTTAAAGACATCCTGGATAAAATTGAACTGATCGGCAACGAAAATCATGGTCTGTATCTGGCAGATCAGTATGTTAAAGGTATTGCCAAAAGCCGCAAGTAATAA [SEQ ID NO: 65]

FIMHL-S24S65-Mi3	<p>ATGTTTGAAGCAAACCGCAAATGGCACCGCAATCCGATTGGTGGTG GTAGCGCAAATGTTTATGTTAATCTGGCACCGGCAGTTAATGTTGGTCA GAATCTGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTAGCCATAATGATTATC CGGAAACCATCACCGATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGG TGGTGTCTGAGCAGCTTTAGCGGCACCGTGAAATATAACGGTAGCAGC TATCCGTTTCCGACCACCAGTGAAACACCGCGTGTGTGTATAATAGCC GTACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGACACCGGTTAGCAG TGCCGGTGGTGTGCAATTAAGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTC TGCGTCAGACCAATAACTATAACTCCGATGATTTTCAGTTTGTGTGGAAC ATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGTGGTAGTGGTGGTTC AGGTGGTAGCATGAAAATGGAAGAAGCTGTTCAAAAAGCACAAAATTGT TGCCGTTCTGCGTGCAAATAGCGTTGAAGAAGCAAAAAGAAAGCACT GGCCGTTTTTTTAGGTGGTGTGCATCTGATTGAAATCACCTTTACCGTTC CGGATGCAGATACCGTTATTAAGAAGCTGAGCTTTCTGAAAGAAATGGG TGCAATTATTGGTGCAGGCACCGTTACCAGCGTTGAACAGGCACGTAAA GCAGTTGAAAGCGGTGCAGAATTTATTGTTAGTCCGCATCTGGATGAAG AAATTAGCCAGTTTGCAAAAGAAAAGGGCGTGTTTTATATGCCTGGTGT TATGACCCCGACCGAACTGGTTAAAGCAATGAACTGGGTCATACCATC CTGAAACTGTTTCCGGGTGAAGTTGTTGGTCCGCAGTTTGTGAAAGCCAT GAAAGGTCCTTTTCCGAACGTTAAATTTGTGCCGACAGGTGGCGTGAAT CTGGATAATGTTTGTGAATGGTTTAAAGCCGGTGTCTGGCCGTTGGTGT TGGTAGTGCCCTGGTGAAGGTACACCGGTTGAAGTTGCAGAAAAGCA AAAGCCTTTGTGGAAAAAATTCGTGGTTGTACCGAAGGTAGCGGTAGCG GTTCAGGTAGTGGTAGCCATCACCATCATCATCACTAATAA [SEQ ID NO: 66]</p>
FIMHL-mI3	<p>ATGTTTGCATGTAAAACCGCAAATGGCACCGCAATCCGATTGGTGGTG GTAGCGCAAATGTTTATGTTAATCTGGCACCGGCAGTTAATGTTGGTCA GAATCTGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTTGGCATAATGATTATC CGGAAACCATCACCGATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGG TGGTGTCTGAGCAGCTTTAGCGGCACCGTGAAATATAACGGTAGCAGC TATCCGTTTCCGACCACCAGTGAAACACCGCGTGTGTGTATAATAGCC GTACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGACACCGGTTAGCAG TGCCGGTGGTGTGCAATTAAGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTC TGCGTCAGACCAATAACTATAACTCCGATGATTTTCAGTTTGTGTGGAAC ATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGTGGTAGTGGTGGTTC AGGTGGTAGCATGAAAATGGAAGAAGCTGTTCAAAAAGCACAAAATTGT TGCCGTTCTGCGTGCAAATAGCGTTGAAGAAGCAAAAAGAAAGCACT GGCCGTTTTTTTAGGTGGTGTGCATCTGATTGAAATCACCTTTACCGTTC CGGATGCAGATACCGTTATTAAGAAGCTGAGCTTTCTGAAAGAAATGGG TGCAATTATTGGTGCAGGCACCGTTACCAGCGTTGAACAGGCACGTAAA GCAGTTGAAAGCGGTGCAGAATTTATTGTTAGTCCGCATCTGGATGAAG AAATTAGCCAGTTTGCAAAAGAAAAGGGCGTGTTTTATATGCCTGGTGT TATGACCCCGACCGAACTGGTTAAAGCAATGAACTGGGTCATACCATC CTGAAACTGTTTCCGGGTGAAGTTGTTGGTCCGCAGTTTGTGAAAGCCAT GAAAGGTCCTTTTCCGAACGTTAAATTTGTGCCGACAGGTGGCGTGAAT CTGGATAATGTTTGTGAATGGTTTAAAGCCGGTGTCTGGCCGTTGGTGT TGGTAGTGCCCTGGTGAAGGTACACCGGTTGAAGTTGCAGAAAAGCA AAAGCCTTTGTGGAAAAAATTCGTGGTTGTACCGAAGGTAGCGGTAGCG</p>

	G TTCAGGTAGTGGTAGCCATCACCATCATCATCACTAATAA [SEQ ID NO: 67]
FimHL- NOCYS -MI3	<p>ATGTTTCGCAAGCAAACCGCAAATGGCACCGCAATCCGATTGGTGGTG GTAGCGCAAATGTTTATGTTAATCTGGCACCGGCAGTTAATGTTGGTCA GAATCTGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTAGCCATAATGATTATC CGGAAACCATCACCGATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGG TGGTGTCTGAGCAATTTTAGCGGCACCGTGAAATATAGCGGTAGCAGC TATCCGTTTCCGACCACCAGTGAAACACCGCGTGTGTGTATAATAGCC GTACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGACACCGGTAGCAG TGCCGGTGGTGTGCAATTAAGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTCC TGCGTCAGACCAATAACTATAACTCCGATGATTTTCAGTTTGTGTGGAAC ATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGTGGTGGTGGCAGTG GTGGTTCAGGCGGTAGCGGTGGTAGCATGAAAATGGAAGA ACTGTTCAA AAAGCACAAAATTGTTGCCGTTCTGCGTGCAAATAGCGTTGAAGAAGCA AAAAAGAAAGCACTGGCCGTTTTTTTAGGTGGTGTGCATCTGATTGAAA TCACCTTTACCGTTCGGATGCAGATACCGTTATTAAGA ACTGAGCTTT CTGAAAGAAATGGGTGCAATTATTGGTGCAGGCACCGTTACCAGCGTTG AACAGGCACGTAAAGCAGTTGAAAGCGGTGCAGAATTTATTGTTAGTCC GCATCTGGATGAAGAAATTAGCCAGTTTGCAAAAAGAAAAGGGCGTGTTT TATATGCCTGGTGTATGACCCCGACCGAACTGGTTAAAGCAATGAAAC TGGGTCAACCATCCTGAAACTGTTTCCGGGTGAAGTTGTTGGTCCGCAG TTTGTGAAAGCCATGAAAGGTCCTTTTCCGAACGTTAAATTTGTGCCGAC AGGTGGCGTGAATCTGGATAATGTTTGTGAATGGTTTAAAGCCGGTGT CTGGCAGTTGGTGTGGTAGTGCCCTGGTGAAGGTACACCGGTGAAAG TTGCAGAAAAAGCAAAGCCTTTGTGGA AAAAATTCGTGGTTGTACCGA AGGTAGCGGTAGTGGTAGCGGTTACAGGTAGCCATCACCATCACCATCAC TGA [SEQ ID NO: 68]</p>
FimHdel taGG_P GDGN_ DG_mi3	<p>ATGTTTCGCCTGCAAACCGCAAATGGCACCGCAATCCGATTGGTGGTG GTAGCGCAAATGTTTATGTTAATCTGGCACCGGTTGTTAATGTTGGTCAG AATCTGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTTGGCATAATGATTATCC GGAAACCATCACCGATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGGT GGTGTCTGAGCAATTTTAGCGGCACCGTGAAATATAGCGGTAGCAGCT ATCCGTTTCCGACCACCAGTGAAACACCGCGTGTGTGTATAATAGCCG TACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGACACCGGTGAGCAGT GCCGGTGGTGTGCAATTAAGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTCT GCGTCAGACCAATAACTATAACTCCGATGATTTTCAGTTTGTGTGGAAC ATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCTGTGATGTTAGCGCACG TGATGTTACCGTTACTGCCGATTATCCTGGTAGCGTTCCGATTCCGC TGACCGTTTATTGTGCAAAAAGCCAGAACCTGGGTTATTATCTGAGCGG CACCACCGCAGATGCAGGTAATAGCATTTTTACCAATACCGCAAGCTTT AGTCCGGCACAAGGTGTTGGTGTTCAGCTGACCCGTAATGGCACCATTA TTCCGGCAAATAATACCGTTAGCCTGGGTGCAGTTGGCACCAGCGCAGT GAGCCTGGGTCTGACCGCAATTATGCACGTACCGGTGGTACGGTTACC GCAGGTAATGTTGAGAGCATTATTGGTGTACCTTTGTGTATCAGCCTGG TGATGGTAATGCAGATGTGACCATTACCGTGAATGGTAAAGTTGTTGCA AAAGGTAGCGGTGGTGGTGGCATGAAAATGGAAGA ACTGTTCAAAAA CACAAGATTGTTGCCGTTCTGCGTGCAAATAGCGTTGAAGAAGCAAAAA AGAAAGCACTGGCCGTTTTTTTAGGTGGTGTGCATCTGATTGAAATCACC</p>

	<p>TTTACCGTTCGGGATGCAGATACCGTTATTAAGAAGCTGAGCTTTCTGAA AGAAATGGGTGCAATTATTGGCGCAGGCACCGTTACCAGCGTTGAACAG GCACGTAAAGCAGTTGAAAGCGGTGCAGAATTTATTGTTAGTCCGCATC TGGATGAAGAAATTAGCCAGTTTGCAAAGAAAAGGGCGTGTTTTATAT GCCTGGTGTATGACCCCGACCGAACTGGTTAAAGCAATGAAACTGGGT CATACCATCCTGAAACTGTTTCCGGGTGAAGTTGTTGGTCCGCAGTTTGT GAAAGCCATGAAAGGTCCTTTTCCGAACGTTAAATTTGTGCCGACCGGT GGCGTGAATCTGGATAATGTTTGTGAATGGTTTAAAGCCGGTGTCTGG CAGTTGGTGTGGTAGTGCCCTGGTGAAAGGTACACCGGTGAAGTTGC AGAAAAGCAAAAGCCTTTGTGGAAAAAATTCGTGGTTGTACCGAAGGT AGTGGTAGCGGCAGCGGTAGCGGTTACATCACCATCACCATCACTGA [SEQ ID NO: 69]</p>
FimHL- GSG4- Ferritin	<p>ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACGAACTGTACTTCCAGGGCT TTGCATGTAAAACCGCAAATGGCACCGCAATTCCGATTGGTGGTGGTAG CGCAAATGTTTATGTTAATCTGGCACCGGCAGTTAATGTTGGTCAGAATC TGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTTGGCATAATGATTATCCGGAA ACCATCACCGATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGGTGGTGT TCTGAGCAGCTTTAGCGGCACCGTGAAATATAACGGTAGCAGCTATCCG TTTCCGACCACCAGTGAAACACCGCGTGTGTGTATAATAGCCGTACCG ATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGACACCGGTTAGCAGTGCCGG TGGTGTGCAATTAAGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTCTGCGTC AGACCAATAACTATAACTCCGATGATTTTCAGTTTGTGTGGAACATCTAT GCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGTAGCGGTGGTGGTGGCGATA TTATCAAACCTGCTGAATGAACAGGTGAACAAAGAAATGAATAGCAGCA ACCTGTATATGAGCATGAGCAGCTGGTGTATAACCCATAGCCTGGATGG TGCAGGTCTGTTTCTGTTTGATCATGCAGCCGAAGAATATGAGCACGCA AAAAAACTGATCATCTTCTGAATGAAAATAATGTTCCGGTGCAGCTGA CCAGCATTAGCGCTCCGGAACATAAATTTGAAGGTCTGACACAGATTTT TCAGAAAGCCTATGAACATGAACAGCACATTAGCGAAAGCATTAAACAA CATTGTGGATCACGCCATCAAAGCAAAGATCATGCAACCTTTAACTTT CTGCAGTGGTATGTTGCAGAACAGCATGAAGAAGAAGTGCTGTTTAAAG ACATCCTGGATAAAATTGAACTGATCGGCAATGAAAATCACGGTCTGTA TCTGGCAGATCAGTATGTTAAAGGTATTGCCAAAAGCCGCAATAA [SEQ ID NO: 70]</p>
pelBLS- FimHL- mI3	<p>ATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGC CCAGCCGGCGATGGCCTTTGCATGTAAAACCGCAAATGGCACCGCAATT CCGATTGGTGGTGGTAGCGCAAATGTTTATGTTAATCTGGCACCGGTTGT TAATGTTGGTCAGAATCTGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTTGCC ATAATGATTATCCGGAAACCATCACCGATTATGTTACCCTGCAGCGTGG TAGTGCATATGGTGGTGTCTGAGCAATTTAGCGGCACCGTGAAATAT AGCGGTAGCAGCTATCCGTTTCCGACCACCAGTGAAACACCGCGTGTG TGTATAATAGCCGTACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGAC ACCGGTGAGCAGTGCCGGTGGTGTGCAATTAAGCAGGTAGCCTGATT GCAGTTCTGATTCTGCGTCAGACCAATAACTATAACTCCGATGATTTCA GTTTGTGTGGAACATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGTG GTGGTTCAGGTATGAAAATGGAAGAACTGTTCAAAAAGCACAAAGATTGT TGCCGTTCTGCGTGCAAATAGCGTTGAAGAAGCAAAAAGAAAGCACT GGCCGTTTTTTTTAGGTGGTGTGCATCTGATTGAAATCACCTTTACCGTTC</p>

	<p>CGGATGCAGATACCGTTATTAAGAAGCTGAGCTTTCTGAAAGAAATGGG TGCAATTATTGGCGCAGGCACCGTTACCAGCGTTGAACAGGCACGTA GCAGTTGAAAGCGGTGCAGAATTTATTGTTAGTCCGCATCTGGATGAAG AAATTAGCCAGTTTGCAAAAGAAAAGGGCGTGTTTTATATGCCTGGTGT TATGACCCCGACCGAACTGGTTAAAGCAATGAAACTGGGTCATACCATC CTGAAACTGTTCCGGGTGAAGTTGTTGGTCCGCAGTTTGTGAAAGCCAT GAAAGGTCCTTTCCGAACGTTAAATTTGTGCCGACAGGTGGCGTGAAT CTGGATAATGTTTGTGAATGGTTTAAAGCCGGTGTCTGGCAGTTGGTGT TGGTAGTGCCCTGGTGAAGGTACACCGGTTGAAGTTGCAGAAAAGCA AAAGCCTTTGTGGAAAAAATTCGTGGTTGTACCGAAGGTAGTGGTAGCG GTTTCAGGTAGCCACCACCACCACCACCCTGA [SEQ ID NO: 71]</p>
FimH_D G_Ferri in (GSGG GG)	<p>ATGGGCAGCAGCCATCATCATCACGAAGTACTTCCAGGGCT TTGCATGTAAAACCGCAAATGGCACCAGCAATCCGATTGGTGGTGGTAG CGCAAATGTTTATGTTAATCTGGCACCAGGCAATGTTGGTCAGAATC TGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTTGGCATAATGATTATCCGGAA ACCATCACCGATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGGTGGTGT TCTGAGCAGCTTTAGCGGCACCGTGAAATATAACGGTAGCAGCTATCCG TTCCGACCACCAGTGAAACACCGCGTGTGTGTATAATAGCCGTACCG ATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGACACCGGTTAGCAGTGCCGG TGGTGTGCAATTAAGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTCTGCGTC AGACCAATAACTATAACTCCGATGATTTTCAGTTTGTGTGGAACATCTAT GCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGTGGTGTGATGTTAGCGCACG TGATGTTACCGTTACACTGCCGGATTATCCTGGTAGCGTCCGATTCCGC TGACCGTTTATTGTGCAAAAAGCCAGAACCTGGGTTATTATCTGAGCGG CACCACCGCAGATGCAGGTAATAGCATTTTTACCAATACCGCAAGCTTT AGTCCGGCACAAGGTGTTGGTGTTCAGCTGACCCGTAATGGCACCATTA TTCCGGCAAATAATACCGTTAGCCTGGGTGCAGTTGGCACCAGCGCAGT GAGCCTGGGTCTGACCGCAATTATGCACGTACCGGTGGTTCAGGTTACC GCAGGTAATGTTTCAGAGCATTATTGGTGTACCTTTGTGTATCAGCCTGG TGATGGTAATGCAGATGTGACCATTACCGTGAATGGTAAAGTTGTTGCA AAAGGTAGCGGTGGTGGTGGCGATATTATCAAAGTCTGAATGAACAGG TGAACAAAGAAATGAATAGCAGCAACCTGTATATGAGCATGAGCAGCT GGTGTATACCCATAGCCTGGATGGTGCAGGCTGTTTCTGTTTGTATCAT GCAGCCGAAGAATATGAGCACGCAAAAAAAGTATCATCTTCTCTGAATG AAAATAATGTTCCGGTGCAGCTGACCAGCATTAGCGCTCCGGAACATAA ATTTGAAGGTCTGACACAGATTTTTCAGAAAGCCTATGAACATGAACAG CACATTAGCGAAAGCATTAAACAACATTGTGGATCACGCCATCAAAGCA AAGATCATGCAACCTTTAACTTTCTGCAGTGGTATGTTGCAGAACAGCA TGAAGAAGAAGTGCTGTTTAAAGACATCCTGGATAAAATTGAACTGATC GGCAATGAAAATCACGGTCTGTATCTGGCAGATCAGTATGTTAAAGGTA TTGCCAAAAGCCGCAAATAA [SEQ ID NO: 72]</p>
FimHL- C-C- MI3	<p>ATGTTTCGCCTGCAAAAACCGCAAATGGCACCAGCAATCCGATTGGTGGTG GTAGCGCAAATGTTTATGTTAATCTGGCACCAGGTTTGTAAATGTTGGTCAG AATTGTGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTTGGCATAATGATTATCC GGAAACCATCACCGATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGGT GGTGTCTGAGCAATTTTAGCGGCACCGTGAAATATAGCGGTAGCAGCT ATCCGTTTCCGACCACCAGTGAAACACCGCGTGTGTGTATAATAGCCG TACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGACACCGGTGAGCAGT</p>

	<p>GCCGGTGGTGTGCAATTAAGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTCT GCGTCAGACCAATAACTATAACTCCGATGATTTTCAGTTTGTGTGGAAC ATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGTGGTGGTGGCAGTG GTGGTTCAGGCGGTAGCGGTGGTAGCATGAAAATGGAAGAAGTGTCAA AAAGCACAAAATTGTTGCCGTTCTGCGTGCAAATAGCGTTGAAGAAGCA AAAAAGAAAGCACTGGCCGTTTTTTTAGGTGGTGTGCATCTGATTGAAA TCACCTTTACCGTTCGGATGCAGATACCGTTATTAAAGAAGTGTGAGCTTT CTGAAAGAAATGGGTGCAATTATTGGTGCAGGCACCGTTACCAGCGTTG AACAGGCACGTAAAGCAGTTGAAAGCGGTGCAGAATTTATTGTTAGTCC GCATCTGGATGAAGAAATTAGCCAGTTTGCAAAGAAAAGGGCGTGT TATATGCCTGGTGTATGACCCCGACCGAACTGGTTAAAGCAATGAAAC TGGGTCATACCATCCTGAAACTGTTTCCGGGTGAAGTTGTTGGTCCGCAG TTTGTGAAAGCCATGAAAGGTCCTTTCCGAACGTTAAATTTGTGCCGAC AGGTGGCGTGAATCTGGATAATGTTTGTGAATGGTTTAAAGCCGGTGT CTGGCAGTTGGTGTGGTAGTGCCCTGGTGAAGGTACACCGGTTGAAG TTGCAGAAAAGCAAAAGCCTTTGTGGAAAAAATTCGTGGTGTACCGA AGGTAGCGGTAGTGGTAGCGGTTACGGTAGCCATCACCATCACCATCAC TGA [SEQ ID NO: 73]</p>
FimHL- C-C- qBeta	<p>ATGTTTCGCCTGCAAACCGCAAATGGCACCAGCAATTCCGATTGGTGGTG GTAGCGCAAATGTTTATGTTAATCTGGCACCAGTTTGTAAATGTTGGTCAG AATTGTGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTTCCATAATGATTATCC GGAAACCATCACCATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGGT GGTGTCTGAGCAATTTAGCGGCACCGTGAAATATAGCGGTAGCAGCT ATCCGTTTCCGACCACAGTGAAACACCGCGTGTGTGTATAATAGCCG TACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGACACCGGTGAGCAGT GCCGGTGGTGTGCAATTAAGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTCT GCGTCAGACCAATAACTATAACTCCGATGATTTTCAGTTTGTGTGGAAC ATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGTGGTGGTGGCAGTG GTGGTTCAGGCGGTAGCGGTGGCAGCGCAAAGTGGAAACCGTTACACT GGGTAATATTGGTAAAGATGGTAAACAGACCCTGGTCTGAATCCGCGT GGTGTAAATCCGACCAATGGTGTGTCAGCCTGAGCCAGGCAGGCGCAG TTCCGGCACTGGAAAAACGTGTTACCGTTAGCGTTAGCCAGCCGAGCCG TAATCGTAAAAACTATAAAGTTCAGGTGAAAATCCAGAATCCGACCGCA TGTACCGCAATGGTAGCTGTGATCCGAGCGTTACCGTCCAGGCATATG CAGATGTTACCTTTAGTTTTACCCAGTATAGCACCGATGAAGAACGTGC ATTTGTTTCGTACCGAACTGGCAGCACTGCTGGCAAGTCCGCTGCTGATTG ATGCAATTGATCAGCTGA [SEQ ID NO: 74]</p>
HBcAg NC_fim HL splitted	<p>ATGGATATCGATCCGTATAAAGAATTTGGTGCAGCGTTGAACTGCTGA GCTTTCTGCCGAGCGATTTTTTCCGAGCATTCGTGATCTGCTGGATAAC GCAAGCGCACTGTATCGTGAAGCACTGGAAAGTCCGGAACATTGTAGTC CGCATCATAACCGCACTGCGTCAGGCAATTCTGTGTTGGGGTGAAGTGT GAATCTGGCAACCTGGGTGGTAGCAATCTGGAAGATCCGTAGAAGGAG ATATACATATGTTTGCATGTAAAACCGCAAATGGCACCAGCAATTCCGAT TGGTGGTGGTAGCGCAAATGTTTATGTTAATCTGGCACCAGTTGTTAATG TTGGTCAGAATCTGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTTCCATAAT GATTATCCGGAACCATCACCAGTTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTG CATATGGTGGTGTCTGAGCAATTTTAGCGGCACCGTGAATATAGCGG TAGCAGCTATCCGTTTCCGACCACAGTGAAACACCGCGTGTGTGTAT</p>

	<p>AATAGCCGTACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCGCTGTATCTGACACCGG TGAGCAGTGCCGGTGGTGTGCAATTAAGCAGGTAGCCTGATTGCAGT TCTGATTCTGCGTCAGACCAATAACTATAACTCCGATGATTTTCAGTTG TGTGGAACATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGTGGTGGT TCAGGTGCCAGCCGTGAACTGGTTGTTAGCTATGTTAATGTGAATATGG GCCTGAAAATTCGTCAGCTGCTGTGGTTTCATATTCATGTCTGACCTTT GGTCGTGAAACCGTTCTGGAATATCTGGTTAGCTTTGGTGTGTTGGATTTCG TACCCCTCCGGCATATCGTCCGCCTAATGCACCGATTCTGAGTACCCTGC CGGAAACAACCGTTGTTTGAGGATCC [SEQ ID NO: 75]</p>
<p>HBcAg NC_fim HL-LS</p>	<p>ATGAAATATCTGCTGCCGACCGCAGCAGCGGGTCTGCTGCTGCTGGCAG CACAGCCTGCAATGGCAGGTCATCATCACCATCATCATAGCGGTGGTAT GGATATTGATCCGTATAAAGAATTTGGTGCCAGCGTTGAACTGCTGAGC TTTCTGCCGAGCGATTTTTTTCCGAGCATTCTGTGATCTGCTGGATACCGC AAGCGCACTGTATCGTGAAGCACTGGAAAGTCCGGAACATTGTAGTCCG CATCATACCGCACTGCGTCAGGCAATTCTGTGTTGGGGTGAAGTATGA ATCTGGCAACCTGGGTTGGTAGCAATCTGGAAGATCCGTAGAAGGAGAT ATACATATGAAATACCTGTTACCGACAGCCGCAGCAGGCCTGTTACTGT TAGCAGCCCAGCCAGCCATGGCATTTCATGTAAAACCGCAAATGGCAC CGCAATTCCGATTGGTGGTGGTAGCGCAAATGTTTATGTTAATCTGGCAC CGGTTGTTAATGTTGGTCAAGTCTGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATT TTTTGCCATAATGATTATCCGAAACCATCACCGATTATGTTACCCTGCA GCGTGGTAGTGCATATGGTGGTGTCTGAGCAATTTTAGCGGCACCGTG AAATATAGCGGTAGCAGCTATCCGTTTCCGACCACCAGTGAAACACCGC GTGTTGTGTATAATAGCCGTACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCGCTGTAT CTGACACCGGTGAGCAGTGCCGGTGGTGTGCAATTAAGCAGGTAGCC TGATTGCAGTTCTGATTCTGCGTCAGACCAATAACTATAACTCCGATGAT TTTCAGTTTGTGTGGAACATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGAC CGGTGGTGGTTCAGGTGCAAGCCGTGAACTGGTTGTTAGCTATGTTAAT GTGAATATGGGCCTGAAAATTCGTCAGCTGCTGTGGTTTCATATTCATG TCTGACCTTTGGTCGTGAAACCGTTCTGGAATATCTGGTTAGCTTTGGTG TTTGGATTTCGTACCCCTCCGGCATATCGTCCGCCTAATGCACCGATTCTG AGTACCCTGCCGAAACAACCGTTGTTTGACTCGAG [SEQ ID NO: 76]</p>
<p>FIMHL- MI3</p>	<p>ATGTTTCGCCTGCAAACCGCAAATGGCACCGCAATTCGATTGGTGGTG GTAGCGCAAATGTTTATGTTAATCTGGCACCGGTTGTTAATGTTGGTCAG AATCTGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTTTGCCATAATGATTATCC GGAAACCATCACCGATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGGT GGTGTCTGAGCAATTTTAGCGGCACCGTGAAATATAGCGGTAGCAGCT ATCCGTTTCCGACCACCAGTGAAACACCGCGTGTGTTGTGTATAATAGCCG TACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGACACCGGTGAGCAGT GCCGGTGGTGTGCAATTAAGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTCT GCGTCAGACCAATAACTATAACTCCGATGATTTTCAGTTTGTGTGGAAC ATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGTAGCGGTGGTGGTG GCATGAAAATGGAAGAACTGTTCAAAAACACAAGATTGTTGCCGTTCT GCGTGCAAATAGCGTTGAAGAAGCAAAAAGAAAGCACTGGCCGTTTTT TTAGGTGGTGTGCATCTGATTGAAATCACCTTTACCGTTCCGGATGCAGA TACCGTTATTAAGAACTGAGCTTTCTGAAAGAAATGGGTGCAATTATT GGCGCAGGCACCGTTACCAGCGTTGAACAGGCACGTAAAGCAGTTGAA AGCGGTGCAGAATTTATTGTTAGTCCGCATCTGGATGAAGAAATTAGCC</p>

	<p>AGTTTGCAAAAGAAAAGGGCGTGTTTTATATGCCTGGTGTATGACCCC GACCGAACTGGTTAAAGCAATGAACTGGGTCATACCATCCTGAAACTG TTCCGGGTGAAGTTGTTGGTCCGCAGTTTGTGAAAGCCATGAAAGGTC CTTTCCGAACGTTAAATTTGTGCCGACCGGTGGCGTGAATCTGGATAAT GTTTGTGAATGGTTTAAAGCCGGTGTCTGGCAGTTGGTGTGGTAGTGC CCTGGTGAAGGTACACCGGTTGAAGTTGCAGAAAAAGCAAAAGCCTTT GTGGAAAAAATTCGTGGTGTACCGAAGGTAGTGGTAGCGGCAGCGGTA GCGGTTACATCACCATCACCATCACTGA [SEQ ID NO: 77]</p>
FimH_D NKQ_D G_degly c	<p>ATGGAAACCGATACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAG GATCTACAGGGGATGCCGCTCAACCTGCTCGGAGAGCCAGAAGAACA AGCTGGCCCTGTTTGCCTGTAAAACCGCCAGCGGCACAGCCATTCTATT GGCGGAGGCAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTGGCTCCTGTGGTCAACG TGGGCCAGAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAA CGACTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAGGCTCT GCTTACGGCGGCGTGCTGAGCGATTTTTCCGGCACAGTGAAGTACAGCG GCAGCAGCTACCCATTTCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTGGTGTA CAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCT GTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATTGCCG TGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACACTACAACAGCGACGACTTCCAGTT CGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGGCGGA TGTGATGTGTCCGCCAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCG GCTCTGTGCCTATTCCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGTCTCAGAACCTG GGCTACTACCTGAGCGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCATCTTTA CCAACACCGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGAC CAGAGATGGCACAATCATCCCCGCCGACAATACCGTGTCTCTGGGCGCT GTTGGCACATCTGCAGTTTCTCTGGGCCTGACCGCCAACATGCCAGAA CAGGTGGACAAGTGACCGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGCGTGAC ATTCGTGTATCAGGACAACAAGCAGGCCGACGTGACCATCACCGTGAAT GGCAAAGTGGTGGCCAAAGGCTCTGGCCATCACCACCACCATCACTG [SEQ ID NO: 90]</p>
FimH_P GDGN_ DG	<p>ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTTTTGTGGGTGCCAG GATCTACAGGGGATGCCGCTCAACCTGCTCGGAGAGCCAGAAGAACA AGCTGGCCCTGTTTGCCTGCAAGACCGCCAATGGCACAGCCATTCTATT GGCGGCGGAAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTGGCTCCTGTGGTCAACG TGGGCCAGAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAA CGACTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAGGCTCT GCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTTCCGGCACAGTGAAGTACAGCG GCAGCAGCTACCCATTTCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTGGTGTA CAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCT GTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATTGCCG TGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACACTACAACAGCGACGACTTCCAGTT CGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGGCGGA TGTGATGTGTCCGCCAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCG GCTCTGTGCCTATTCCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGTCTCAGAACCTG GGCTACTACCTGAGCGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCATCTTTA CCAACACCGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGAC CCGGAACGGAACAATCATCCCCGCCAACAAATACCGTGTCTCTGGGAGCT GTGGGCACCTCTGCTGTTTCTCTGGGCCTGACAGCCAACATGCCAGAA</p>

	CAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGCCGTGAC ATTCGTGTATCAGGACAACAAGCAGGCCGACGTGACCATCACCGTGAAT GGCAAAGTGGTGGCCAAAGGCTCTGGCCAT [SEQ ID NO: 91]
FimH_D NKQ_D G	ATGGA AACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTTTTGTGGGTGCCAG GATCTACAGGGGATGCCGCTCAACCTGCTCGGAGAGCCAGAAGAACAA AGCTGGCCCTGTTTGCCTGCAAGACCGCCAATGGCACAGCCATTCTTATT GGCGGCGGAAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTGGCTCCTGTGGTCAACG TGGGCCAGAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAA CGACTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAGGCTCT GCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTTCCGGCACAGTGAAGTACAGCG GCAGCAGCTACCCATTTCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTGGTGTA CAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCT GTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATTGCCG TGCTGATCCTGCGGCAGACCAACA ACTACAACAGCGACGACTTCCAGTT CGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCACAGGCGGA TGTGATGTGTCGCCAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCG GCTCTGTGCCTATTCCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGTCTCAGAACCTG GGCTACTACCTGAGCGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCATCTTTA CCAACACCGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGAC CCGGAACGGAACAATCATCCCCGCCAACAATACCGTGTCTCTGGGAGCT GTGGGCACCTCTGCTGTTTCTCTGGGCCTGACAGCCA ACTATGCCAGAA CAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGCCGTGAC CTTCGTGTATCAGCCTGGCGACGGAAATGCCGACGTGACCATCACAGTG AATGGCAAGGTGGTGGCCAAAGGCTCTGGACACCACCACCATCACCACT G [SEQ ID NO: 92]
FimH_D eltaGG_ PGDGN_ DG	ATGGA AACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTTTTGTGGGTGCCAG GATCTACAGGGGATGCCGCTCAACCTGCTCGGAGAGCCAGAAGAACAA AGCTGGCCCTGTTTGCCTGCAAGACCGCCAATGGCACAGCCATTCTTATT GGCGGCGGAAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTGGCTCCTGTGGTCAACG TGGGCCAGAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAA CGACTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAGGCTCT GCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTTCCGGCACAGTGAAGTACAGCG GCAGCAGCTACCCATTTCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTGGTGTA CAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCT GTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATTGCCG TGCTGATCCTGCGGCAGACCAACA ACTACAACAGCGACGACTTCCAGTT CGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCACCTGTGAT GTGTCCGCTAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCGGCTCTGT GCCTATTCCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGTCTCAGAACCTGGGCTACT ACCTGAGCGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCATCTTTACCAACAC CGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGACCCGGAAC GGAACAATCATCCCCGCCAACAATACCGTGTCTCTGGGAGCTGTGGGCA CATCTGCTGTTTCTCTGGGCCTGACAGCCA ACTATGCCAGAACAGGCGG ACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGCCGTGACCTTCGTG TATCAGCCTGGCGACGGAAATGCCGACGTGACCATCACAGTGAATGGCA AGGTGGTGGCCAAAGGCTCTGGACACCACCACCATCACCACTG [SEQ ID NO: 93]
FimH_D	ATGGA AACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTTTTGTGGGTGCCAG

GG_sl	<p>GCTCTACAGGCGATTTTGCCTGCAAGACCGCCAACGGCACAGCCATTCC TATTGGCGGAGGCAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTGGCTCCTGTGGTC AACGTGGGCCAGAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCC ACAACGACTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAG GCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTCCGGCACAGTGAAGTA CAGCGGCAGCAGCTACCCATTTCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTG GTGTACAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGA CACCTGTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATT GCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACACTACAACAGCGACGACTTCC AGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCACCTG TGATGTGTCCGCTAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCGGC TCTGTGCCTATTCCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGAGCCAGAACCTGG GCTACTACCTGTCTGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCATCTTTAC CAACACCGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGACC CGGAACGGAACAATCATCCCCGCCAACAATACCGTGTCTCTGGGAGCTG TGGGCACATCTGCTGTTTCTCTGGGCCTGACCGCCAATTATGCCAGAACA GGCGGACAAGTGACCGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGCGTGACCT TCGTGTATCAGCCTGGCGACGGAAACGCCGATGTGACCATCACAGTGAA TGGCAAGGTGGTGGCCAAAGGCTCTGGACACCACCACCATCACCCTGA [SEQ ID NO: 94]</p>
FimH_P GDGN_sl	<p>ATGGAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTTTTGTGGGTGCCAG GCTCTACAGGCGATTTTGCCTGCAAGACCGCCAACGGCACAGCCATTCC TATTGGCGGAGGCAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTGGCTCCTGTGGTC AACGTGGGCCAGAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCC ACAACGACTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAG GCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTCCGGCACAGTGAAGTA CAGCGGCAGCAGCTACCCATTTCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTG GTGTACAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGA CACCTGTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATT GCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACACTACAACAGCGACGACTTCC AGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGG CGGATGTGATGTGTCCGCCAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTAC CCCGGCTCTGTGCCTATTCCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGAGCCAGA ACCTGGGCTACTACCTGTCTGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCAT CTTTACCAACACCGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAG CTGACCCGGAACGGAACAATCATCCCCGCCAACAATACCGTGTCTCTGG GAGCTGTGGGCACCTCTGCTGTTTCTCTGGGCCTGACAGCCAACACTATGCC AGAACAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGC GTGACCTTCGTGTATCAGCCTGGCGACGGAAACGCCGATGTGACCATCA CAGTGAATGGCAAGGTGGTGGCCAAAGGCTCTGGACACCACCACCATCA CCACTGACTCGAG [SEQ ID NO: 95]</p>
FimH_D NKQ_sl	<p>ATGGAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTTTTGTGGGTGCCAG GCTCTACAGGCGATTTTGCCTGCAAGACCGCCAACGGCACAGCCATTCC TATTGGCGGAGGCAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTGGCTCCTGTGGTC AACGTGGGCCAGAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCC ACAACGACTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAG GCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTCCGGCACAGTGAAGTA CAGCGGCAGCAGCTACCCATTTCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTG</p>

	<p>GTGTACAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGAC CACCTGTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATT GCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACACTACAACAGCGACGACTTCC AGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGG CGGATGTGATGTGTCCGCCAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTAC CCCGGCTCTGTGCCTATTCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGAGCCAGA ACCTGGGCTACTACCTGTCTGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCAT CTTTACCAACACCGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAG CTGACCCGGAACGGAACAATCATCCCCGCCAACAATACCGTGTCTCTGG GAGCTGTGGGCACCTCTGCTGTTTCTCTGGGCCTGACAGCCAACACTATGCC AGAACAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGC GTGACATTCGTGTATCAGGACAACAAGCAGGCCGACGTGACCATCACCG TGAATGGCAAAGTGGTGGCCAAAGGCTCTGGCCATCACACCACCATCA CTGACTCGAG [SEQ ID NO: 96]</p>
<p>FIMH_ DG_PG DGN_53 6-MI3</p>	<p>ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAG GCTCTACAGGCGATTTTGCTGCAAGACCGCCAACGGCACAGCCATTCC TATTGGCGGAGGCAGCGCCAATGTGTACGTTAACCTGGCTCCTGCCGTG AACGTGGGCCAGAATCTGGTGGTGGATCTGAGCACCCAGATCTTTTGCC ACAACGACTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAG GCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGTCTAGCTTTAGCGGCACCGTGAAGTA CAACGGCAGCAGCTACCCATTTCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTG GTGTACAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGA CACCTGTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATT GCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACACTACAACAGCGACGACTTCC AGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGG CGGATGTGATGTGTCCGCCAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTAC CCCGGCTCTGTGCCTATTCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGAGCCAGA ACCTGGGCTACTACCTGTCTGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCAT CTTTACCAACACCGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAG CTGACCCGGAACGGAACAATCATCCCCGCCAACAATACCGTGTCTCTGG GAGCTGTGGGCACCTCTGCTGTGTCTTTGGCCTGACAGCCAACACTATGCC AGAACAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGC GTGACCTTCGTGTATCAGCCTGGCGACGGAAACGCCGATGTGACCATCA CAGTGAATGGCAAGGTGGTGGCCAAGAGCGGAAGCCACCACCATCATC ACCATCACACGGCGGCAGCATGAAGATGGAAGAAGTGTCAAGAAGC ACAAGATCGTCGCCGTGCTGCGGGCCAATTCTGTGGAAGAGGCCAAAAA AAAGGCCCTGGCCGTGTTTCTTGGCGGAGTGACCTGATCGAGATCACCC TTTACCGTGCCTGACGCCGACACCGTGATCAAAGAGCTGAGCTTCCTGA AAGAGATGGGCGCCATCATCGGAGCCGGCACAGTGACATCTGTTGAGCA GGCCAGAAAGGCCGTGGAATCTGGCGCCGAGTTTATCGTGTCCCCTCAC CTGGATGAGGAAATCAGCCAGTTCGCCAAAGAAAAGGGCGTGTCTTACA TGCCCGGCGTGATGACACCTACAGAGCTGGTCAAAGCCATGAAGCTGGG CCACACCATCCTGAAGCTGTTTCCAGGCCAAGTCGTGGGCCCTCAGTTC GTGAAAGCTATGAAGGGCCCATTTCCAACGTGAAGTTCGTGCCACTG GCGGCGTGAACCTGGATAATGTGTGCGAGTGGTTCAAGGCTGGCGTGCT GGCTGTTGGAGTTGGCTCTGCTCTGGTCAAAGGGCACACCTGTGGAAGTG GCTGAGAAGGCCAAGGCCCTTCGTGGAAAAGATCAGAGGCTGCACCGAG TGA [SEQ ID NO: 97]</p>

HBcFIM HLJ96	<p>ATGGAAACCGATACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAG GATCTACCGGCGACGACATCGACCCCTACAAAGAGTTTGGCGCCAGCGT CGAGCTGCTGAGCTTCCTGCCTAGCGACTTCTTCCCTTCCATCCGGGATC TGCTGGATAACCGCTAGCGCCCTGTATAGAGAGGCCCTGGAAAGCCCTGA GCACTGCTCTCCACATCACACAGCCCTGAGACAGGCCATCCTGTGTTGG GGCGAACTGATGAATCTGGCCACCTGGGTGCGGAAGCAACCTGGAAGATC CTGGTTCTGGCGGCGGAGGCTTTGCCTGTAAAACAGCCAATGGCACCCG CATTCTATCGGAGGCGGCAGCGCCAATGTGTACGTTAACCTGGCTCCT GTGGTCAACGTGGGCCAGAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCT TTTGCCACAACGACTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCA GAGAGGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTTCCGGCACAGTG AAGTACAGCGGCAGCAGCTACCCATTTCTACCACCAGCGAGACACCCA GAGTGGTGTACAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTA CCTGACACCTGTTAGTTCTGCTGGCGGAGTGGCCATCAAGGCCGGATCT CTGATTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACACTACAACAGCGACG ACTTCCAGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCC TACAGGCGGAGGATCTGGCGGAGCTTCTAGAGAACTGGTCGTGTCCTAC GTGAACGTGAACATGGGCCTGAAGATCCGGCAGCTGCTCTGGTTTACA TCAGCTGTCTGACCTTCGGCCGGGAAACCGTGCTGGAATACCTGGTGT CTTCGGCGTGTGGATCAGAACCCTCCTGCCTATAGACCTCCTAACGCTC CCATCCTGAGCACACTGCCTGAGACAACAGTTGTTGGAAGCGGAGGCGG AGGCCACCACCATCACCATCAT [SEQ ID NO: 98]</p>
HBcFIM HDGJ96	<p>ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCCG GCAGCACCGGCGACGACATCGACCCCTACAAGGAGTTCGGCGCCAGCGT GGAGCTGCTGAGCTTCCTGCCAGCGACTTCTTCCCAGCATCCGGGAC CTGCTGGACACCGCCAGCGCCCTGTACCGGGAGGCCCTGGAGAGCCCCG AGCACTGCAGCCCCACCACACCGCCCTGCGGCAGGCCATCCTGTGCTG GGGCGAGCTGATGAACCTGGCCACCTGGGTGGGCAGCAACCTGGAGGA CCCCGGCAGCGGCGGCGGCGGCTTCGCTGCAAGACCGCCAACGGCACC GCCATCCCCATCGGCGGCGGCAGCGCCAACGTGTACGTGAACCTGGCCC CCGTGGTGAACGTGGGCCAGAACCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGAT CTTCTGCCACAACGACTACCCCGAGACCATCACCGACTACGTGACCCTG CAGCGGGGCAGCGCCTACGGCGGCGTGCTGAGCAACTTCAGCGGCACC GTGAAGTACAGCGGCAGCAGCTACCCCTTCCCACCACCAGCGAGACCC CCCGGGTGGTGTACAACAGCCGGACCGACAAGCCCTGGCCCCTGGCCCT GTACCTGACCCCCGTGAGCAGCGCCGGCGGCGTGCCATCAAGGCCGGC AGCCTGATCGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACACTACAACAGCG ACGACTTCCAGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGT GCCACCGGCGGCTGCGACGTGAGCGCCCGGACGTGACCGTGACCCTG CCGACTACCCCGGCAGCGTGCCCATCCCCCTGACCGTGTACTGCGCCA AGAGCCAGAACCTGGGCTACTACCTGAGCGGCACCACCGCCGACGCCG GCAACAGCATCTTACCAACACCGCCAGCTTCAGCCCCGCCAGGGCGT GGGCGTGCAGCTGACCCGGAACGGCACCATCATCCCCGCCAACAACACC GTGAGCCTGGGCGCCGTGGGCACCAGCGCCGTGAGCCTGGGCCTGACCG CCAACACTACGCCCGGACCGGCGGCCAGGTGACCGCCGGCAACGTGCAGA GCATCATCGGCGTGACCTTCGTGTACCAGCCCGGCGACGGCAACGCCGA CGTGACCATCACCGTGAACGGCAAGGTGGTGGCCAAGGGCAGCGGCGG CGGCGGCGCCAGCCGGGAGCTGGTGGTGGTACGTGAACGTGAACAT</p>

GGGCCTGAAGATCCGGCAGCTGCTGTGGTCCACATCAGCTGCCTGACC TTCGGCCGGGAGACCGTGCTGGAGTACCTGGTGAGCTTCGGCGTGTGGA TCCGGACCCCCCGCCTACCGGCCCCCAACGCCCCATCCTGAGCAC CCTGCCCAGACCACCGTGGTGGGCAGCGGCGGCGGCCACCACCA CCACCACCAC [SEQ ID NO: 99]
--

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую или состоящую из:

- (a) FimH; или варианта, фрагмента и/или слияния FimH, и
- (b) комплементирующей аминокислотной последовательности донорной

цепи,

где (b) расположена после (a).

2. Полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности X-(a)-L-(b)-Y, где «(a)» представляет собой полипептид FimH; или вариант, фрагмент и/или слияние FimH; «L» представляет собой возможный первый линкер; «(b)» представляет собой комплементирующую аминокислотную последовательность донорной цепи, «X» представляет собой возможную N-концевую аминокислотную последовательность; «Y» представляет собой возможную C-концевую аминокислотную последовательность, где «Y» не имеет происхождение из FimC или FimH или их фрагмента.

3. Полипептид по п. 1 или п. 2, где (a) содержит или состоит из:

(A) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 (номер доступа в Genbank: ELL41155.1 (FimH *E. coli* J96)), SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 100 (номер доступа в Genbank: ABG72591.1 (FimH UPEC 536)), SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102 (номер доступа в Genbank: AAN83822.1 (FimH CFT073)), SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104 (номер доступа в Genbank: AJE58925.1 (FimH *E. coli* 789)), SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106 (номер доступа в Genbank: AAC35864.1, соответствует последовательности нуклеиновой кислоты AF089840.1 (FimH IHE3034)) или SEQ ID NO: 107,

(B) аминокислотной последовательности, содержащей от 1 до 10 одиночных аминокислотных изменений по сравнению с SEQ ID NO: 1 (номер доступа в Genbank: ELL41155.1 (FimH *E. coli* J96)), SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 100 (номер доступа в Genbank: ABG72591.1 (FimH UPEC 536)), SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102 (номер доступа в Genbank: AAN83822.1 (FimH CFT073)), SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104 (номер доступа в Genbank: AJE58925.1 (FimH *E. coli* 789)), SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106 (номер доступа в Genbank: AAC35864.1, соответствует последовательности нуклеиновой кислоты AF089840.1 (FimH IHE3034)) или SEQ ID NO: 107, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,

9 или 10 одиночных аминокислотных изменений,

(C) аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 (номер доступа в Genbank: ELL41155.1 (FimH *E. coli* J96)), SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 100 (номер доступа в Genbank: ABG72591.1 (FimH UPEC 536)), SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102 (номер доступа в Genbank: AAN83822.1 (FimH CFT073)), SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104 (номер доступа в Genbank: AJE58925.1 (FimH *E. coli* 789)), SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106 (номер доступа в Genbank: AAC35864.1, соответствует последовательности нуклеиновой кислоты AF089840.1 (FimH IHE3034)) или SEQ ID NO: 107, например 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, и/или

(D) фрагмента из по меньшей мере 10 последовательных аминокислот из SEQ ID NO: 1 (номер доступа в Genbank: ELL41155.1 (FimH *E. coli* J96)), SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 100 (номер доступа в Genbank: ABG72591.1 (FimH UPEC 536)), SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102 (номер доступа в Genbank: AAN83822.1 (FimH CFT073)), SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104 (номер доступа в Genbank: AJE58925.1 (FimH *E. coli* 789)), SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106 (номер доступа в Genbank: AAC35864.1, соответствует последовательности нуклеиновой кислоты AF089840.1 (FimH IHE3034)) или SEQ ID NO: 107, например по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 275, 280, 290 или 300 последовательных аминокислот.

4. Полипептид по любому из пп. 1-3, где одна или более аминокислот, которые, как известно или прогнозируется, являются N-гликозилированными или O-гликозилированными, заменены серином (S), аланином (A), аспарагиновой кислотой (D) или глутамином (Q).

5. Полипептид по п. 4, где (а) содержит одну или более из следующих аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 2: N28S, N91D, N249D, N256D, либо замены в положениях SEQ ID NO: 101, 103 и 105, соответствующих указанным положениям в SEQ ID NO: 2, например одну, две, три или четыре из указанных аминокислотных замен.

6. Полипептид по любому из пп. 1-5, где (b) содержит или состоит из:

(1) 6-28 аминокислот из SEQ ID NO: 3; или ее фрагмента и/или варианта, или

(2) 8-36 аминокислот из SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта.

7. Полипептид по п. 6, где указанные 6-28 аминокислот из SEQ ID NO: 3 соответствуют группе, состоящей из:

- (1) аминокислот 1-28 из SEQ ID NO: 3,
- (2) аминокислот 2-27 из SEQ ID NO: 3,
- (3) аминокислот 3-26 из SEQ ID NO: 3,
- (4) аминокислот 4-25 из SEQ ID NO: 3,
- (5) аминокислот 5-24 из SEQ ID NO: 3,
- (6) аминокислот 6-23 из SEQ ID NO: 3,
- (7) аминокислот 7-22 из SEQ ID NO: 3,
- (8) аминокислот 8-21 из SEQ ID NO: 3,
- (9) аминокислот 9-20 из SEQ ID NO: 3,
- (10) аминокислот 10-19 из SEQ ID NO: 3,
- (11) аминокислот 11-18 из SEQ ID NO: 3, и
- (12) аминокислот 12-17 из SEQ ID NO: 3.

8. Полипептид по п. 6, где указанные 8-36 аминокислот из SEQ ID NO: 4 соответствуют группе, состоящей из:

- (1) аминокислот 1-36 из SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,
- (2) аминокислот 2-35 из SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,
- (3) аминокислот 3-34 из SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,
- (4) аминокислот 4-33 из SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,
- (5) аминокислот 5-32 из SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,
- (6) аминокислот 6-31 из SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,
- (7) аминокислот 7-30 из SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,
- (8) аминокислот 8-29 из SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,
- (9) аминокислот 9-28 из SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,
- (10) аминокислот 10-27 из SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,
- (11) аминокислот 11-26 из SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,
- (12) аминокислот 12-25 из SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,
- (13) аминокислот 13-24 из SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,
- (14) аминокислот 14-23 из SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта,

(15) аминокислот 15-24 из SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта, и

(16) аминокислот 16-23 из SEQ ID NO: 4; или ее фрагмента и/или варианта.

9. Полипептид по любому из пп. 1-8, где (b) содержит или состоит из:

(A) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6,

(Б) аминокислотной последовательности, содержащей от 1 до 10 одиночных аминокислотных изменений по сравнению с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 одиночных аминокислотных изменений,

(B) фрагмента из по меньшей мере 7 последовательных аминокислот из SEQ ID NO: 5, например по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12 или 13 последовательных аминокислот из SEQ ID NO: 5, или

(Г) фрагмента из по меньшей мере 7 последовательных аминокислот из SEQ ID NO: 6, например по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 последовательных аминокислот из SEQ ID NO: 6.

10. Полипептид по п. 1 или п. 2, где (b) содержит или состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 5.

11. Полипептид по любому из пп. 1-10, где (b) является:

(1) непосредственно присоединенной к С-концу (a), или

(2) присоединенной к С-концу (a) посредством первого линкера.

12. Полипептид по любому из п. 2 или подпункта (2) п. 11, где указанный первый линкер, или «L», содержит или состоит из 2-20 аминокислот, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот.

13. Полипептид по любому из п. 2 или п. 12, где указанный первый линкер начинается с пролина.

14. Полипептид по любому из п. 2 и пп. 11-13, где указанный первый линкер содержит или состоит из полярных аминокислот, например где указанный первый линкер полностью состоит из полярных аминокислот или, если первый линкер начинается с пролина, то остальные аминокислоты являются полярными.

15. Полипептид по любому из п. 2 и пп. 11-14, где указанный первый линкер содержит или состоит из:

(1) PGDGN [SEQ ID NO: 7], или ее варианта или слияния, или

(2) DNKQ [SEQ ID NO: 8], или ее варианта или слияния.

16. Полипептид по любому из пп. 1-15, содержащий аффинную метку для очистки белка на N-конце, С-конце и/или внутри последовательности, например 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных остатков гистидина.

17. Полипептид по любому из пп. 1-16, где указанный полипептид или «X» содержит лидерную последовательность для клеточной секреции:

- (1) перед (а), или
- (2) на N-конце полипептида.

18. Полипептид по п. 17, где указанная лидерная последовательность для клеточной секреции выбрана из группы, состоящей из:

- (1) METDTLLLWVLLLWVPGSTGD [SEQ ID NO: 9], или ее варианта или слияния,
- (2) METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRRRTKLAL [SEQ ID NO: 10], или ее варианта или слияния,
- (3) MRLLAKIIICLMLWAICVA [SEQ ID NO: 11], или ее варианта или слияния,
- (4) MGWSCIIIFLVATATGVHS [SEQ ID NO: 12], или ее варианта или слияния,
- (5) METPAELLFLLLWLPDTTG [SEQ ID NO: 13], или ее варианта или слияния,
- (6) METDTLLLWVLLLWVPGSTG [SEQ ID NO: 108], или ее варианта или слияния, или
- (7) MEFGLSWVFLVAILEGVHC [SEQ ID NO: 14], или ее варианта или слияния.

19. Полипептид по любому из пп. 1-18, содержащий домен в форме наночастицы на N-конце или С-конце, возможно где «X» или «Y» содержит домен в форме наночастицы.

20. Полипептид по п. 19, где указанный домен в форме наночастицы выбран из группы, состоящей из:

- (1) ферритина (например, [SEQ ID NO: 15] или [SEQ ID NO: 109] (*Helicobacter pylori*), [SEQ ID NO: 16] (*Escherichia coli*) или любой из [SEQ ID NO: 149]-[SEQ ID NO: 152] (стабилизированного, из *Escherichia coli*)), или его варианта и/или фрагмента,

- (2) iMX313 (например, [SEQ ID NO: 17]), или его варианта и/или фрагмента,
- (3) mI3 (например, [SEQ ID NO: 18]), или его варианта и/или фрагмента,
- (4) инкапсулина (например, [SEQ ID NO: 19]), или его варианта и/или фрагмента, или
- (5) самособирающихся белков вирусной оболочки, таких как белок оболочки фага AP205 *Acinetobacter* (ссылка на последовательность в NCBI: NP_085472.1), корового белка вируса гепатита В (HBc) [SEQ ID NO: 110] или бактериофага Q β [SEQ ID NO: 111], или их варианта и/или фрагмента.

21. Полипептид по п. 19 или п. 20, где указанный домен в форме наночастицы является:

- (1) непосредственно присоединенным к полипептиду, или
- (2) присоединенным к полипептиду посредством второго линкера.

22. Полипептид по любому из пп. 19-22, где указанный второй линкер содержит или состоит из 2-20 аминокислот, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот.

23. Полипептид по любому из пп. 19-22, где указанный второй линкер содержит или состоит из остатков глицина (G) и/или серина (S).

24. Полипептид по любому из пп. 19-23, где указанный второй линкер выбран из группы, состоящей из:

- (1) GSSGSGSGS [SEQ ID NO: 112], или ее варианта или слияния,
- (2) GGSGS [SEQ ID NO: 113], или ее варианта или слияния,
- (3) GGS, или ее варианта или слияния,
- (4) SGSHHHHHHHGGS [SEQ ID NO: 114], или ее варианта или слияния,
- (5) AKFVAAWTLKAAA [SEQ ID NO: 115], или ее варианта или слияния,
- (6) GGGGSLVPRGSGGGGS [SEQ ID NO: 116], или ее варианта или слияния,
- (7) EAAAKEAAAKEAAKA [SEQ ID NO: 117], или ее варианта или слияния,
- (8) SGSFVAAWTLKAAAGGS [SEQ ID NO: 118], или ее варианта или слияния, и
- (9) SGSGSGGGGGGS [SEQ ID NO: 119], или ее варианта или слияния.

25. Полипептид по любому из пп. 19-24, где указанный домен в форме наночастицы расположен:

- (1) перед (a),
- (2) на N-конце полипептида,
- (3) после (b), или
- (4) на C-конце полипептида.

26. Полипептидный мономер, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая имеет:

(1) по меньшей мере 80% идентичности последовательности, например по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16 и содержит одну или более мутаций из группы, состоящей из: глицина (G) в положении, которое соответствует остатку 34 в SEQ ID NO: 16 (мутация T34G), аспарагиновой кислоты (D) в положении, которое соответствует остатку 70 в SEQ ID NO: 16 (мутация N70D), изолейцина (I) в положении, которое соответствует остатку 72 в SEQ ID NO: 16 (мутация V72I), и аланина (A) в положении, которое соответствует остатку 124 в SEQ ID NO: 16 (мутация S124A);

(2) аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности, например по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16 и содержит глицин (G) в положении, которое соответствует остатку 34 в SEQ ID NO: 16 (мутация T34G), аспарагиновую кислоту (D) в положении, которое соответствует остатку 70 в SEQ ID NO: 16 (мутация N70D), изолейцин (I) в положении, которое соответствует остатку 72 в SEQ ID NO: 16 (мутация V72I), и аланин (A) в положении, которое соответствует остатку 124 в SEQ ID NO: 16 (мутация S124A), возможно где указанный полипептидный мономер содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности, например по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 149.

(3) имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности, например по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:

16 и содержит глицин (G) в положении, которое соответствует остатку 34 в SEQ ID NO: 16 (мутация T34G), изолейцин (I) в положении, которое соответствует остатку 72 в SEQ ID NO: 16 (мутация V72I), и аланин (A) в положении, которое соответствует остатку 124 в SEQ ID NO: 16 (мутация S124A), возможно где указанный полипептидный мономер содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности, например по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 150.

(4) имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности, например по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16 и содержит глицин (G) в положении, которое соответствует остатку 34 в SEQ ID NO: 16 (мутация T34G), и аланин (A) в положении, которое соответствует остатку 124 в SEQ ID NO: 16 (мутация S124A), возможно где указанный полипептидный мономер содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности, например по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 151.

(5) имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности, например по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16 и содержит глицин (G) в положении, которое соответствует остатку 34 в SEQ ID NO: 16 (мутация T34G), возможно где указанный полипептидный мономер содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности, например, по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 152.

27. Полипептидный мономер по п. 26, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151 и SEQ ID NO: 152.

28. Наночастица, содержащая полипептидный мономер по п. 26 или п. 27.

29. Наночастица по п. 29, где указанная наночастица представляет собой гомоолигомер.

30. Наночастица по п. 28 или п. 29, где структура внешней поверхности или структура внутренней поверхности указанной наночастицы несет один или более антигенов и/или иммуностимуляторов.

31. Наночастица по п. 30, где указанный антиген содержит или состоит из полипептида по любому из пп. 1-18.

32. Наночастица по п. 31, содержащая или состоящая из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности, например по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 130 или 153.

33. Полипептид по любому из пп. 1-32, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая соответствует:

- (1) SEQ ID NO: 20, или ее варианту и/или фрагменту,
- (2) SEQ ID NO: 21, или ее варианту и/или фрагменту,
- (3) SEQ ID NO: 22, или ее варианту и/или фрагменту,
- (4) SEQ ID NO: 23, или ее варианту и/или фрагменту,
- (5) SEQ ID NO: 24, или ее варианту и/или фрагменту,
- (6) SEQ ID NO: 25, или ее варианту и/или фрагменту,
- (7) SEQ ID NO: 26, или ее варианту и/или фрагменту,
- (8) SEQ ID NO: 27, или ее варианту и/или фрагменту,
- (9) SEQ ID NO: 28, или ее варианту и/или фрагменту,
- (10) SEQ ID NO: 29, или ее варианту и/или фрагменту,
- (11) SEQ ID NO: 30, или ее варианту и/или фрагменту,
- (12) SEQ ID NO: 31, или ее варианту и/или фрагменту,
- (13) SEQ ID NO: 32, или ее варианту и/или фрагменту,
- (14) SEQ ID NO: 33, или ее варианту и/или фрагменту,
- (15) SEQ ID NO: 34, или ее варианту и/или фрагменту,
- (16) SEQ ID NO: 35, или ее варианту и/или фрагменту,
- (17) SEQ ID NO: 36, или ее варианту и/или фрагменту,

- (18) SEQ ID NO: 37, или ее варианту и/или фрагменту,
- (19) SEQ ID NO: 38, или ее варианту и/или фрагменту,
- (20) SEQ ID NO: 39, или ее варианту и/или фрагменту,
- (21) SEQ ID NO: 40, или ее варианту и/или фрагменту,
- (22) SEQ ID NO: 41, или ее варианту и/или фрагменту,
- (23) SEQ ID NO: 42, или ее варианту и/или фрагменту,
- (24) SEQ ID NO: 43, или ее варианту и/или фрагменту,
- (25) SEQ ID NO: 44, или ее варианту и/или фрагменту,
- (26) SEQ ID NO: 79, или ее варианту и/или фрагменту,
- (27) SEQ ID NO: 80, или ее варианту и/или фрагменту,
- (28) SEQ ID NO: 81, или ее варианту и/или фрагменту,
- (29) SEQ ID NO: 82, или ее варианту и/или фрагменту,
- (30) SEQ ID NO: 83, или ее варианту и/или фрагменту,
- (31) SEQ ID NO: 84, или ее варианту и/или фрагменту,
- (32) SEQ ID NO: 85, или ее варианту и/или фрагменту,
- (33) SEQ ID NO: 86, или ее варианту и/или фрагменту,
- (34) SEQ ID NO: 87, или ее варианту и/или фрагменту,
- (35) SEQ ID NO: 88, или ее варианту и/или фрагменту,
- (36) SEQ ID NO: 89, или ее варианту и/или фрагменту,
- (37) любой из SEQ ID NO: 120-124, SEQ ID NO: 129-143 и 153, или ее варианту и/или фрагменту.

34. Полипептид по любому из пп. 1-33, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 70% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 123 или SEQ ID NO: 124, например 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 123 или SEQ ID NO: 124.

35. Полипептид по любому из пп. 1-34, где связывание маннозы указанным полипептидом на по меньшей мере 20% ниже, чем таковое для нативного FimH в комплексе с нативным FimC (комплекса FimHC), например на по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% ниже.

36. Полипептид по любому из пп. 1-35, где FimH находится в низкоаффинной

конформации, то есть в напряженном (Т) состоянии.

37. Полипептид по любому из пп. 1-36, где аутоагрегация, индуцированная указанным полипептидом, на по меньшей мере 20% ниже, чем таковая для нативного FimH, например на по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% ниже.

38. Полипептид по любому из пп. 1-37, где указанный полипептид способен ингибировать адгезию бактерий на по меньшей мере 20%, например на по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или на 100%.

39. Полипептид по любому из пп. 1-38, где иммуногенность указанного полипептида против FimH на по меньшей мере 20% выше, чем таковая для нативного FimH в комплексе с нативным FimC (в частности, включая FimH в высокоаффинной конформации, релаксированном (R) состоянии (см. выше)), например на по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% или 500% выше.

40. Полипептид по любому из пп. 1-39, где указанный полипептид способен ингибировать гемагглютинацию эритроцитов морской свинки в по меньшей мере 2 раза, например в по меньшей мере 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз.

41. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по любому из пп. 1-40, например ДНК или РНК, кодируемая любой из SEQ ID NO: 45-77, 90-99 или их вариантом и/или фрагментом.

42. Нуклеиновая кислота по п. 42, где указанная нуклеиновая кислота была оптимизирована по кодонам для экспрессии в выбранной прокариотической или эукариотической клетке, например клетке дрожжей (например, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), клетке насекомого (например, клетках Sf21 или клетках Sf9 *Spodoptera frugiperda*) или клетке млекопитающего (Expri293, Expri293GNTI, клетках яичника китайского хомячка (CHO) и эмбриональных клетках почки человека 293 (HEK 293)).

43. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 41 или п. 42.

44. Вектор по п. 43, где указанный вектор представляет собой плазмиду, например экспрессионную плазмиду.

45. Вектор по п. 43 или п. 44, где указанная плазида выбрана из группы, состоящей из pCDNA3.1 (Life Technologies), pCDNA3.4 (Life Technologies), pFUSE,

pBROAD, pSEC, pCMV, pDSG-IBA и pHEK293 Ultra, или выбрана из группы из pACYCDuet-1, pTrcHis2A, pET21, pET15TEV, pET22b+, pET303/CT-HIS, pET303/CT, pBAD/Myc-His A, pET303, pET24b(+).

46. Вектор по п. 43, где указанный вектор представляет собой вирусный вектор, например РНК-содержащий вирусный вектор.

47. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 41 или п. 42 или вектор по любому из пп. 43-46.

48. Клетка по п. 46, где указанная клетка не обладает активностью N-ацетилглюкозаминилтрансферазы I (GnTI).

49. Клетка по п. 47 или п. 48, где указанная клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из Expi293, Expi293GNTI (Life Technologies), клеток яичника китайского хомячка (CHO), клеток NIH-3T3, клеток 293-T, клеток Vero, клеток HeLa, клеток PERC.6 (депонированных в ECACC (Европейской коллекции клеточных культур животных) под номером 96022940), клеток Hep G2, MRC-5 (CCL-171 в ATCC (Американской коллекции типовых культур)), WI-38 (CCL-75 в ATCC), фетальных клеток легкого макака-резус (CL-160 в ATCC), клеток почки быка Madin-Darby («MDBK»), клеток почки собаки Madin-Darby («MDCK») (например, MDCK (NBL2), CCL34 в ATCC; или MDCK 33016, DSM ACC 2219), клеток почки новорожденного хомяка (ВНК), таких как клетки ВНК21-F, клеток НКСС и эмбриональных клеток почки человека 293 (HEK 293).

50. Клетка по п. 47, где указанные клетки-хозяева выбраны из клеток *Escherichia coli* штаммов BL21(DE3), HMS174 (DE3), Origami 2 (DE3), BL21DE3T1r или T7 Shuffle Express.

51. Культура клеток, содержащая клетку по любому из пп. 47-50.

52. Способ получения полипептида, определенного в любом из пп. 1-40, путем экспрессии белка в клетке, как она определена в любом из пп. 47-50, в подходящих условиях и в подходящей среде, где посредством этого экспрессируется кодируемый полипептид.

53. Способ по п. 52, дополнительно включающий сбор экспрессированных полипептидов из культивируемой(ых) клетки(ок) и/или культуральной среды и возможно очистку собранных полипептидов.

54. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид по любому из пп. 1-

40, нуклеиновую кислоту по любому из п. 41 или п. 42 или вектор по любому из пп. 43-46.

55. Вакцина, содержащая полипептид по любому из пп. 1-40, нуклеиновую кислоту по п. 41 или п. 42 или вектор по любому из пп. 43-46.

56. Вакцина по п. 55, дополнительно содержащая адъювант.

57. Вакцина по п. 56, где указанный адъювант содержит любой из: 3D-MPL (3-деацелированный монофосфориллипид А), QS21 и липосом, например липосом, содержащих холестерин.

58. Вакцина по п. 57, где указанный адъювант содержит 3D-MPL, QS21 и липосомы, содержащие холестерин.

59. Вакцина по любому из пп. 55-58, где указанная вакцина вызывает защитный иммунный ответ после одной или двух доз.

60. Полипептид по любому из пп. 1-40, нуклеиновая кислота по п. 41 или п. 42, или вектор по любому из пп. 43-46, или вакцина по пп. 55-59 для применения в медицине.

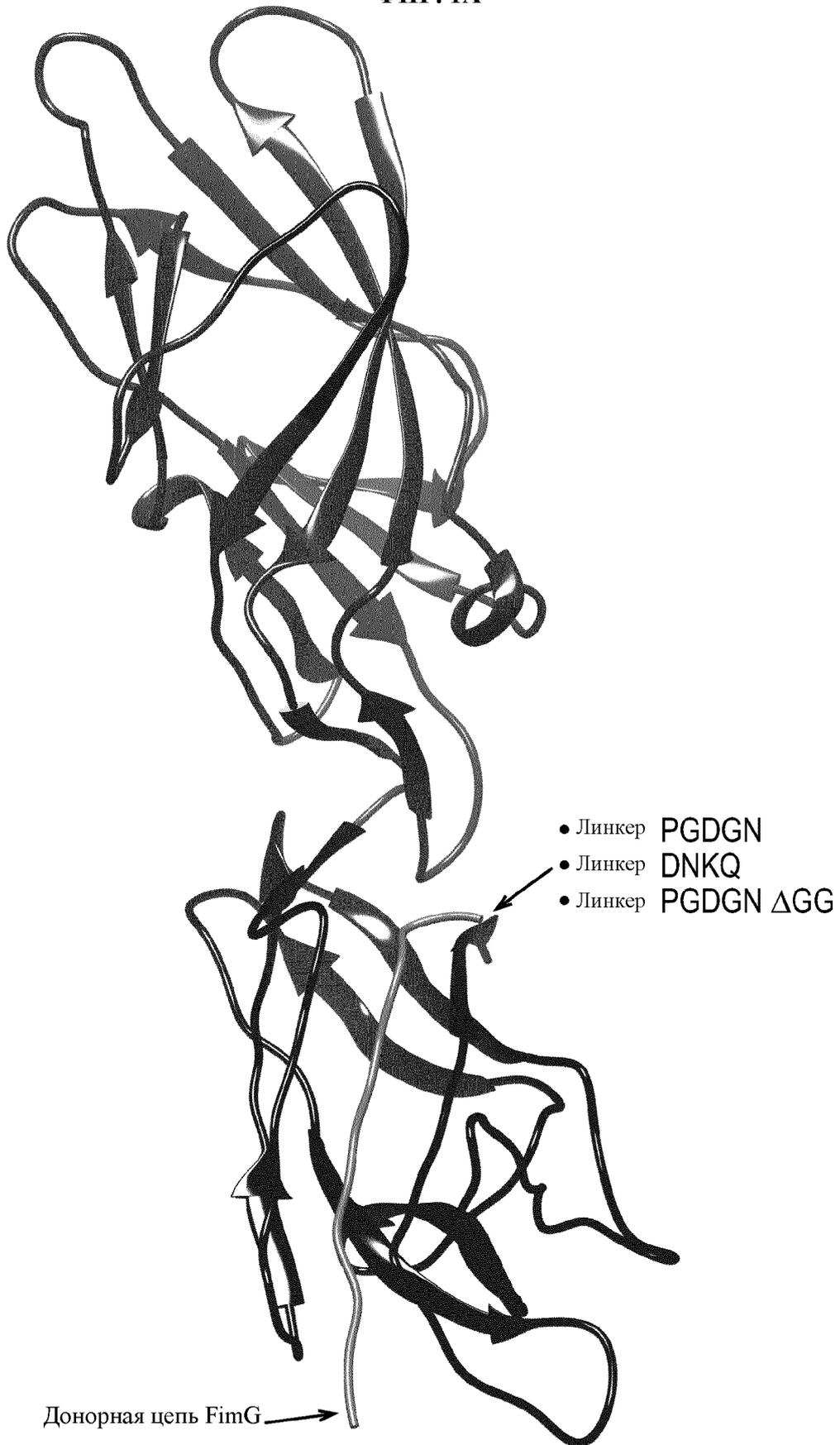
61. Полипептид по любому из пп. 1-40, нуклеиновая кислота по п. 41 или п. 42, или вектор по любому из пп. 43-46, или вакцина по пп. 55-59 для применения в вызывании иммунного ответа у млекопитающего, например для лечения и/или предупреждения одного или более заболеваний.

62. Применение полипептида по любому из пп. 1-40, нуклеиновой кислоты по п. 41 или п. 42, или вектора по любому из пп. 43-46, или вакцины по пп. 55-59 для вызывания иммунного ответа у млекопитающего, например для лечения и/или предупреждения одного или более заболеваний.

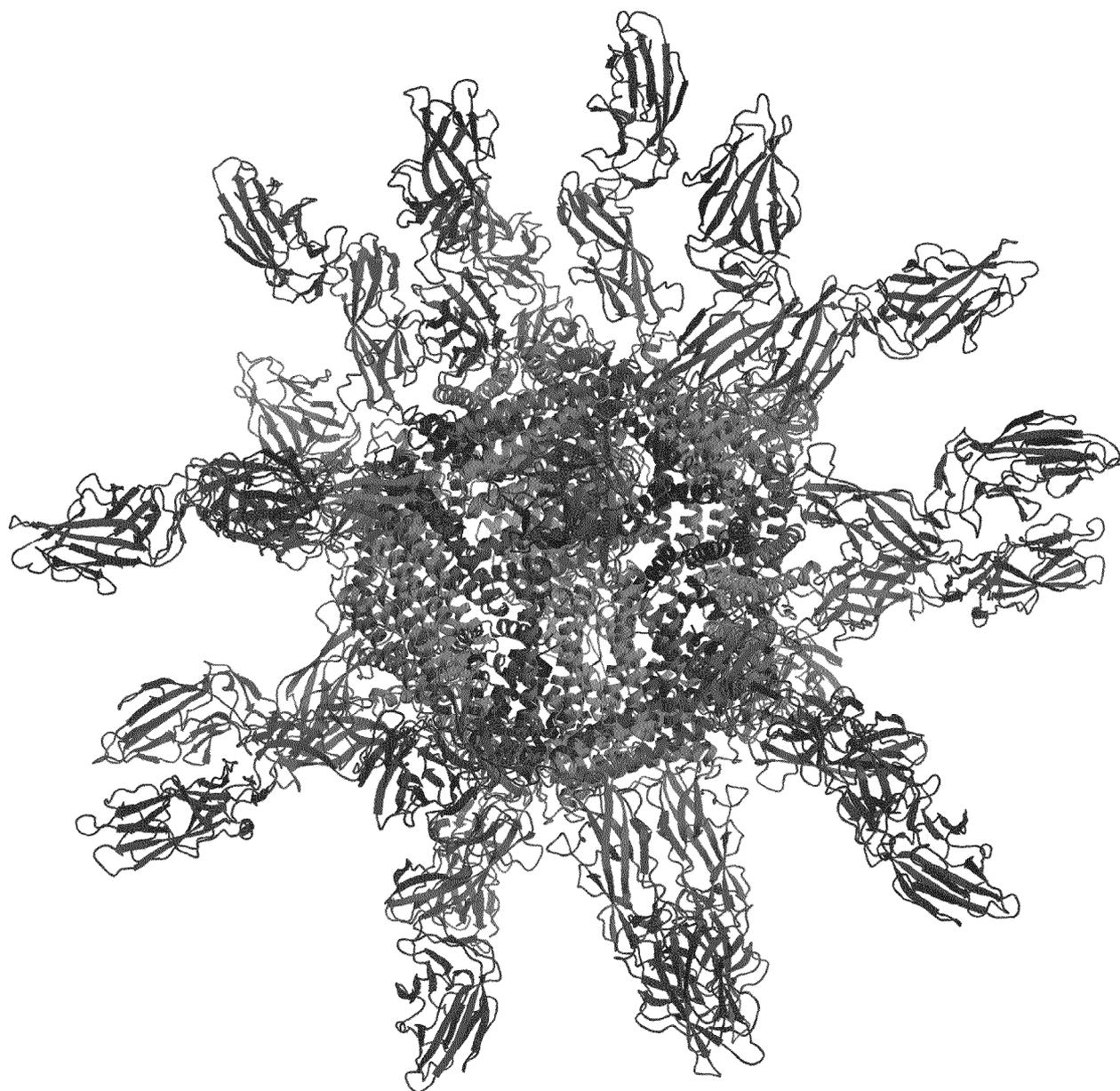
63. Применение полипептида по любому из пп. 1-40, нуклеиновой кислоты по п. 41 или п. 42, или вектора по любому из пп. 43-46, или вакцины по пп. 55-59 для получения лекарственного средства для вызывания иммунного ответа у млекопитающего, например для лечения и/или предупреждения одного или более заболеваний.

64. Способ вызывания иммунного ответа у млекопитающего, включающий или состоящий из введения млекопитающему эффективного количества полипептида по любому из пп. 1-40, нуклеиновой кислоты по п. 41 или п. 42, или вектора по любому из пп. 43-46, или вакцины по пп. 55-59.

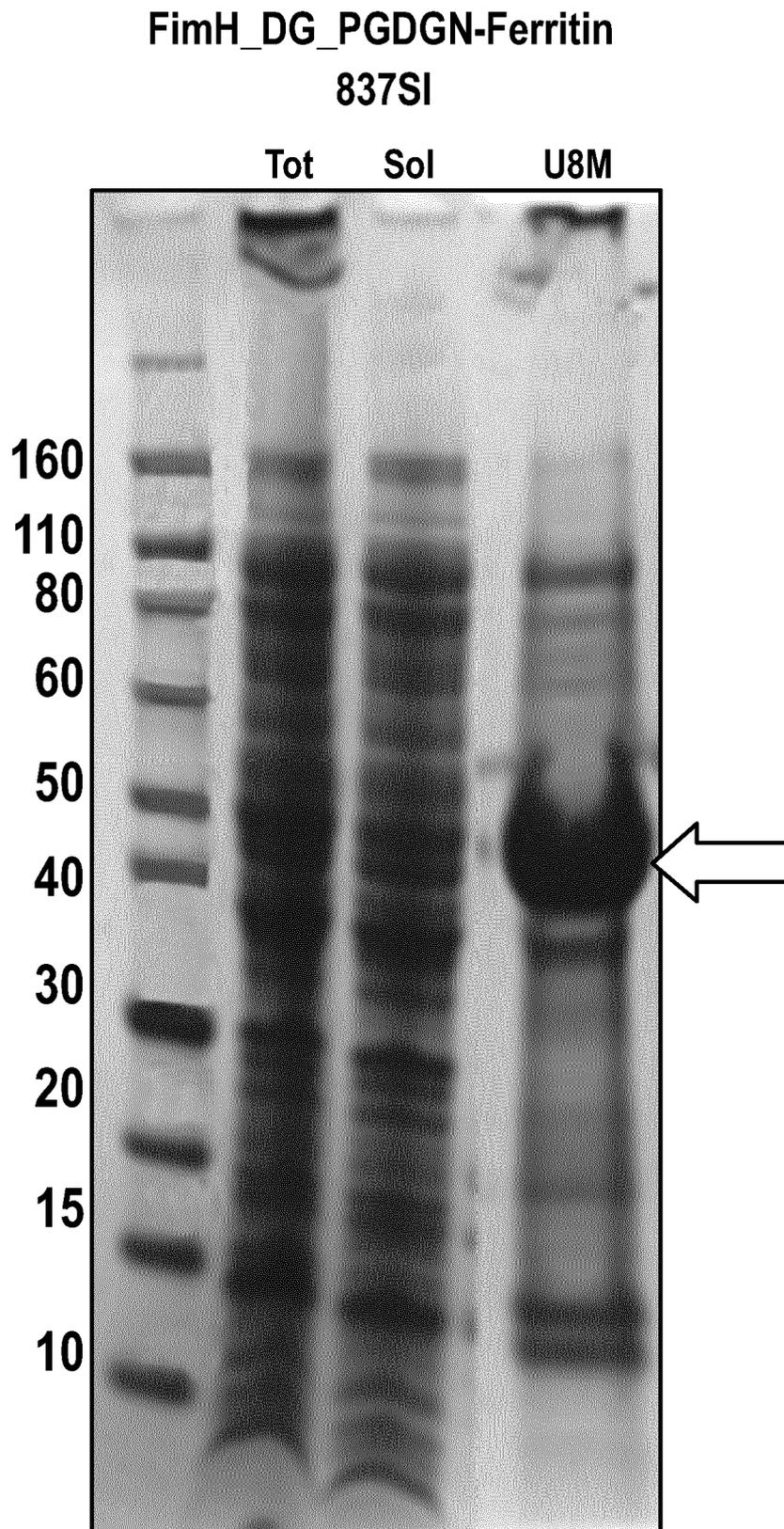
ФИГ. 1А



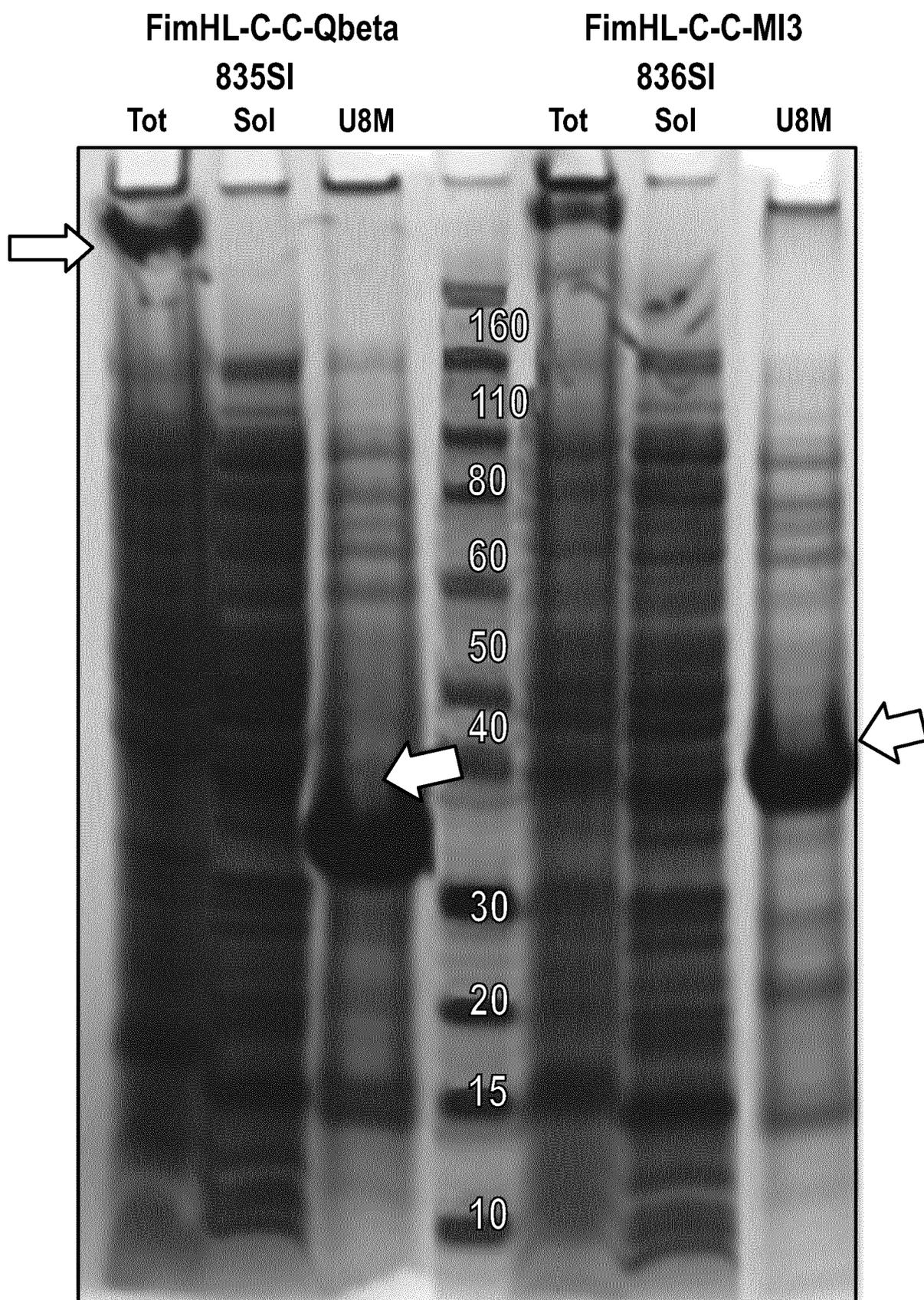
ФИГ. 1В



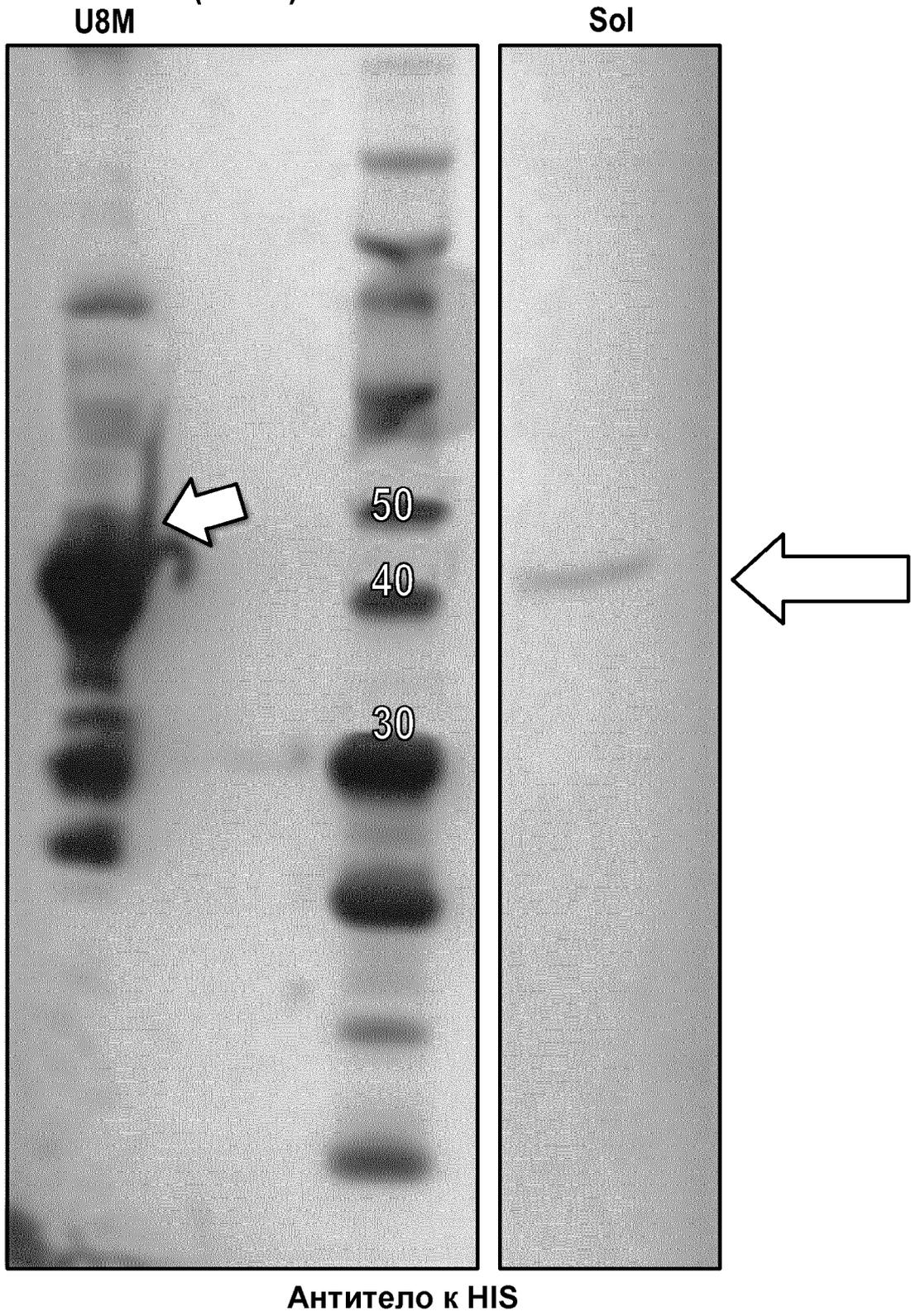
ФИГ. 2А Экспрессия в цитоплазме



ФИГ. 2А (продолжение) Экспрессия в цитоплазме

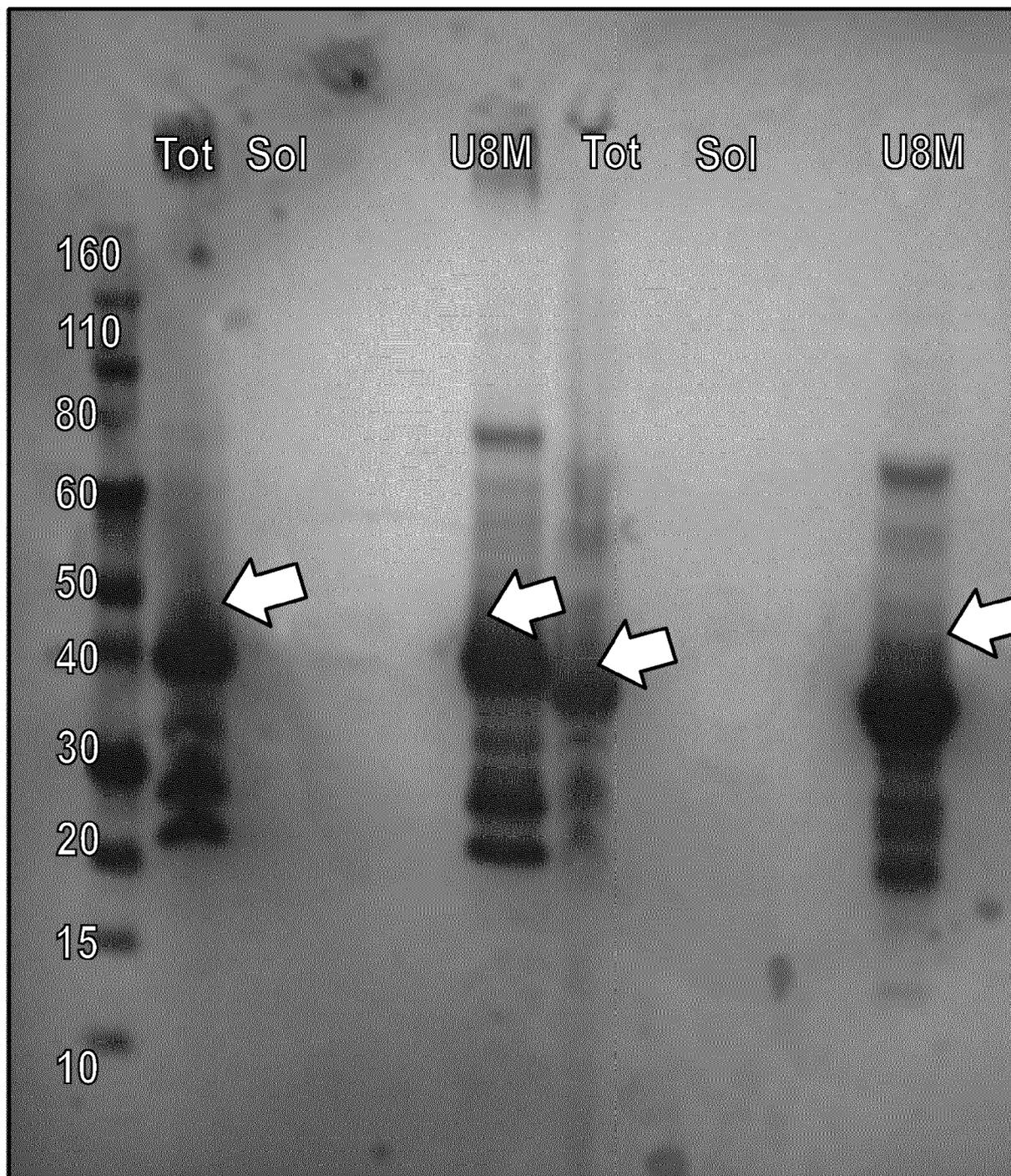


**ФИГ. 2А (продолжение) Экспрессия в цитоплазме
FimHL-NOCYS-MI3
(913SI)**



ФИГ. 2В

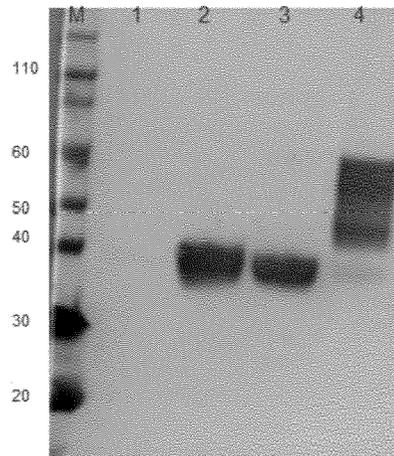
Экспрессия в периплазме FimHL-MI3 (887SI) Экспрессия в цитоплазме FimHL-Ferritin (888SI)



Антитело к HIS

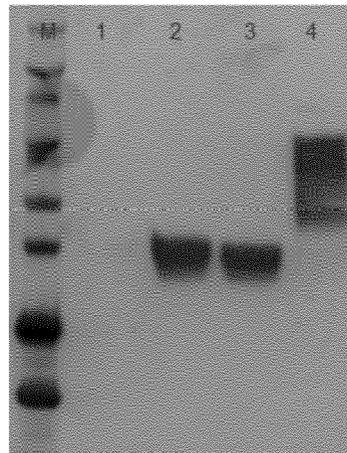
Expri 293 GnTI

экспрессия 3 gg



WB: Антитело к His-метке

экспрессия 6 gg

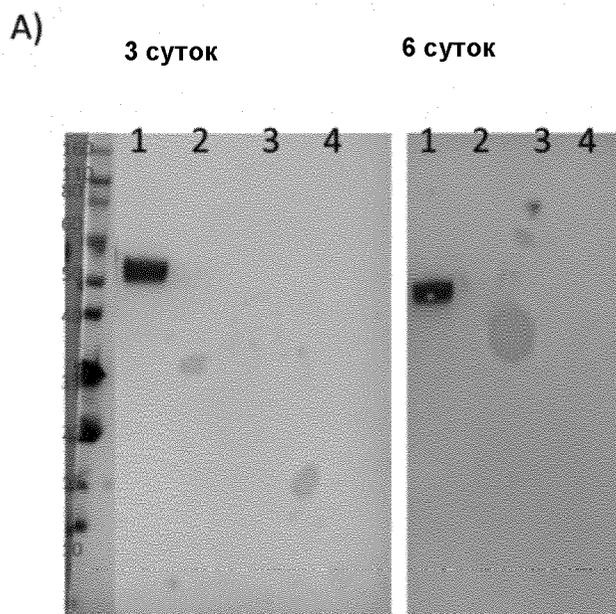


M	Маркер молекулярной массы белков Novex sharp	MW
1	FimH_ΔGG_PGDN_DG	34
2	FimH_DNKQ_DG	34
3	FimH_PGDN_DG	34
4	FimH_C-His	32

ФИГ. 4

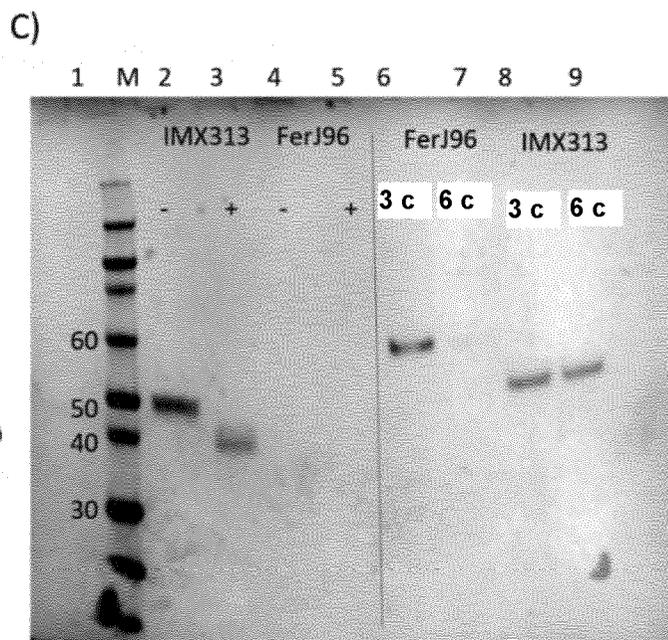
8/47

Лидер IgK + дополнительные N-концевые аминокислоты



Антитело к HIS

- 1- FIMH-DG-PGDGN-ferritin (штамм 536) MW 53 кДа
- 2- FIMHL-MI3 (MW 42 кДа)
- 3-FIMH-MI3 (MW 54 кДа)
- 4- FIMH-IMX313 (MW 38 кДа)



Нетрансфицированные EXP1 Антитело к His-метке

- Маркер
- 2- FimH-DG-PGDGN-IMX313 - ПНГаза
 - 3- FimH-DG-PGDGN-IMX313 +ПНГаза
 - 4- FimHj96-DG-PGDGN-FERRITIN - ПНГаза
 - 5- FimHj96-DG-PGDGN-FERRITIN +ПНГаза
 - 6- FimHj96-DG-PGDGN-FERRITIN сбор супернатанта через 3 суток
 - 7-FimHj96-DG-PGDGN-FERRITIN сбор супернатанта через 6 суток
 - 8- FimHj96-DG-PGDGN-IMX313 сбор супернатанта через 3 суток
 - 9-FimHj96-DG-PGDGN-IMX313 сбор супернатанта через 6 суток

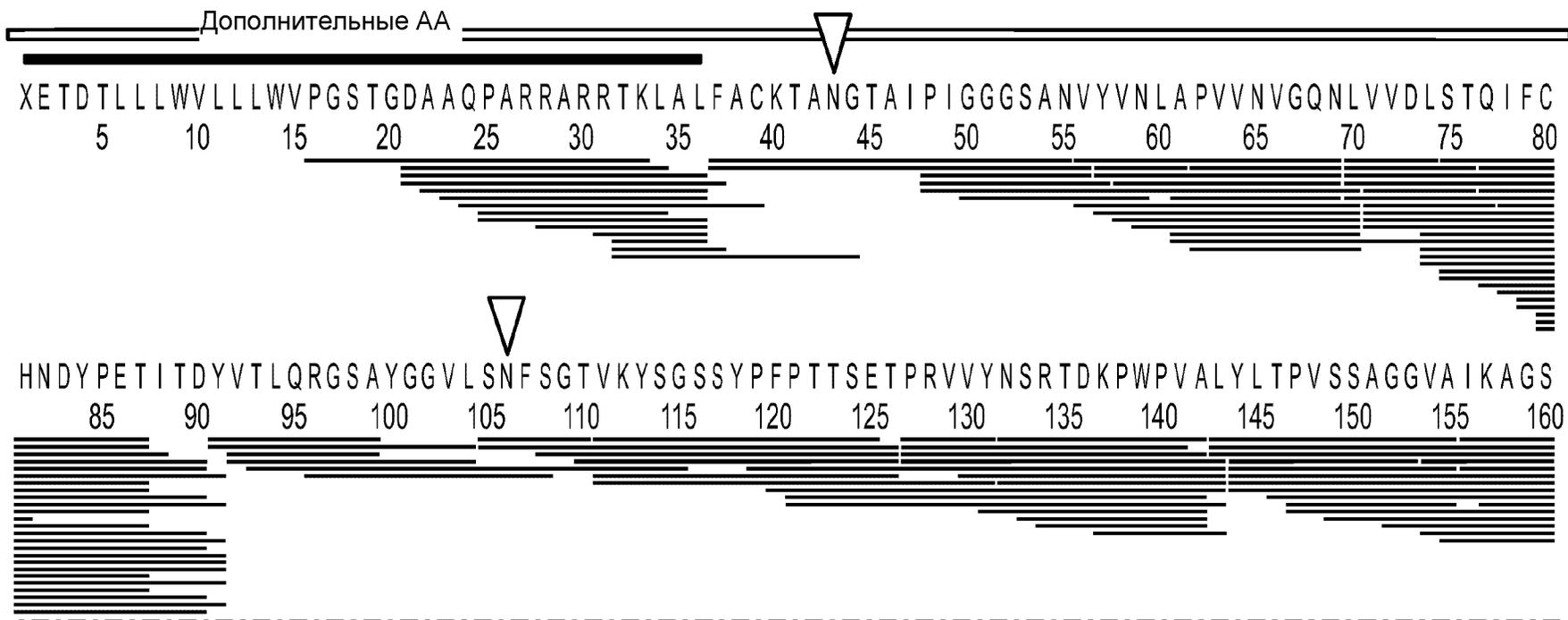
ФИГ. 5

ФИГ. 6

FimH_DNKQ_DG His

▽ Возможные сайты
N-гликозилирования

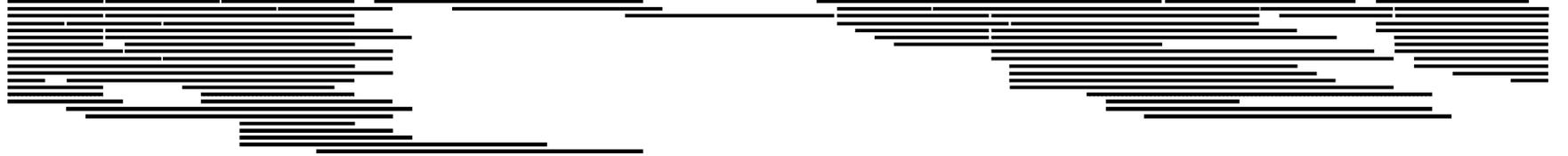
Масс-спектрометрическая идентификация белков-кандидатов, экспрессированных в системе клеток млекопитающих *Expri GpTi*



LI AVL I L R Q T N N Y N S D D F Q F V W N I Y A N N D V V V P T G G C D V S A R D V T V T L P D Y P G S V P I P L T V Y C A K S Q N L G Y Y L S G T T A D A
165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240



G N S I F T N T A S F S P A Q G V G V Q L T R N G T I I P A N N T V S L G A V G T S A V S L G L T A N Y A R T G G Q V T A G N V Q S I I G V T F V Y Q D N K Q A
245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320



D V T I T V N G K V V A K G S G H H H H H H
325 330 335 340



11/47

Всего 273 пептида, покрытие 95,6%, избыточность 11,18

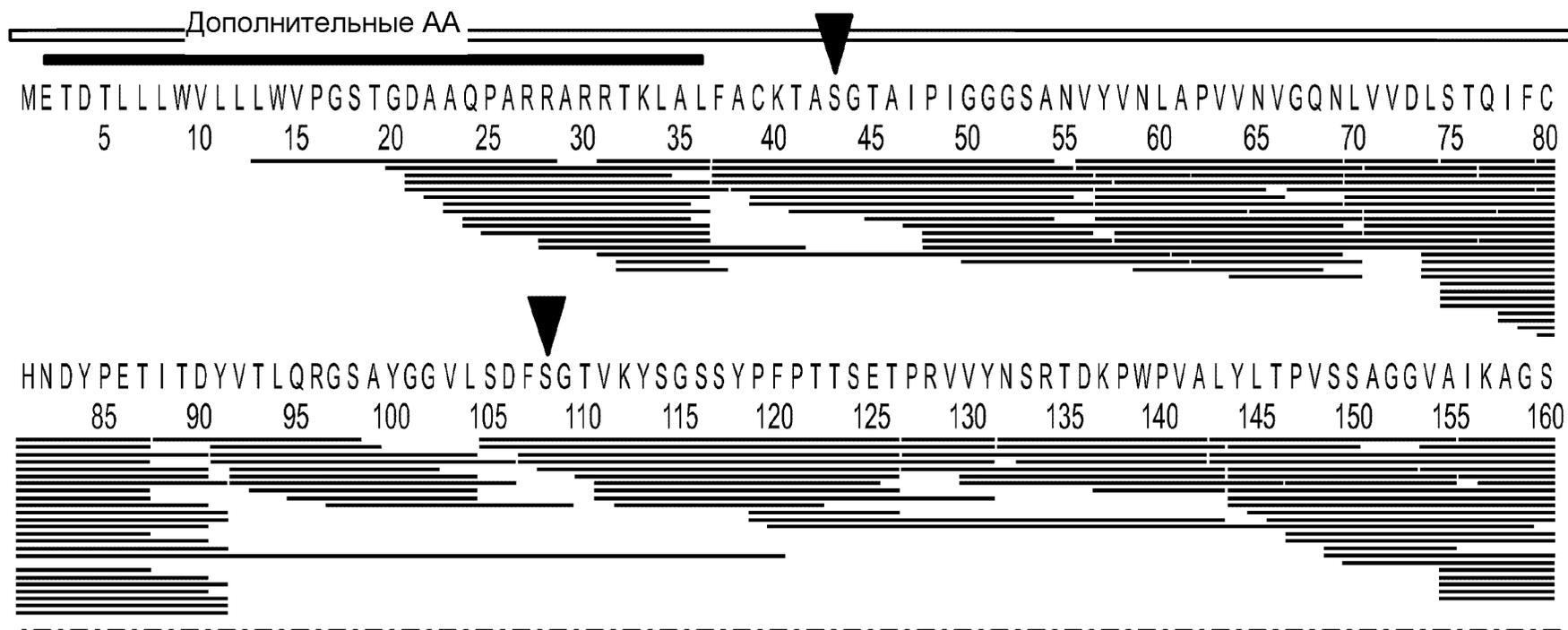
ФИГ. 6 (продолжение)

ФИГ. 6 (продолжение)

FimH_DNKQ_DG degly His

▼ Возможные мутированные сайты N-гликозилирования

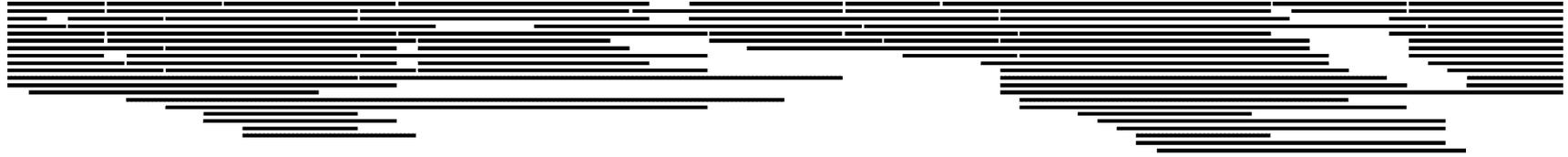
Масс-спектрометрическая идентификация белков-кандидатов, экспрессированных в системе млекопитающих Expi GnTi



LI AVL I L R Q T N N Y N S D D F Q F V W N I Y A N N D V V V P T G G C D V S A R D V T V T L P D Y P G S V P I P L T V Y C A K S Q N L G Y Y L S G T T A D A
165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240



G N S I F T N T A S F S P A Q G V G V Q L T R D G T I I P A D N T V S L G A V G T S A V S L G L T A N Y A R T G G Q V T A G N V Q S I I G V T F V Y Q D N K Q A
245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320



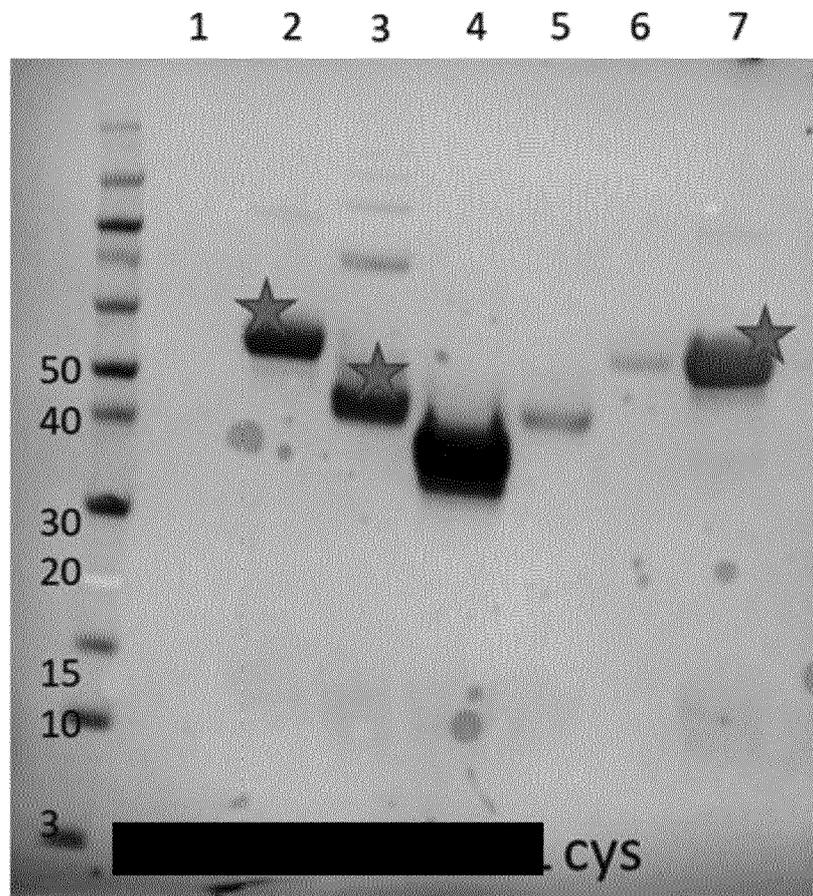
D V T I T V N G K V V A K G S G H H H H H H
325 330 335 340



Всего 312 пептидов, покрытие 96,5%, избыточность 13,80

ФИГ. 6 (продолжение)

ФИГ. 7



1-Нетрансфицированные клетки GNTI

2-Содержащий короткий лидер FIMH_DG_PGDGN_Ferritin (j96) (1042SI)

3-Содержащий короткий лидер FIMH_DG_PGDGN_IMX313(j96) (1043SI)

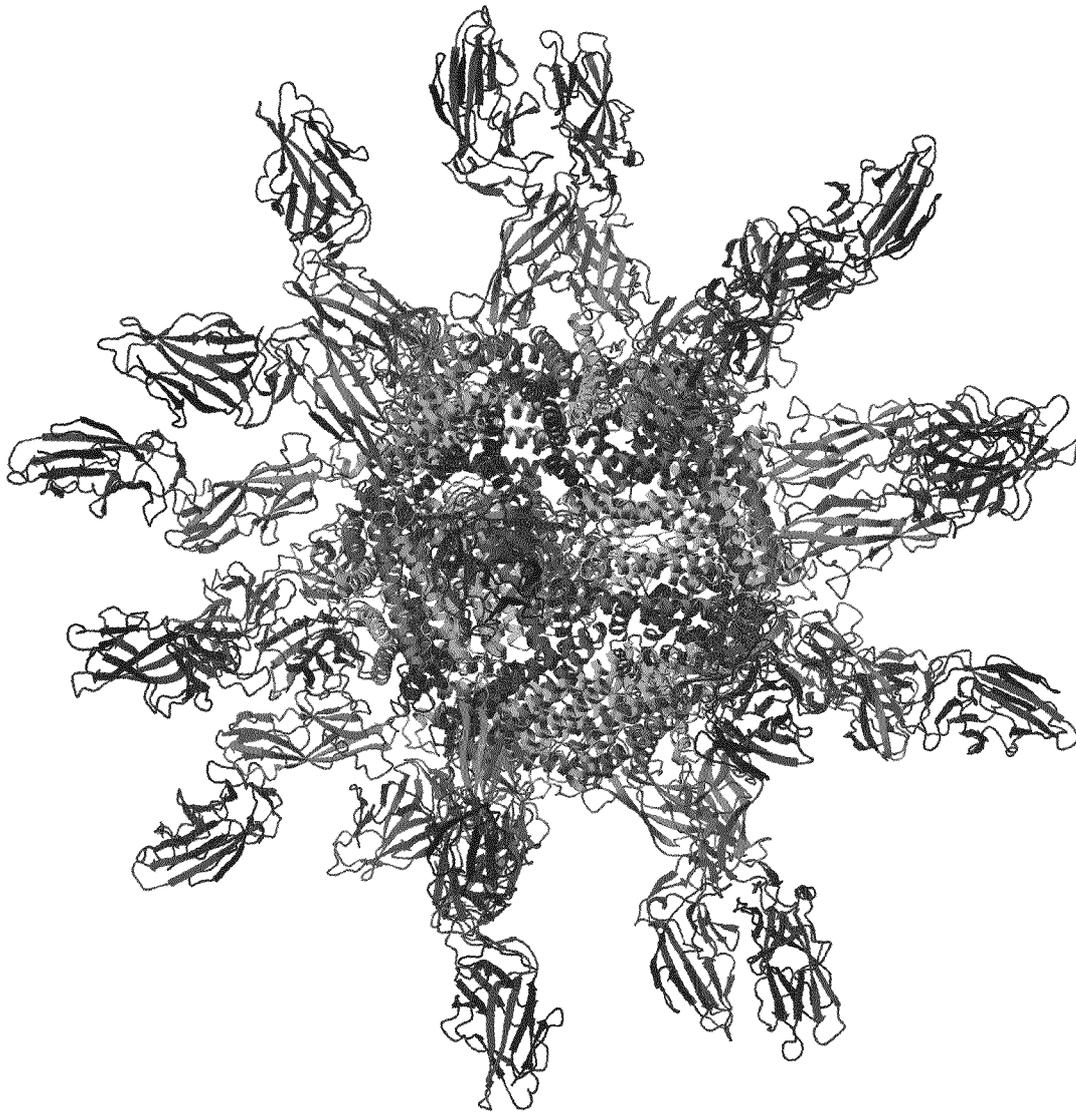
4-Содержащий короткий лидер FIMH_DG_PGDGN (j96) (988SI)

5-Содержащий дополнительные АА FIMH_DG_PGDGN_IMX313 (j96) (993SI)

6-Содержащий дополнительные АА FIMH_DG_PGDGN_Ferritin (536) (995SI)

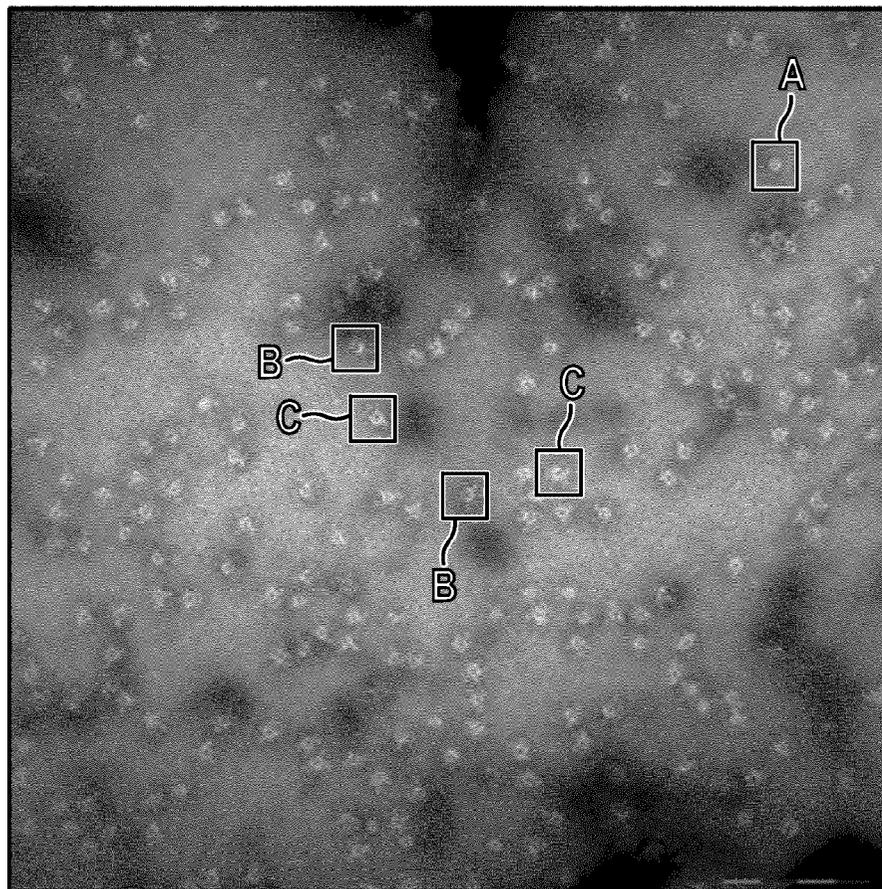
7-Содержащий короткий лидер FIMH_DG_PGDGN_Ferritin (536) (1142SI)

ФИГ. 8А



995SI

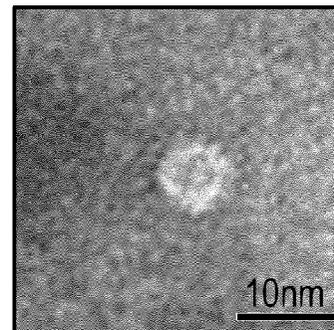
ФИГ. 8В



«Голые» частицы ферритина

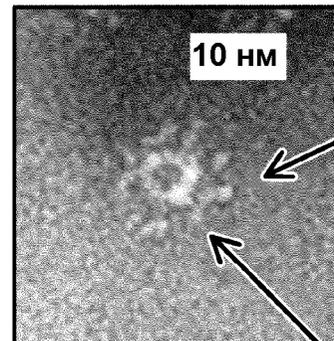
- имеют диаметр 13 нм
- Шиповидный ферритин имеет диаметр 30-32 нм

A



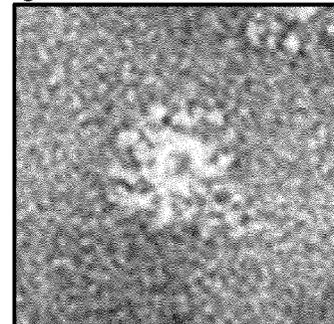
«Голый» ферритин

B



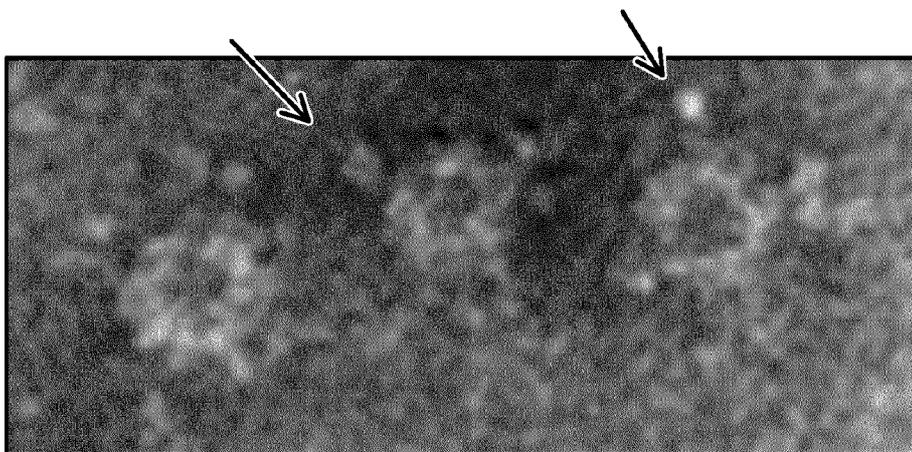
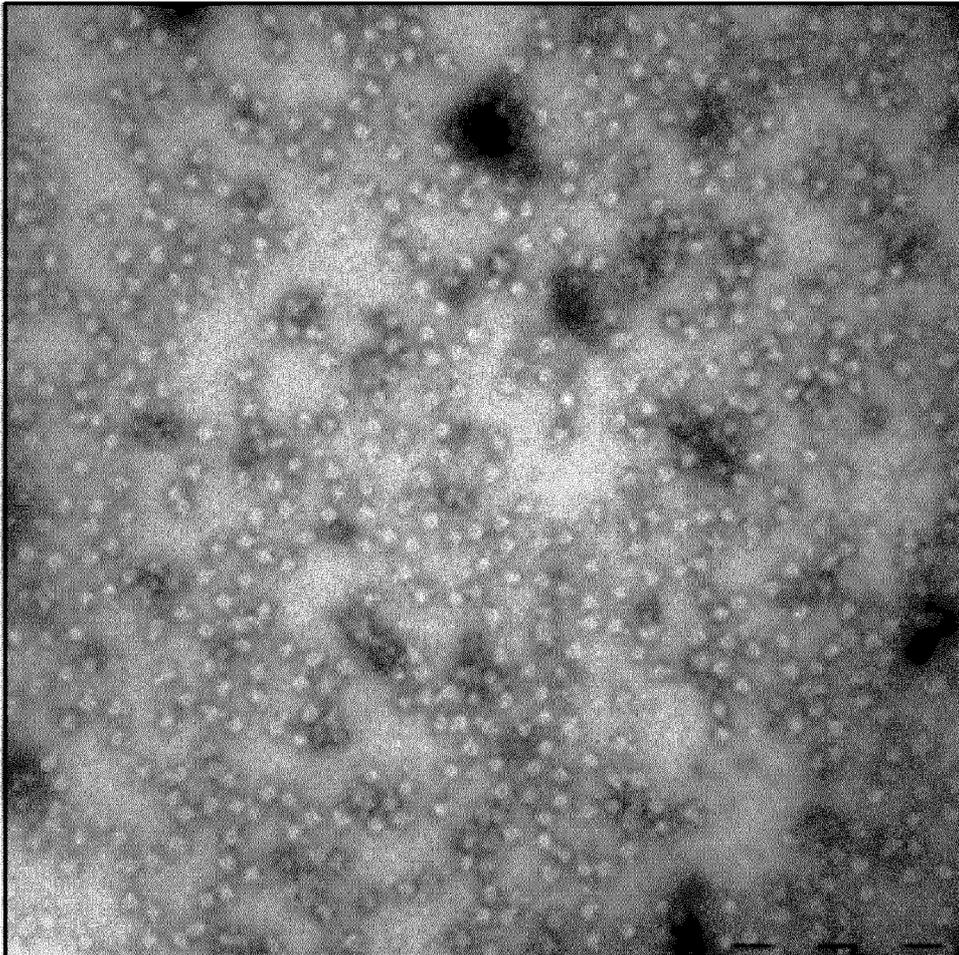
Октаэдрический ферритин с 8 шипами

C



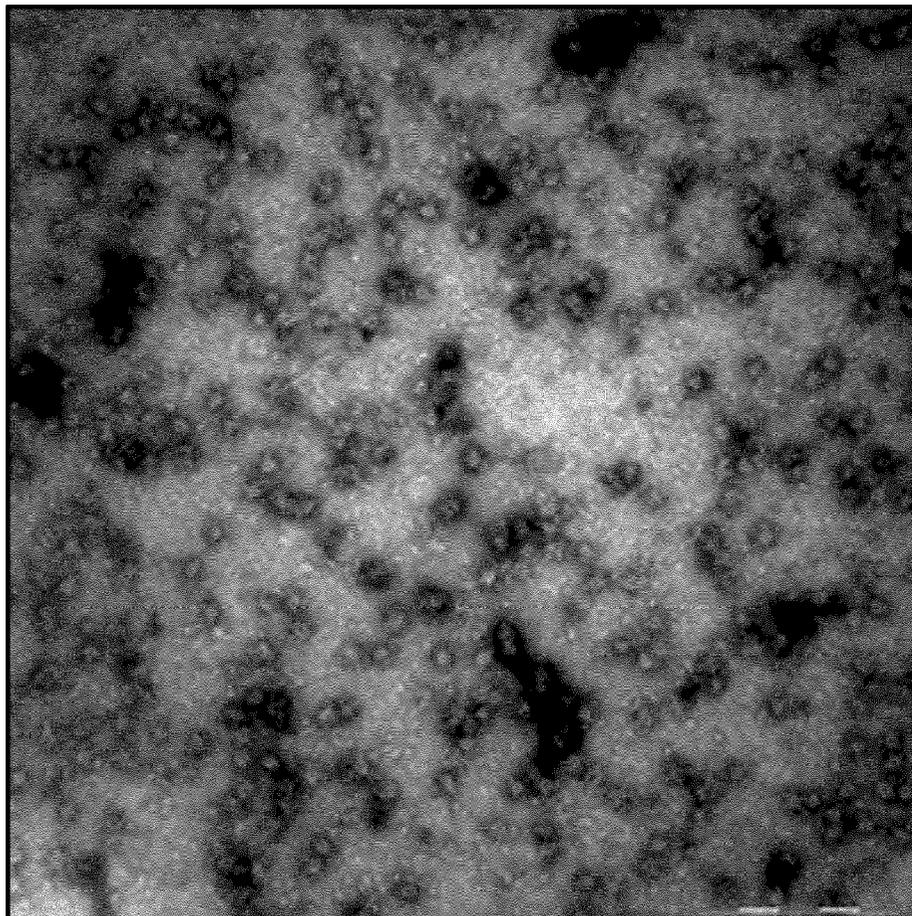
Октаэдрический ферритин с множеством шипов

ФИГ. 8С
1142SI



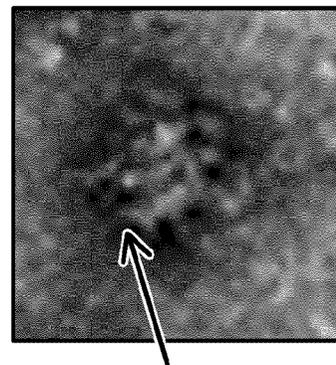
- Отсутствуют «голые» частицы ферритина
- Присутствуют только правильно свернутые шиповидные частицы ферритина
- Диаметр 30-32 нм

1042SI

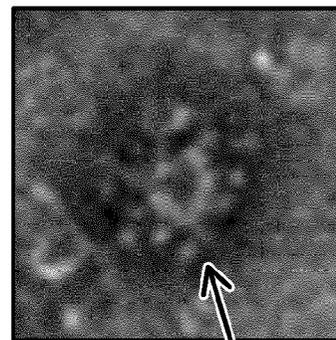


- Присутствуют индивидуальные или агрегированные белки
- Отсутствуют «голые» частицы ферритина
- Присутствуют NP с меньшим количеством шипов

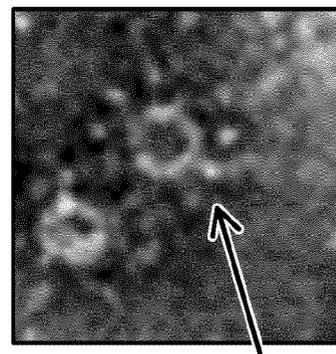
ФИГ. 8D



Присутствуют неправильно свернутые частицы

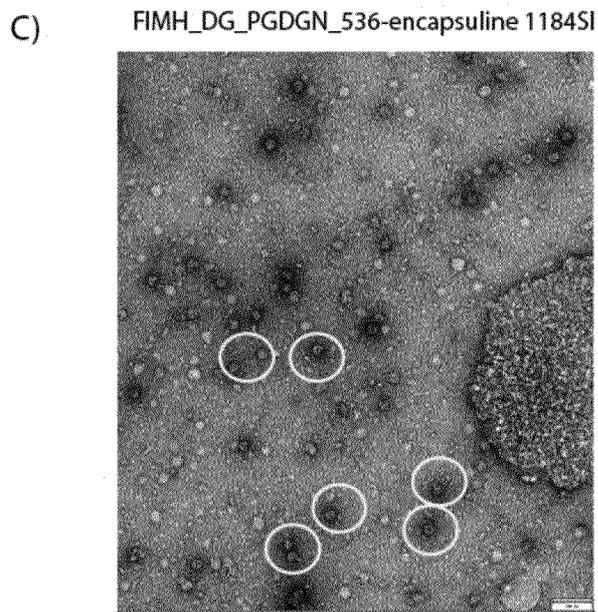
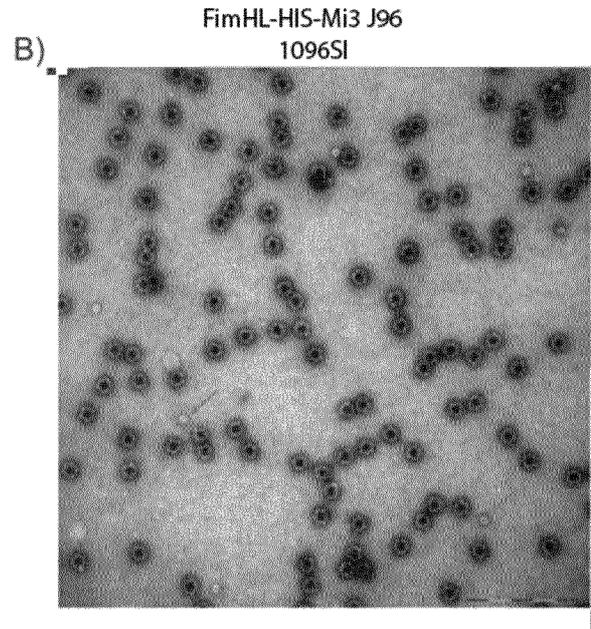
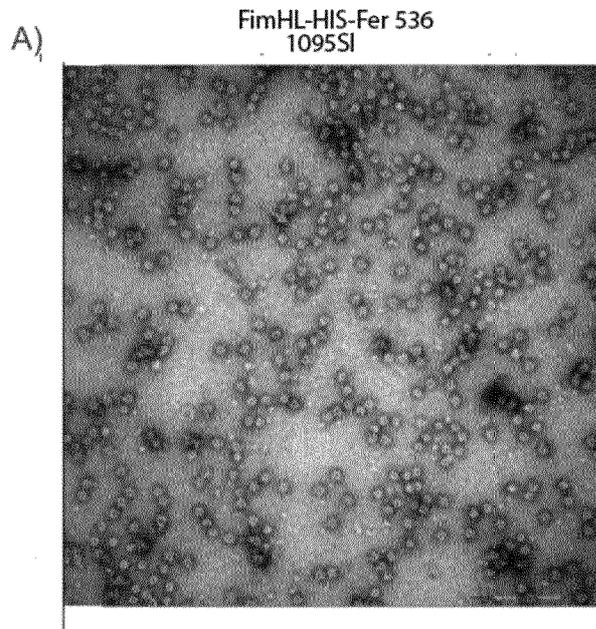


Присутствуют правильно свернутые NP, демонстрирующие множество шипов

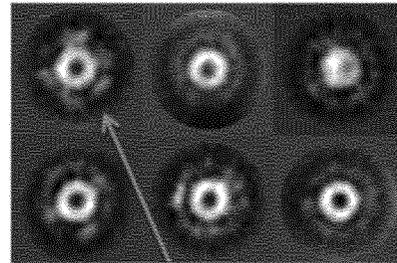


Присутствуют правильно свернутые NP, демонстрирующие восемь шипов

ФИГ. 9



А) Усредненные результаты 2D-классификации

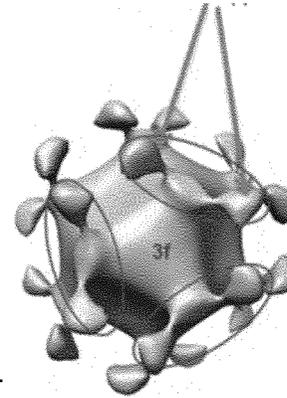


Наиболее преобладающий усредненный результат 2D-классификации (использованный для создания 3D-карты)

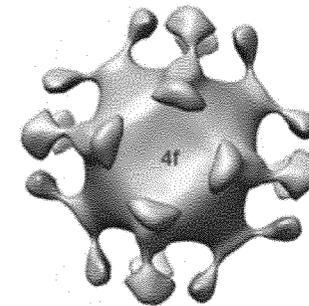
Конструкция 995SI

В)

якореподобный выступающий элемент



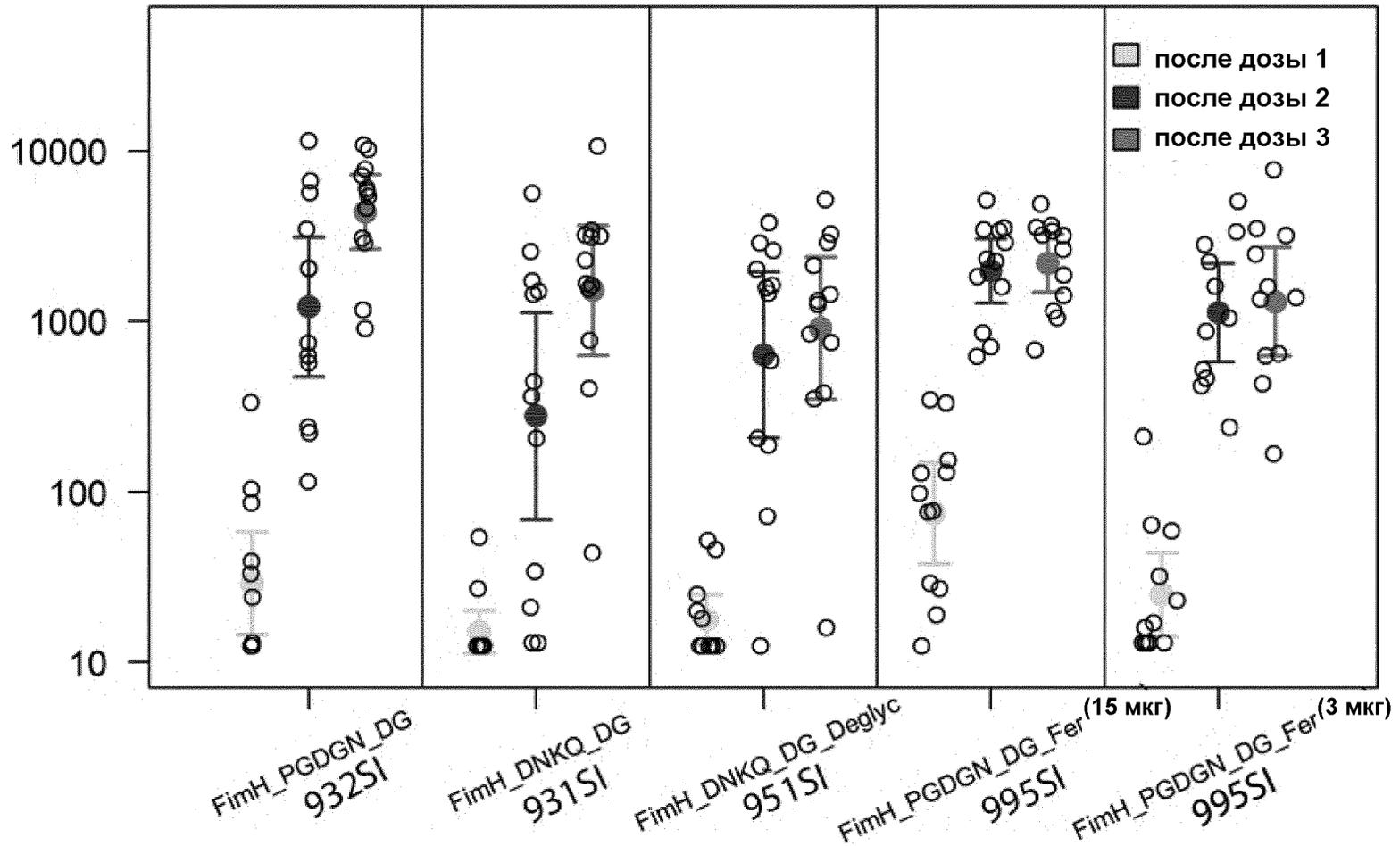
Вид сверху в направлении оси 3f



Вид сверху в направлении оси 4f

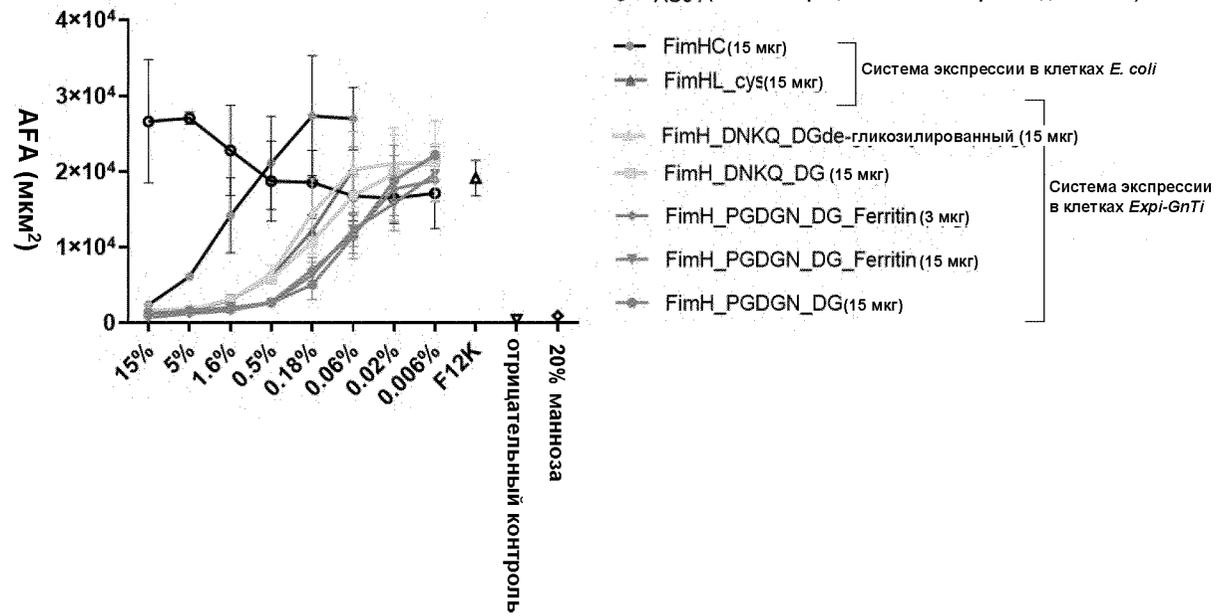
ФИГ. 10

GMT с 95% CI

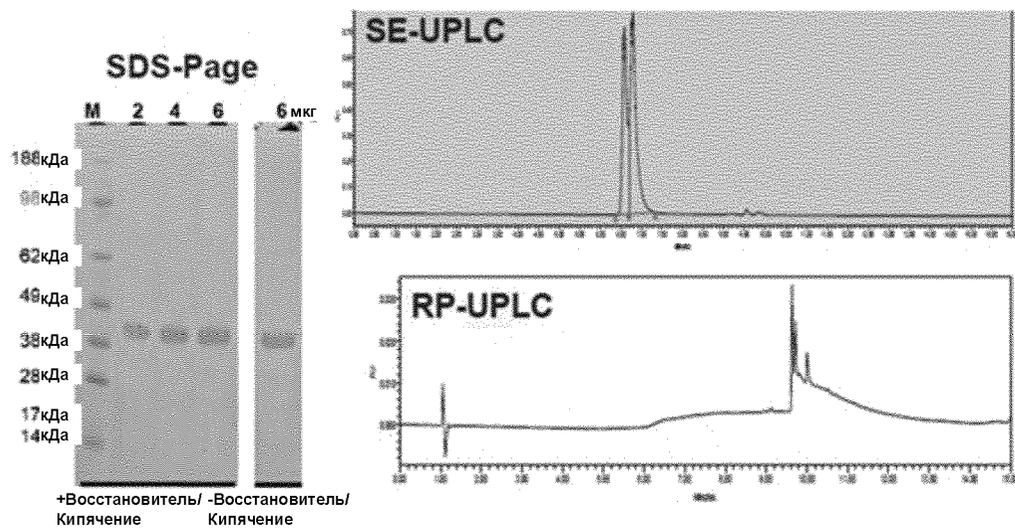


ФИГ. 11

Анализ ингибирования бактерий (BAI)



ФИГ. 12



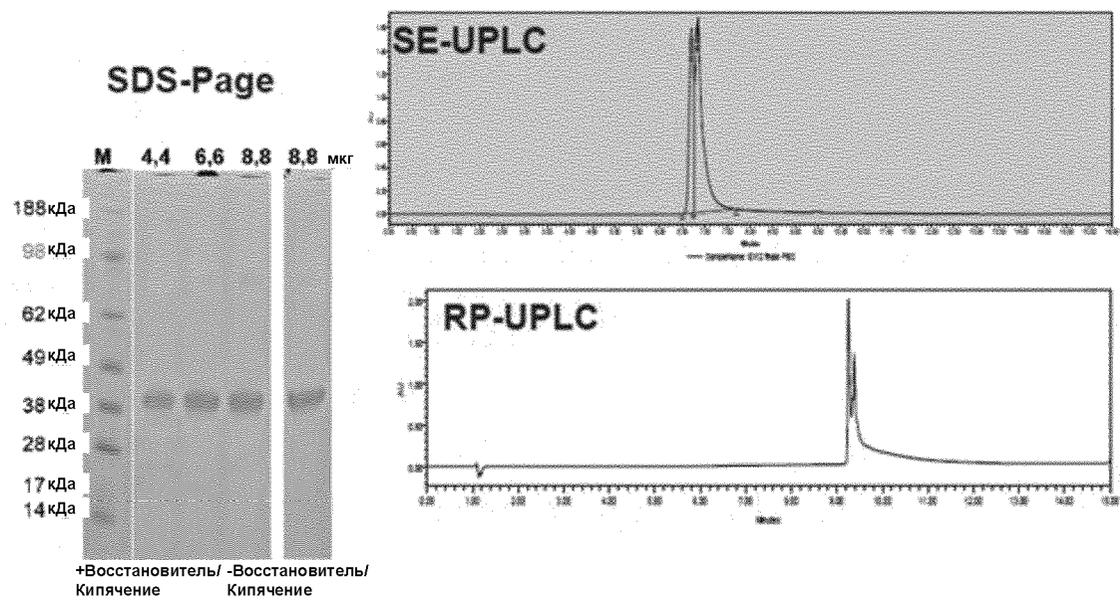
- 1 • Клеточная среда
- 2 • Аффинная хроматография
• Градиентное элюирование
- 3 • Препаративная SEC

В анализах SE и RP-UPLC присутствуют два основных пика: они могут являться следствием присутствия в растворе различных гликозилированных форм, неразличимых в анализе SDS-Page

932SSI

FimH_PGDN_DG

ФИГ. 13



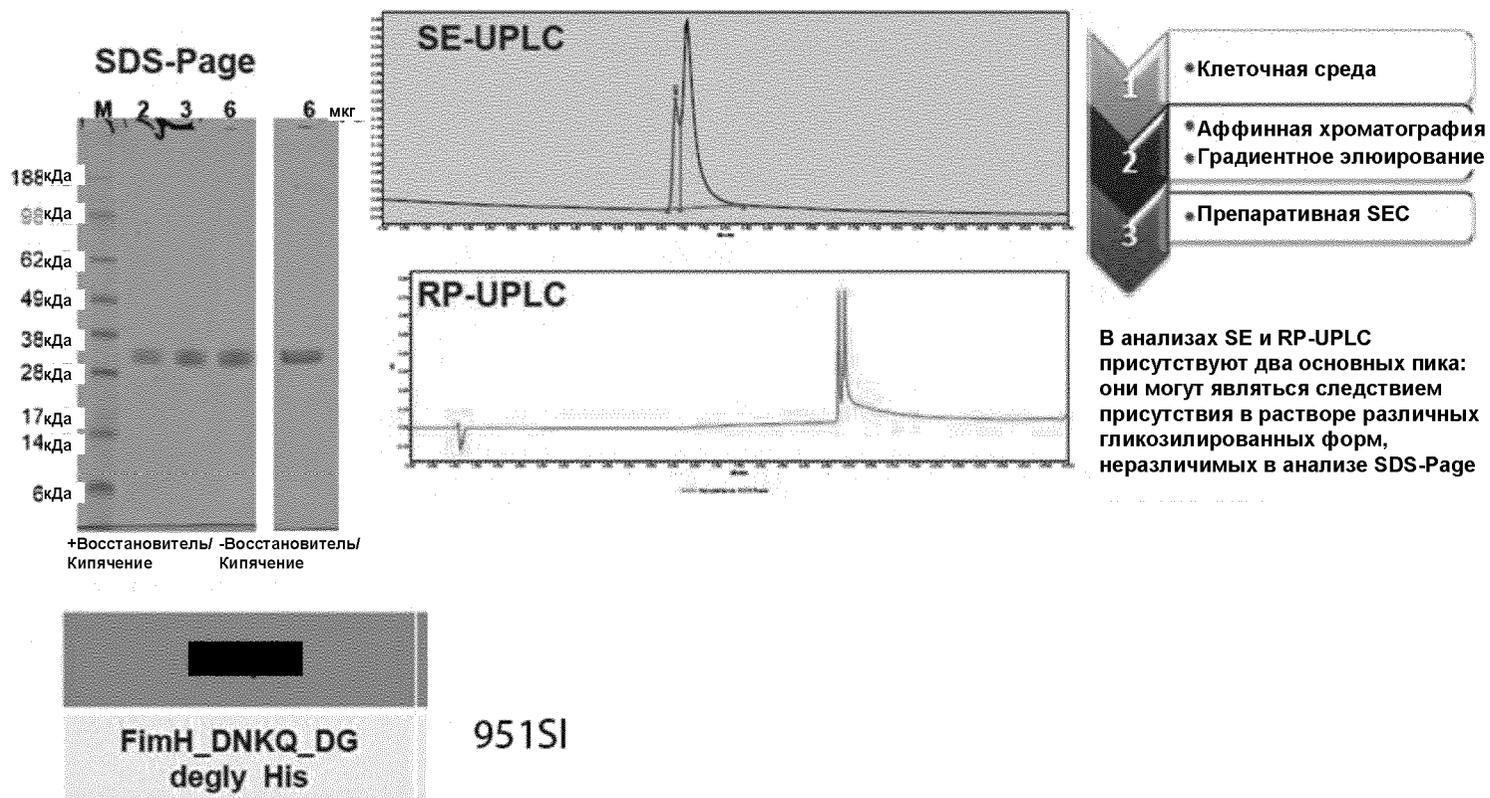
- 1 • Клеточная среда
- 2 • Аффинная хроматография
• Градиентное элюирование
- 3 • Препаративная SEC

В анализах SE и RP-UPLC присутствуют два основных пика: они могут являться следствием присутствия в растворе различных гликозилированных форм, неразличимых в анализе SDS-Page

931SI

FimH_DNKQ_DG His

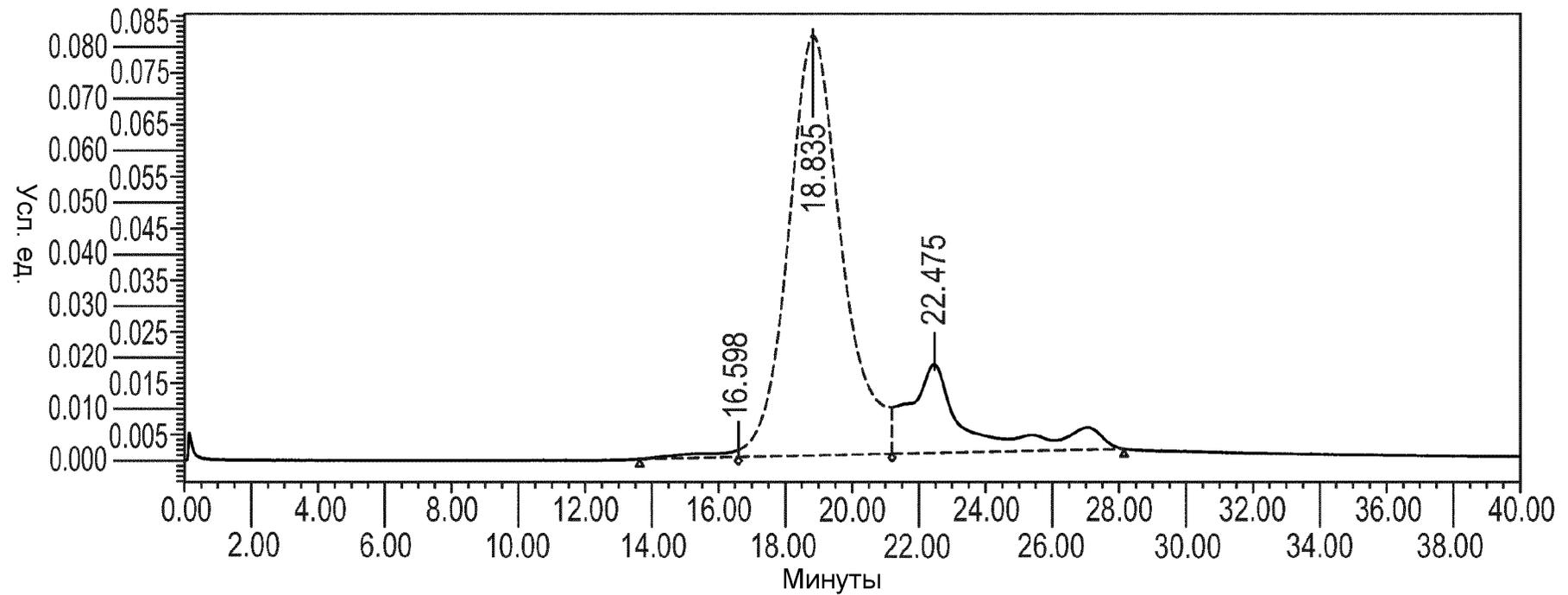
ФИГ. 14



ФИГ. 15

ФИГ. 16 (продолжение)

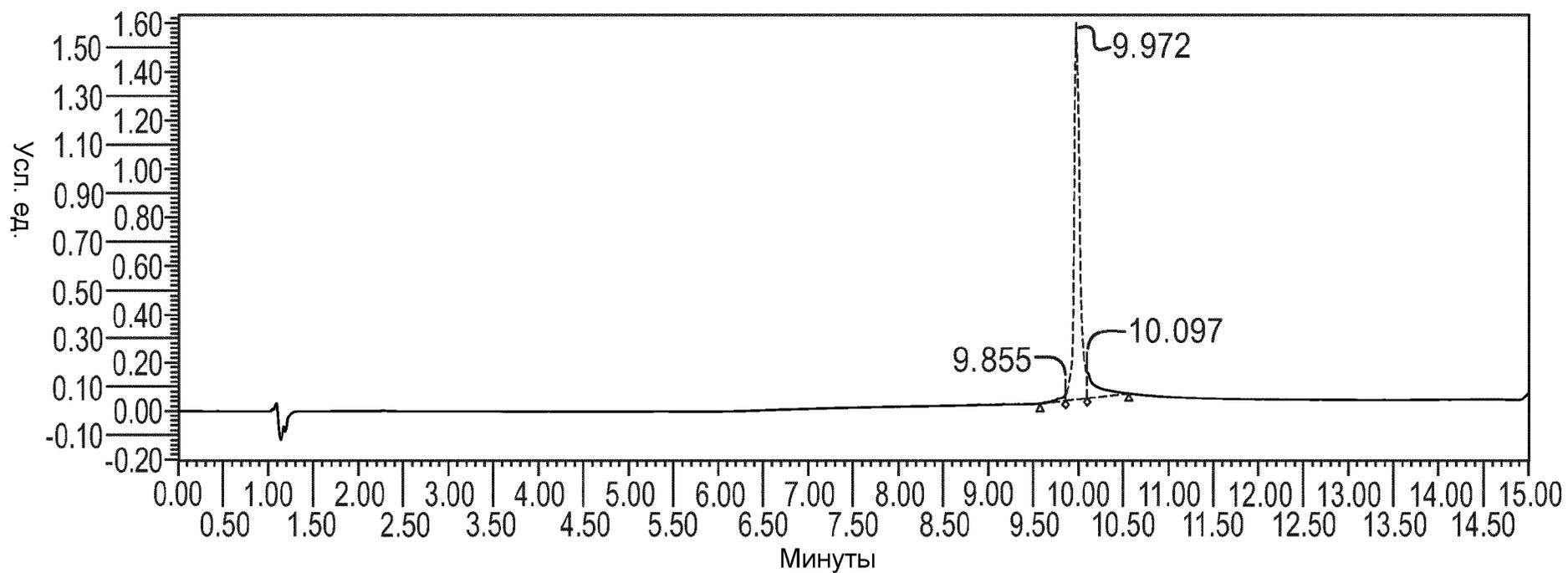
SE-HPLC



— Название образца: EX16 finale

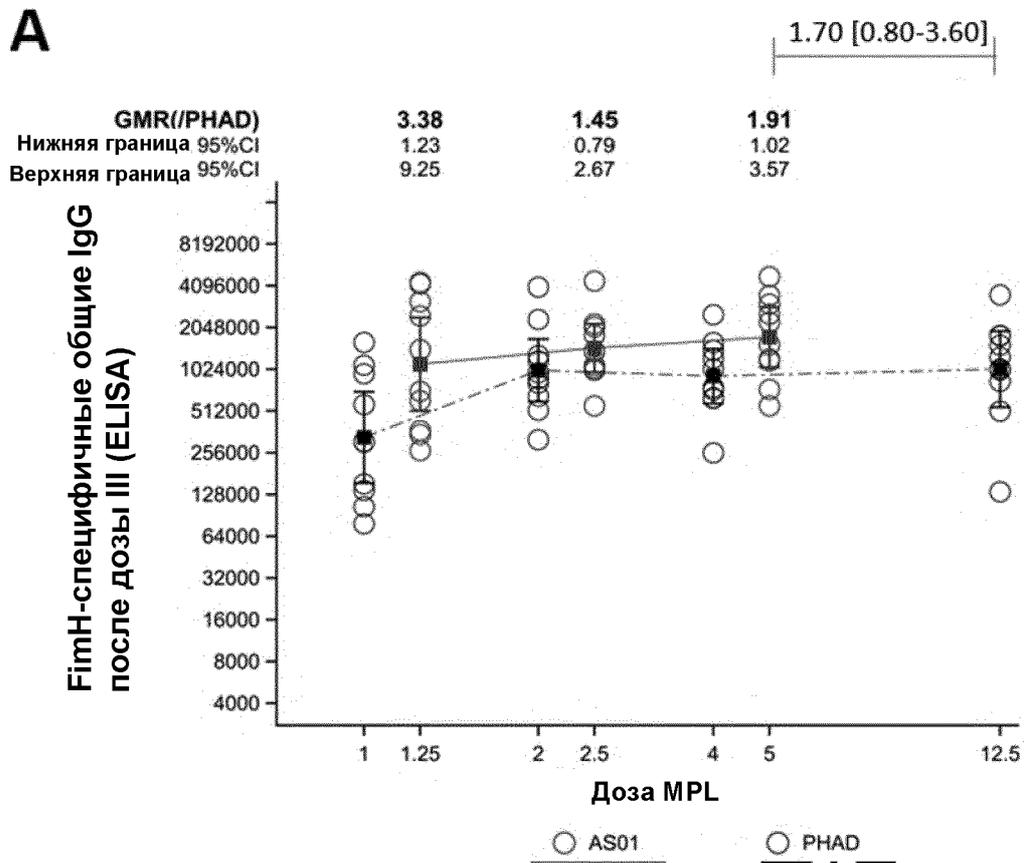
ФИГ. 16 (продолжение)

RP-UPLC

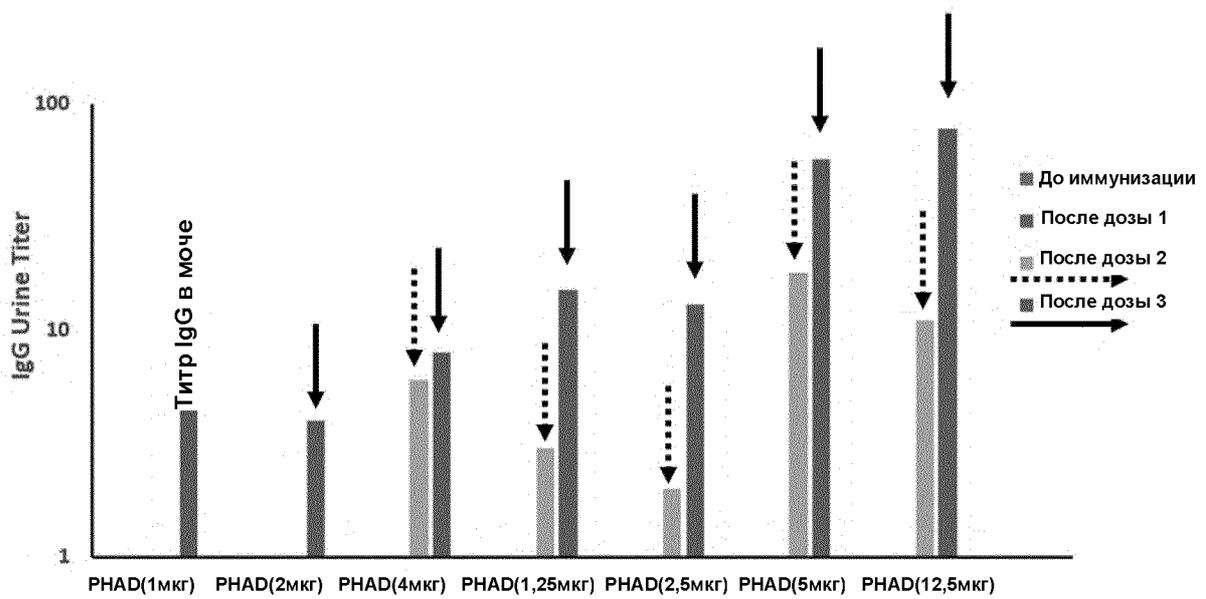


— Название образца: EX16 finale

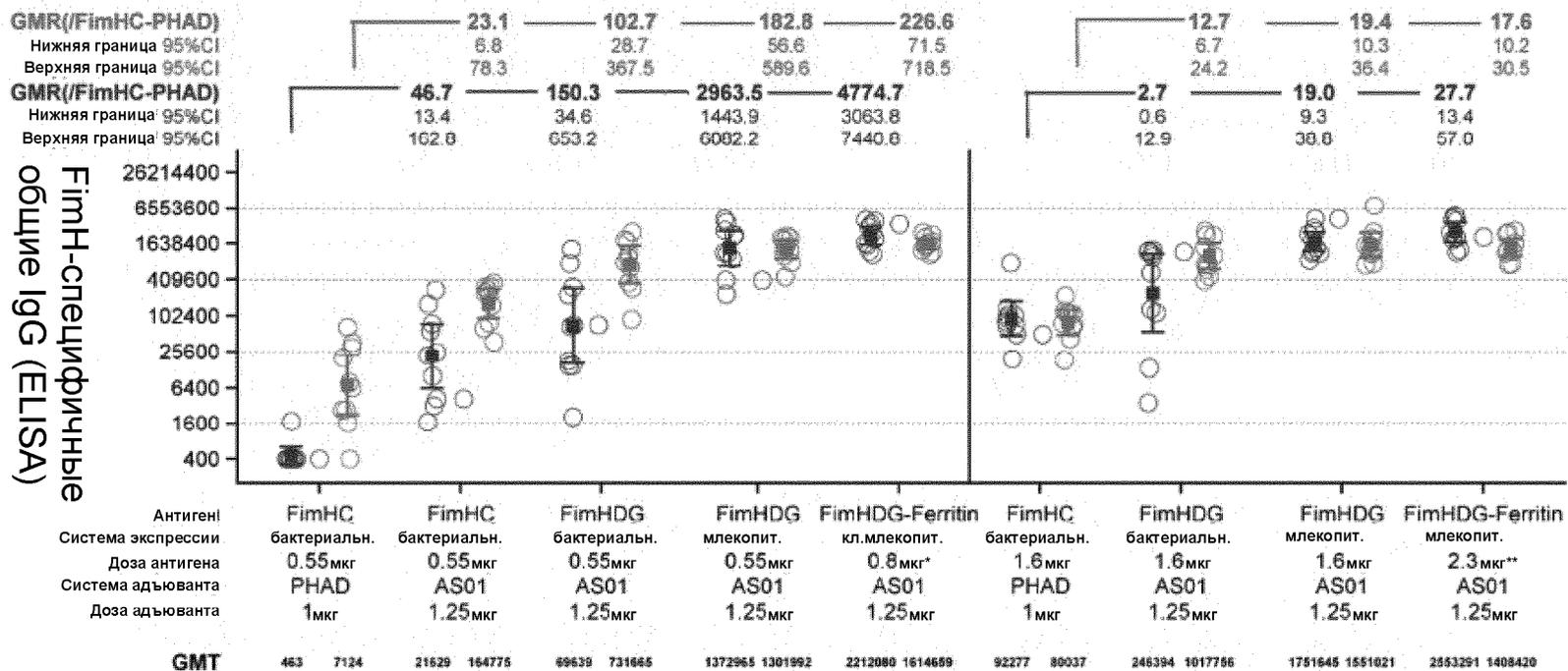
ФИГ. 17



B



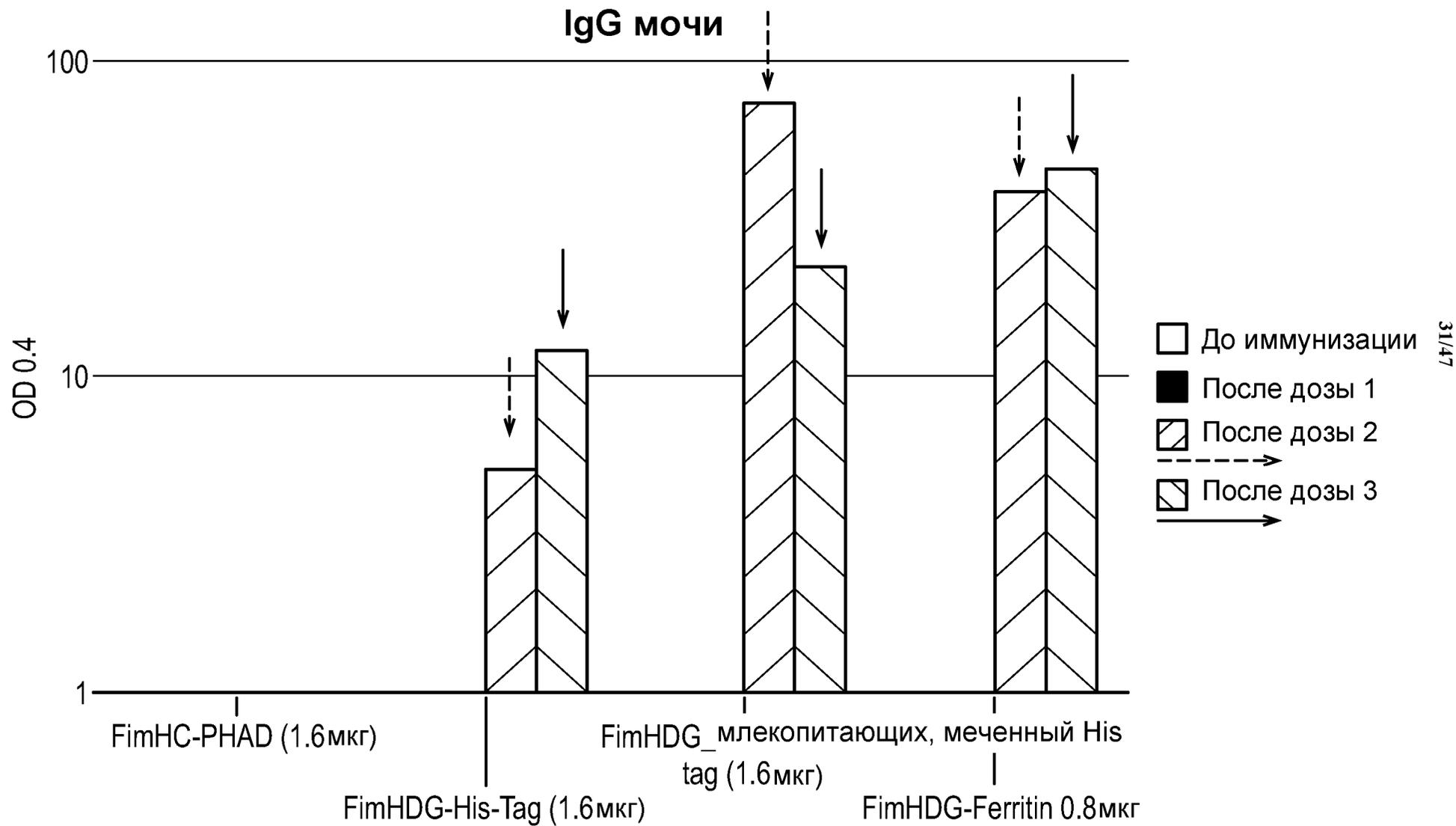
A

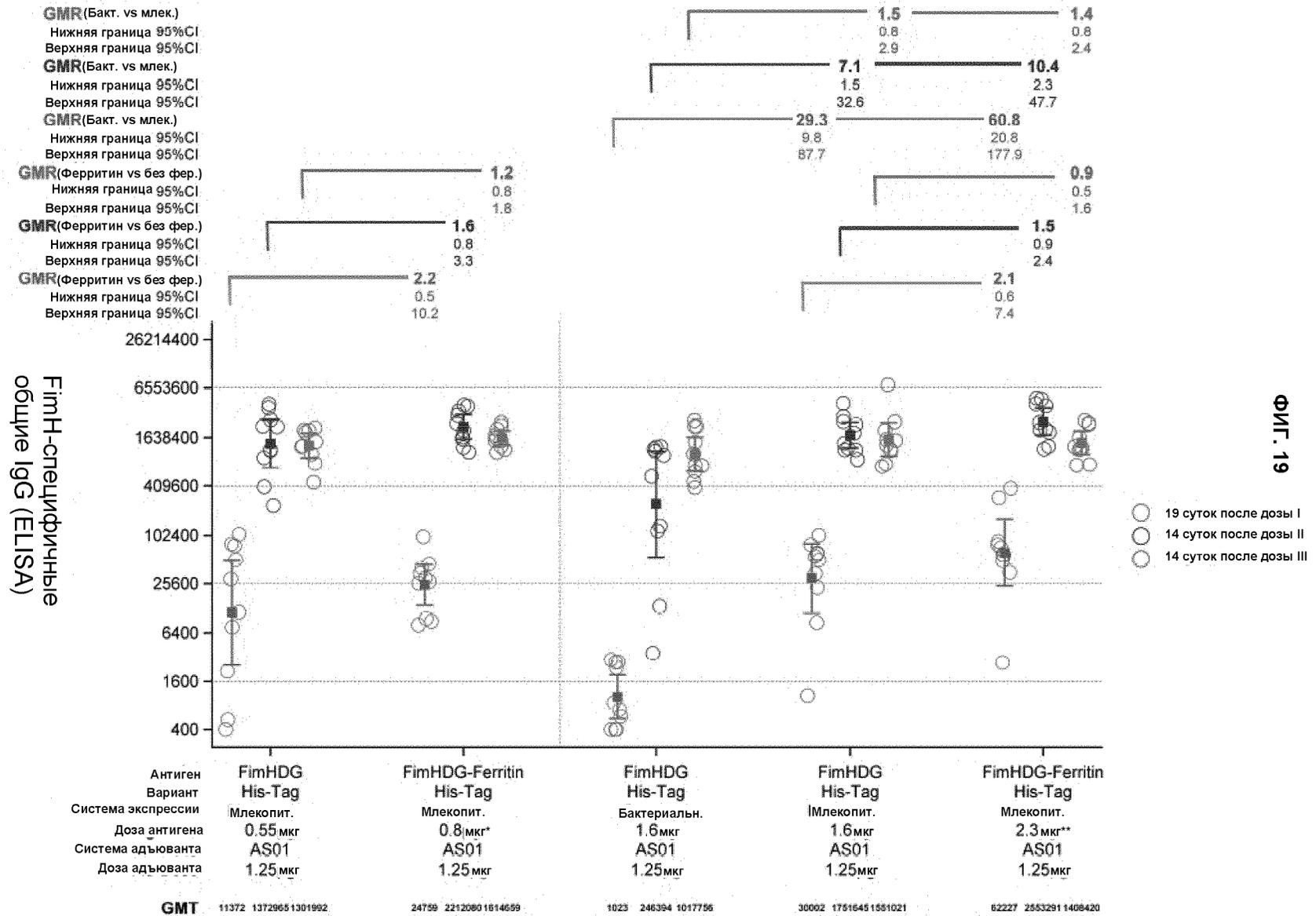


14 суток после дозы II
14 суток после дозы III

ФИГ. 18 А

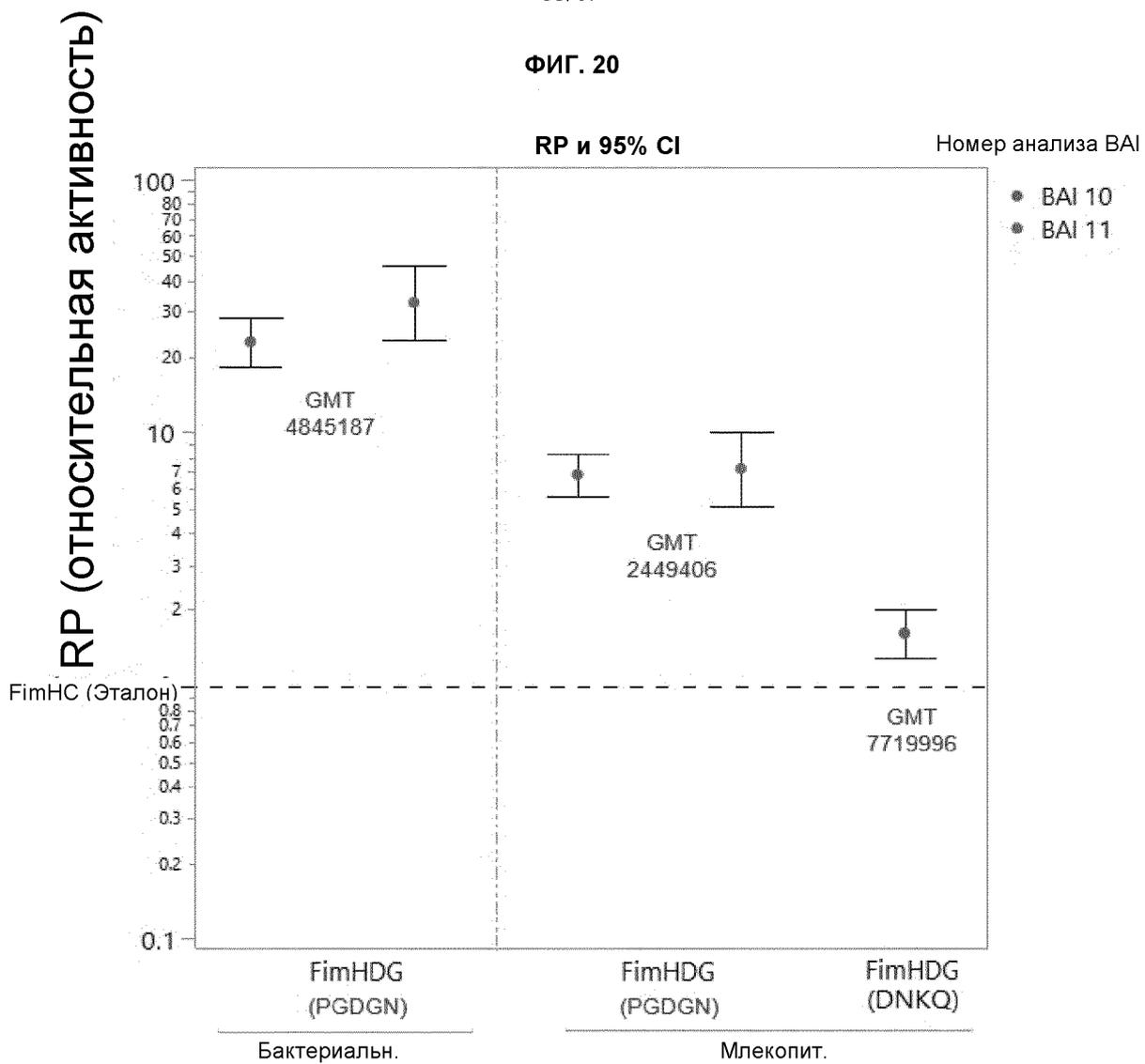
ФИГ. 18В



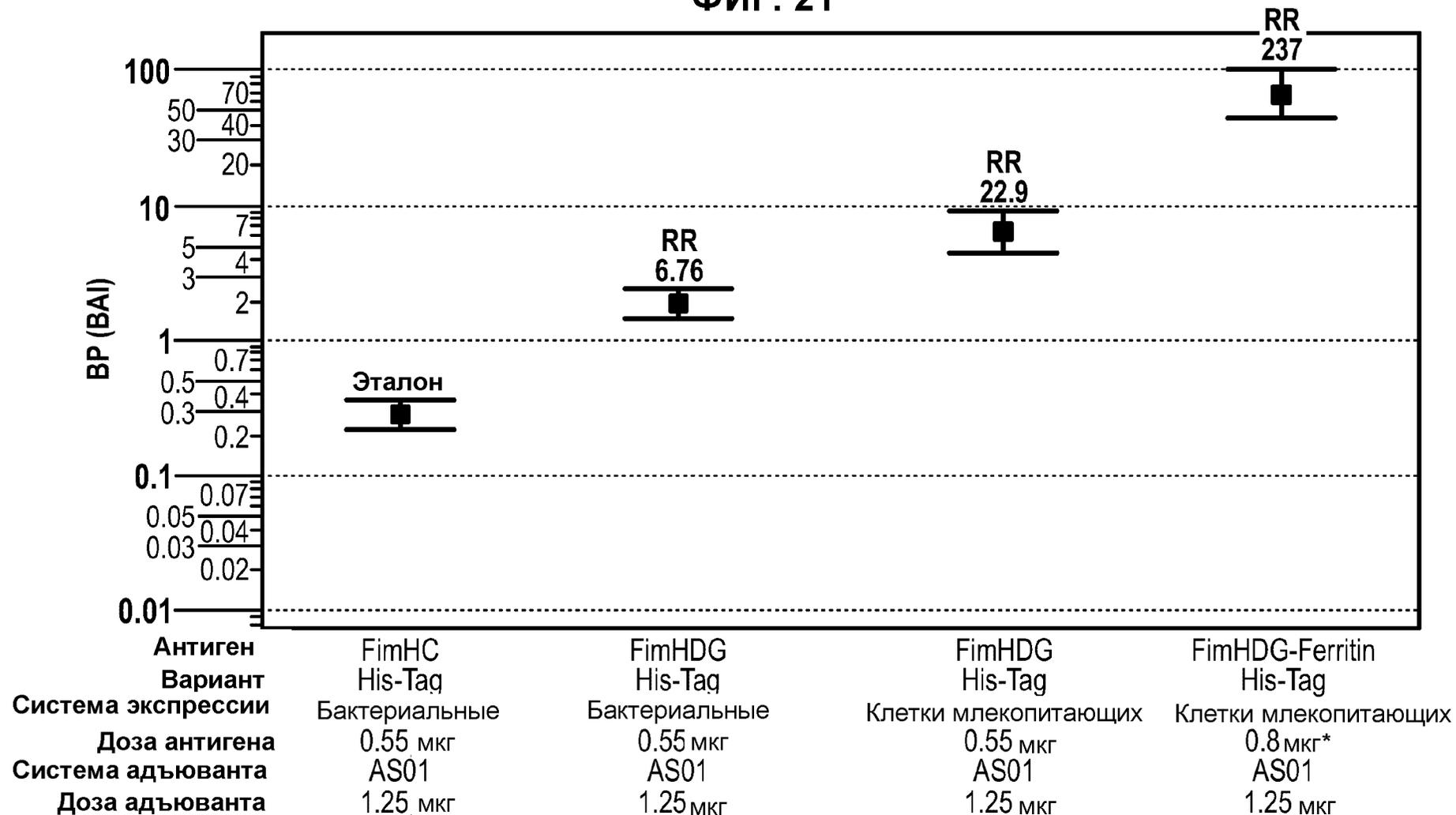


* 0.8µg FimHDG+Ferritin correspond to 0.55µg FimHDG
 ** 2.3µg FimHDG+Ferritin correspond to 1.6µg FimHDG

ФИГ. 20

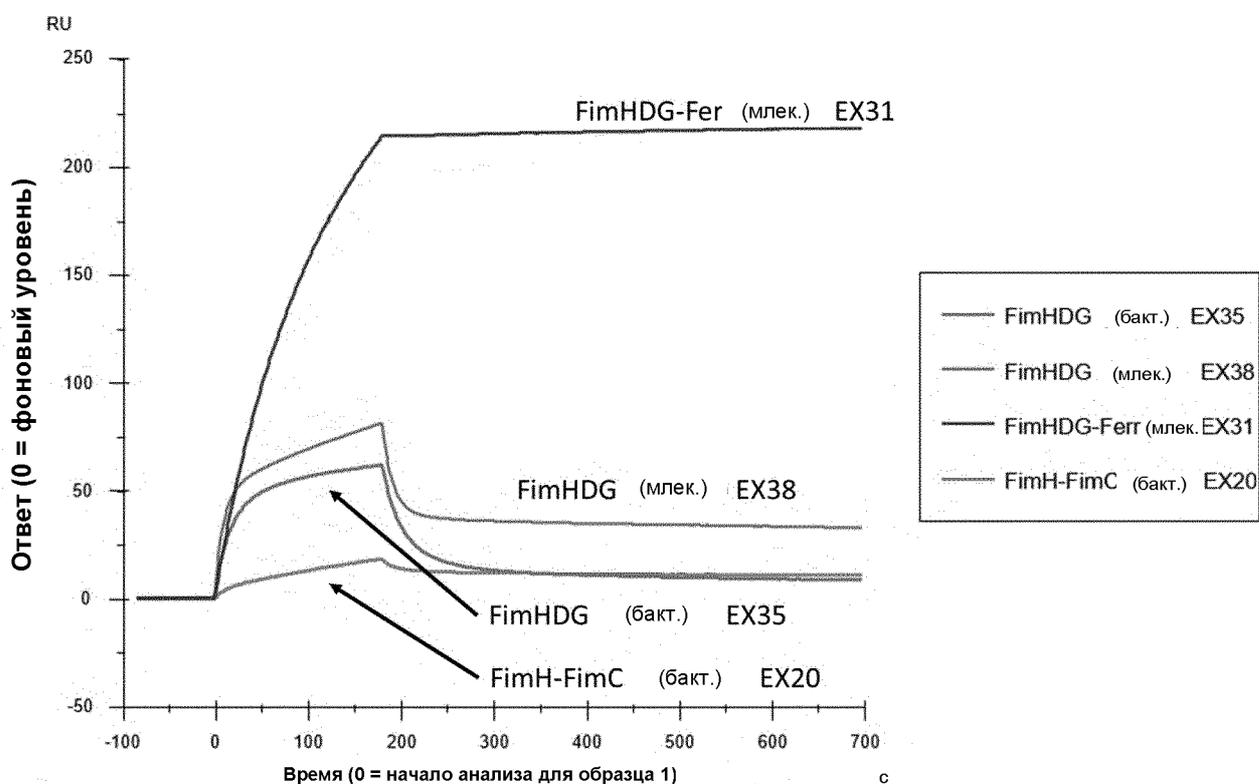


ФИГ. 21



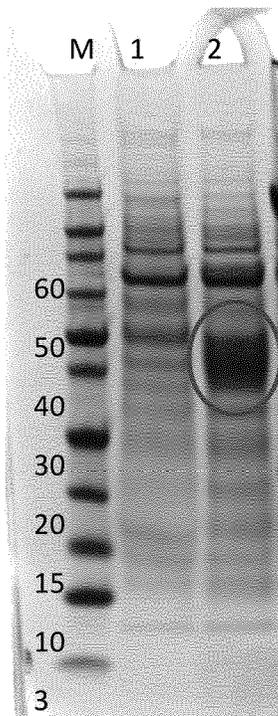
RR = относительный показатель $RP\#/RP\text{-FimHC-PHAD}$

ФИГ. 22



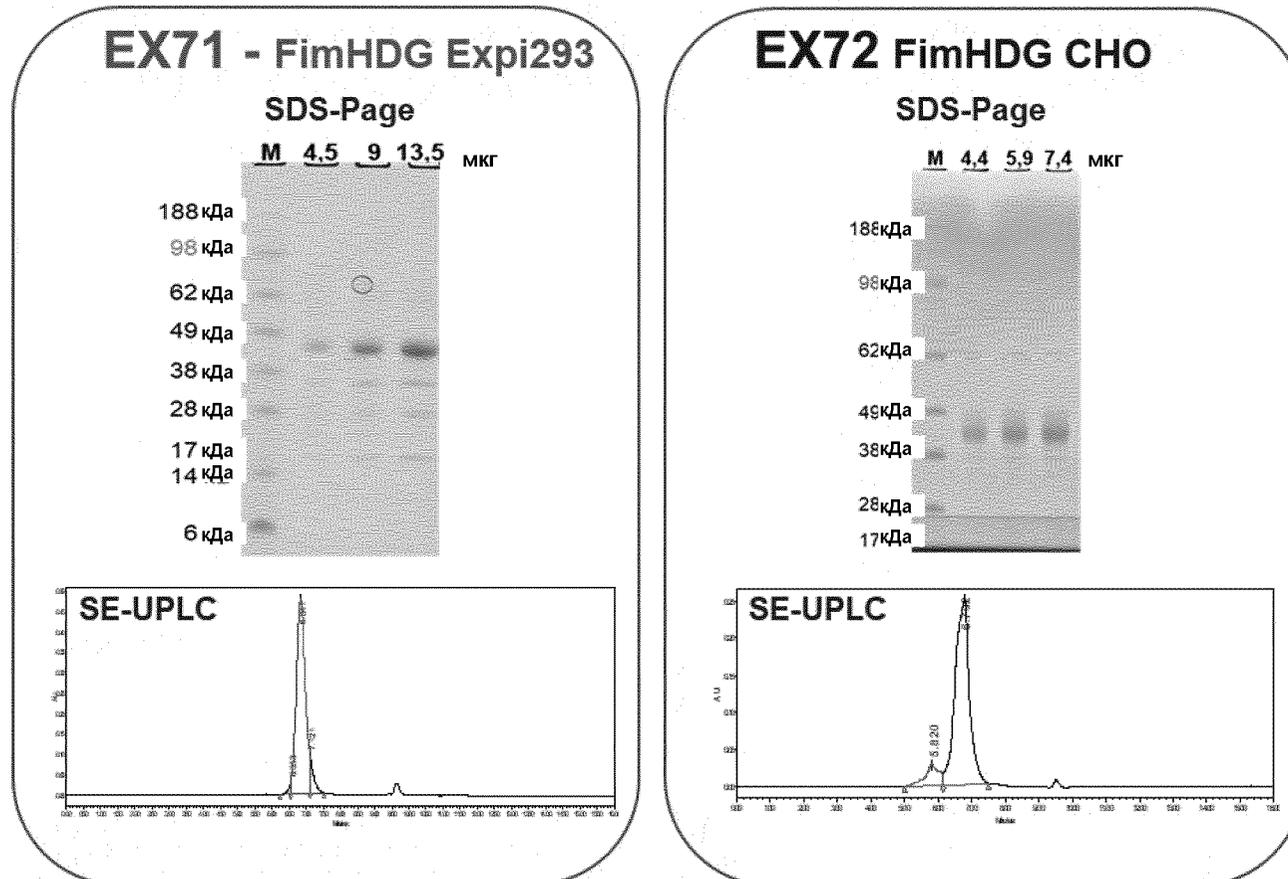
Образец	mAb	Уровень связывания [RU] Эксп 1	Уровень связывания [RU] Эксп 2
<i>FimH-FimC</i> (бакт.) EX20	VK_926	21,4	18,0
<i>FimH-DG</i> (бакт.) EX35	VK_926	63,1	61,8
<i>FimH-DG His</i> (млек.) EX38	VK_926	81,8	80,3
<i>FimHDG-Fer</i> (млек.) EX31	VK_926	200,2	211,0

Фиг. А

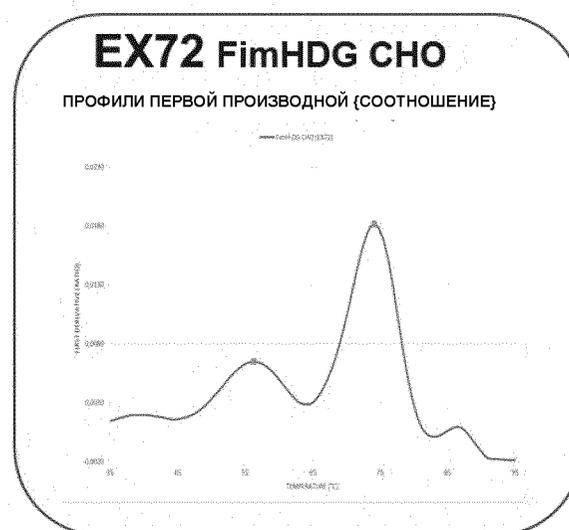
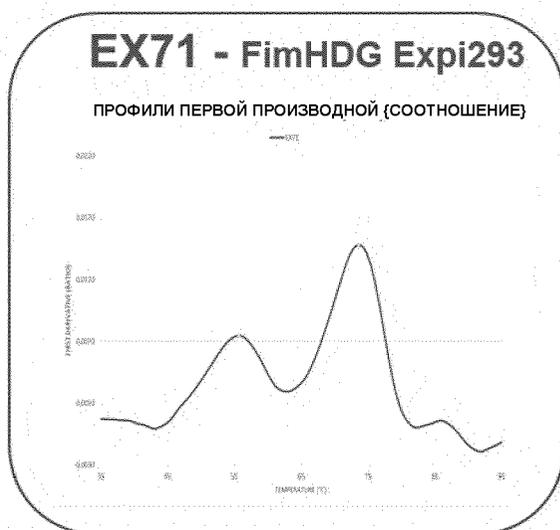
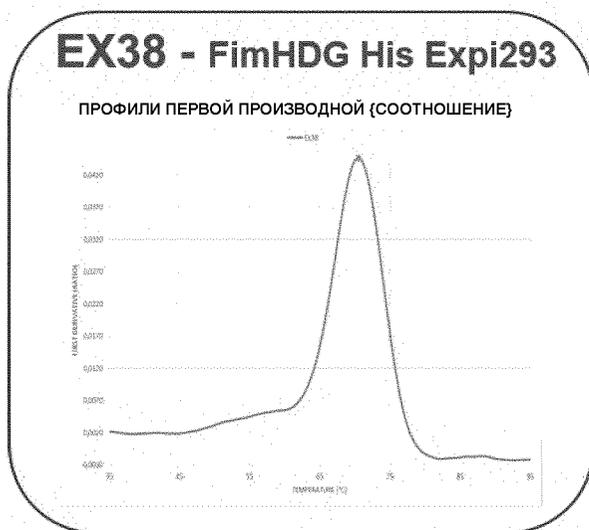


1- Нетрансфицированные клетки Expi293

2- Клетки Expi293, трансфицированные не содержащим меток FimHDG



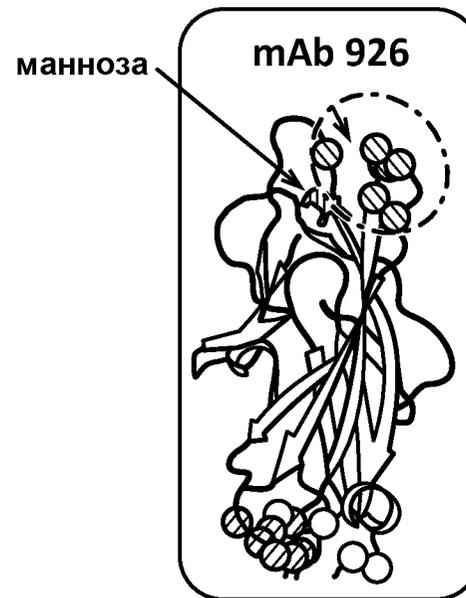
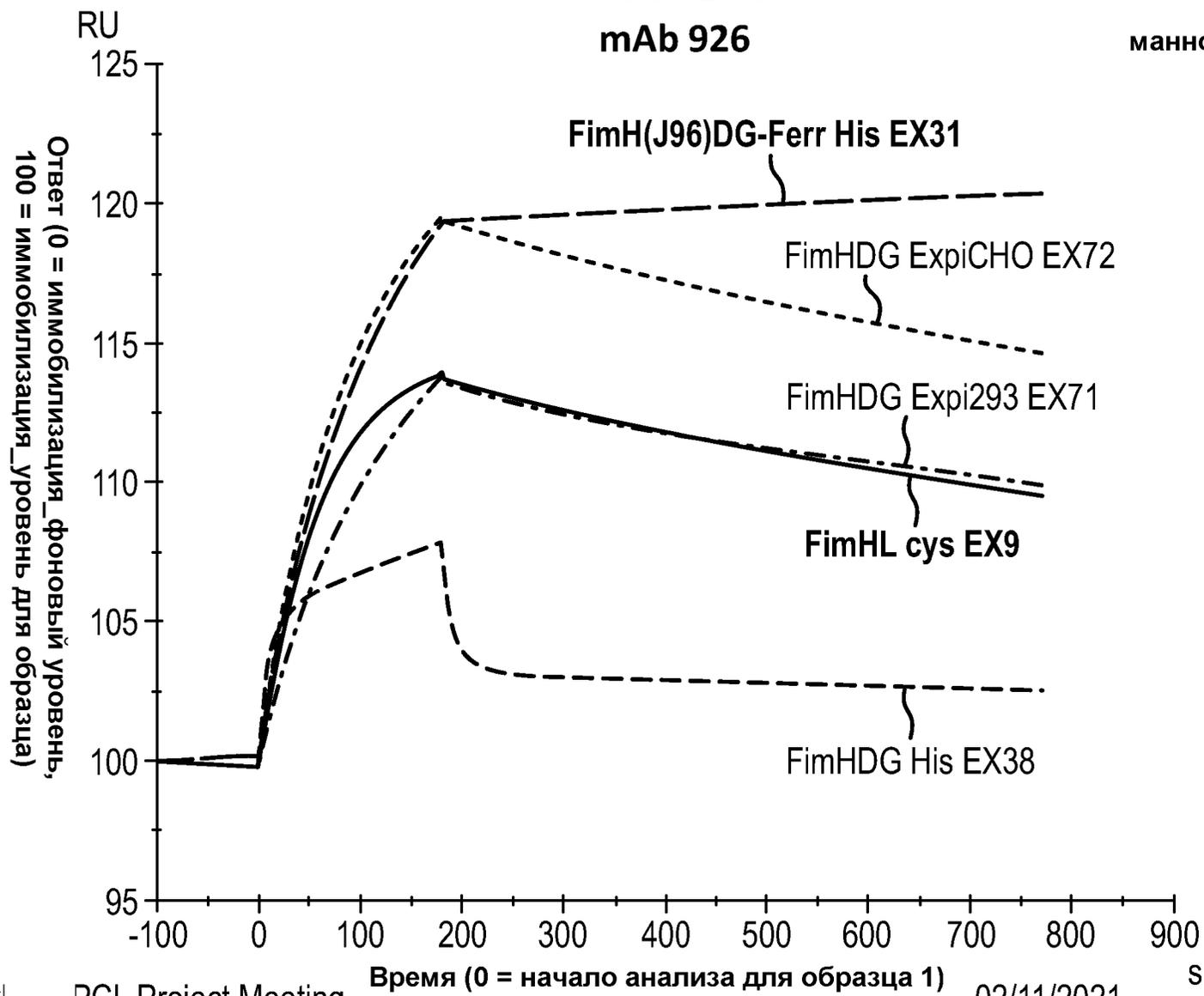
ФИГ. 23А



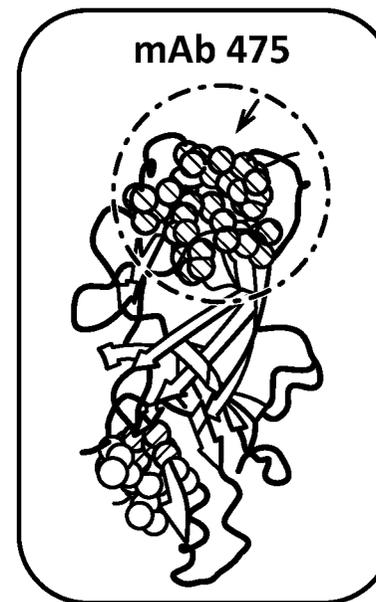
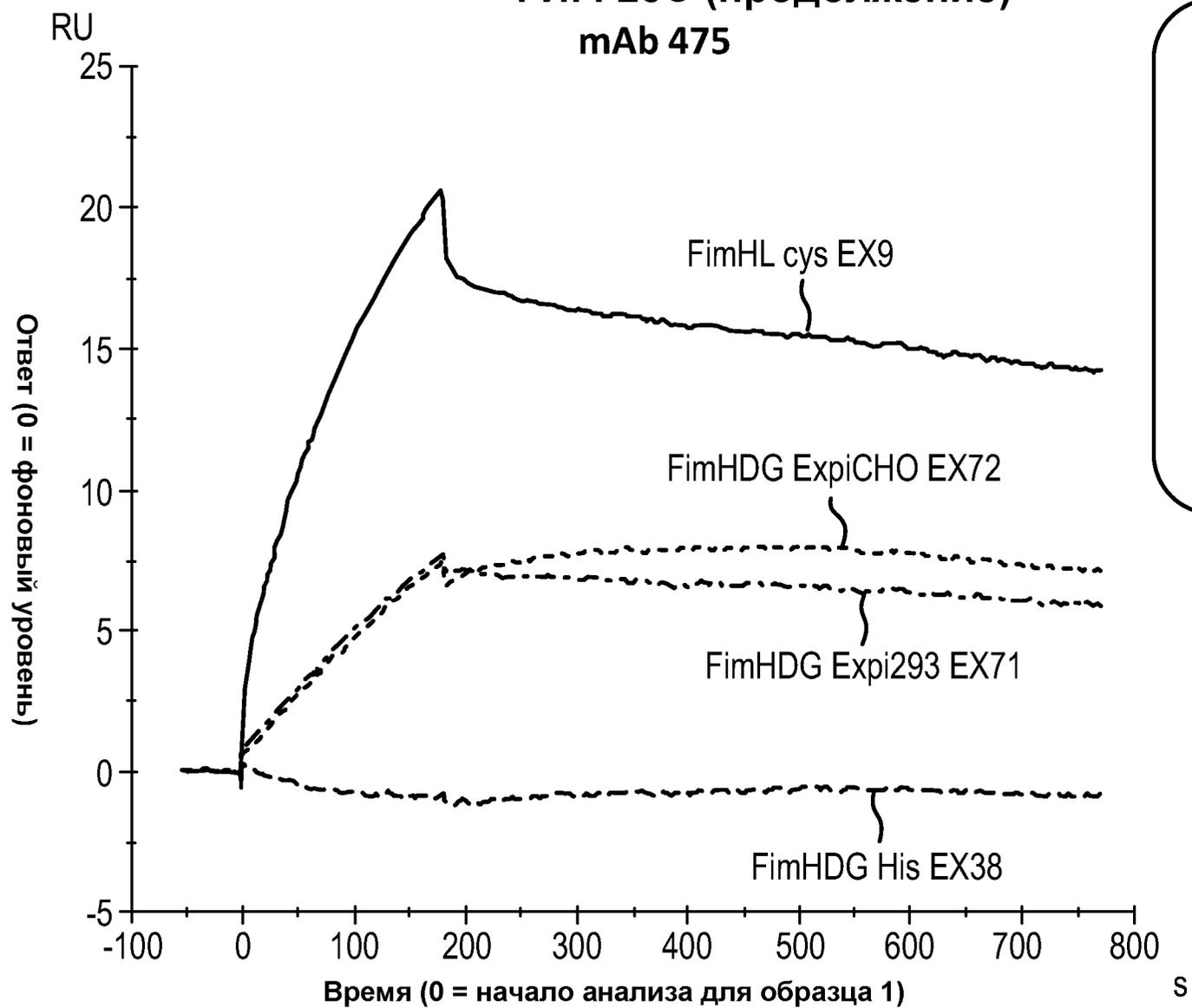
ФИГ. 23В

	EX38 - FimHDG His Expi293	EX71 - FimH-DG Expi293	EX72 FimH-DG CHO
Tm1	н.о.	56°C	56°C
Tm2	71°C	74°C	74°C

ФИГ. 23С
mAb 926

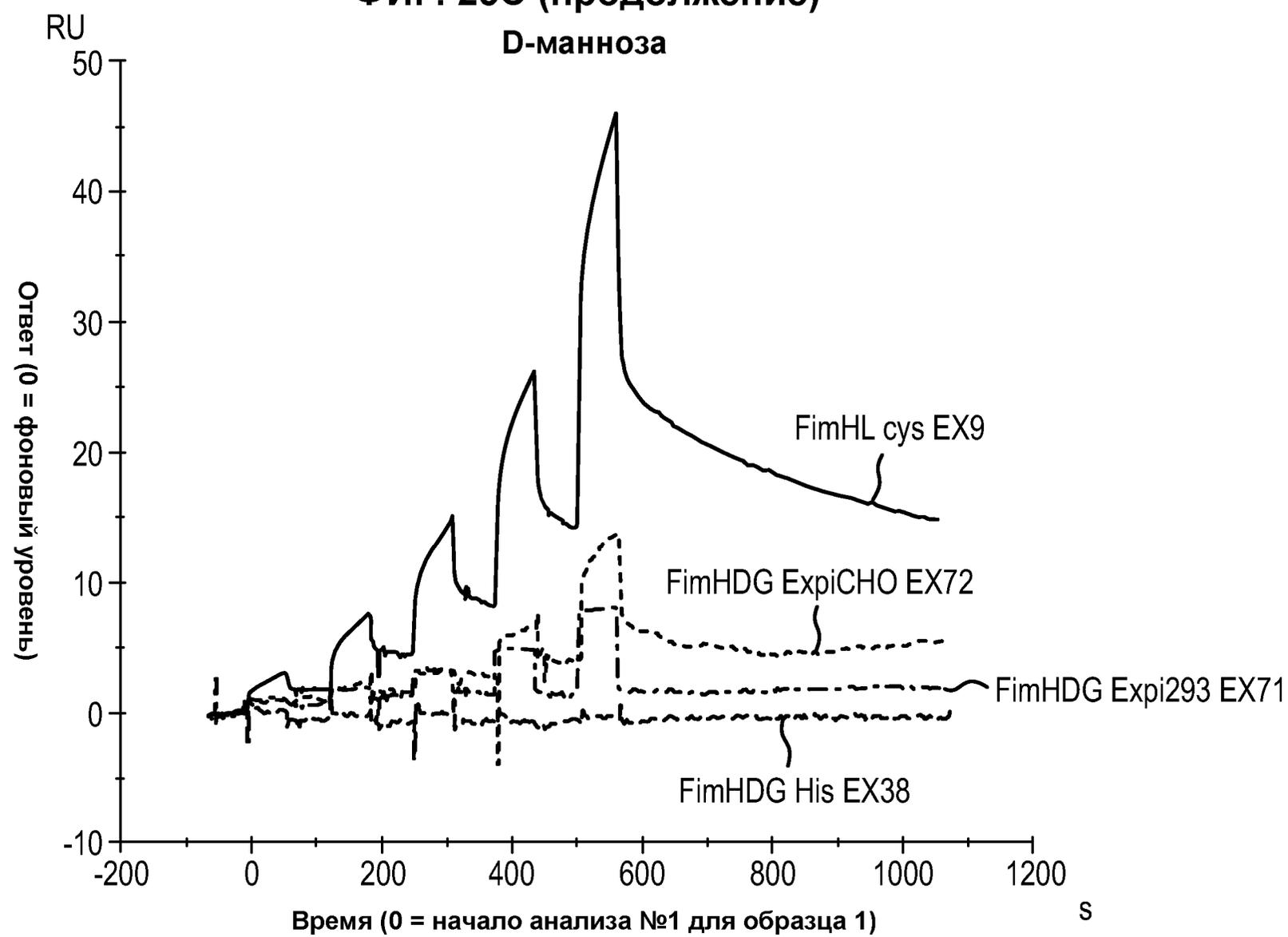


ФИГ. 23С (продолжение)
mAb 475

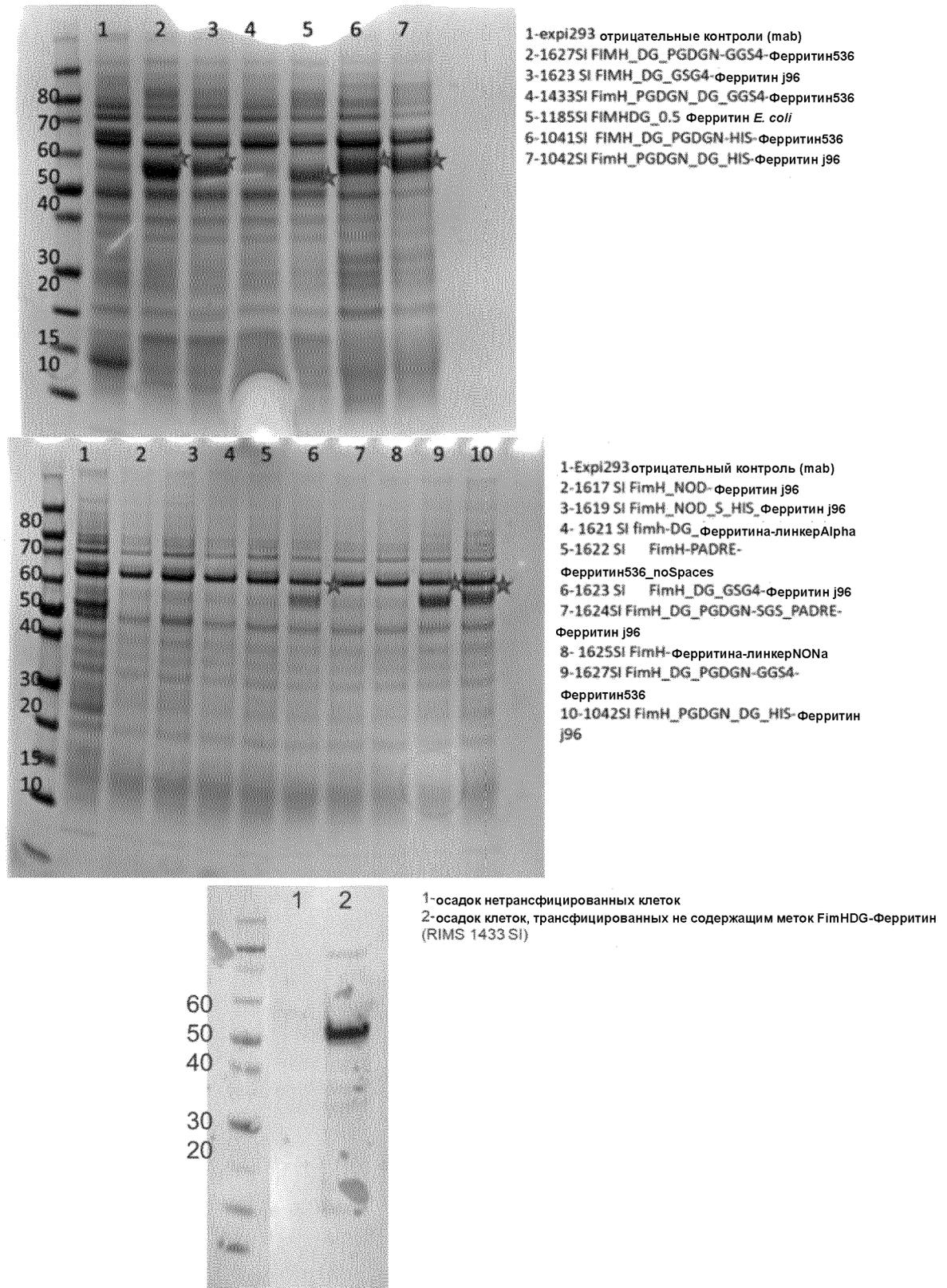


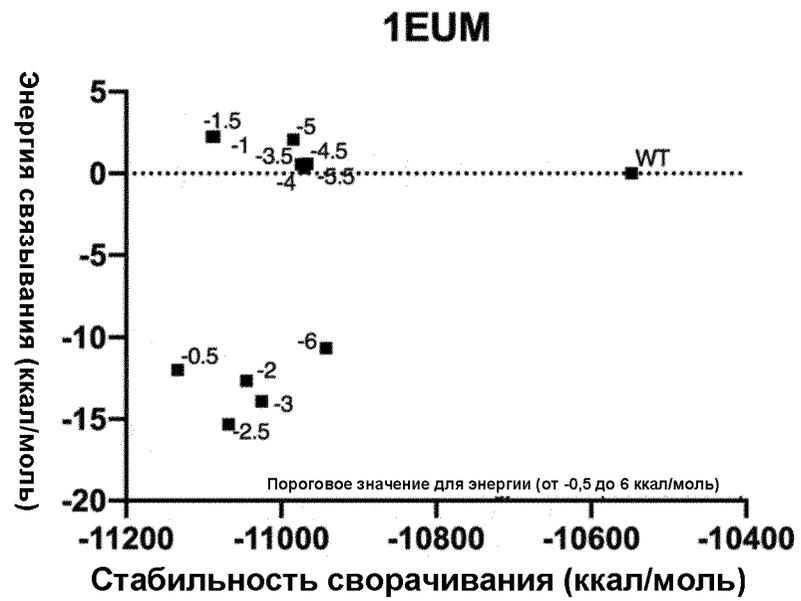
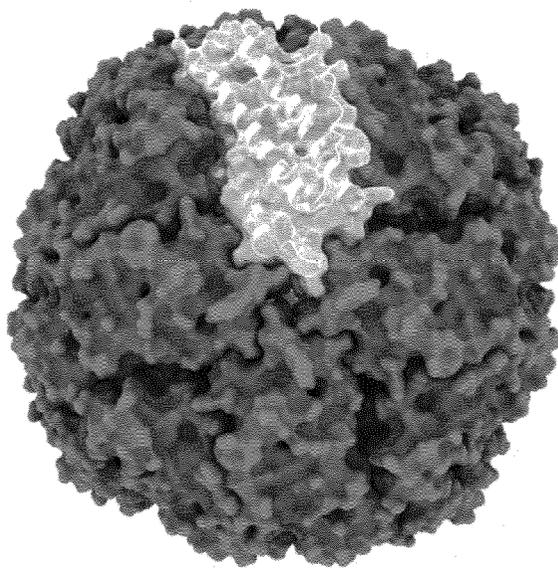
ФИГ. 23С (продолжение)

D-манноза



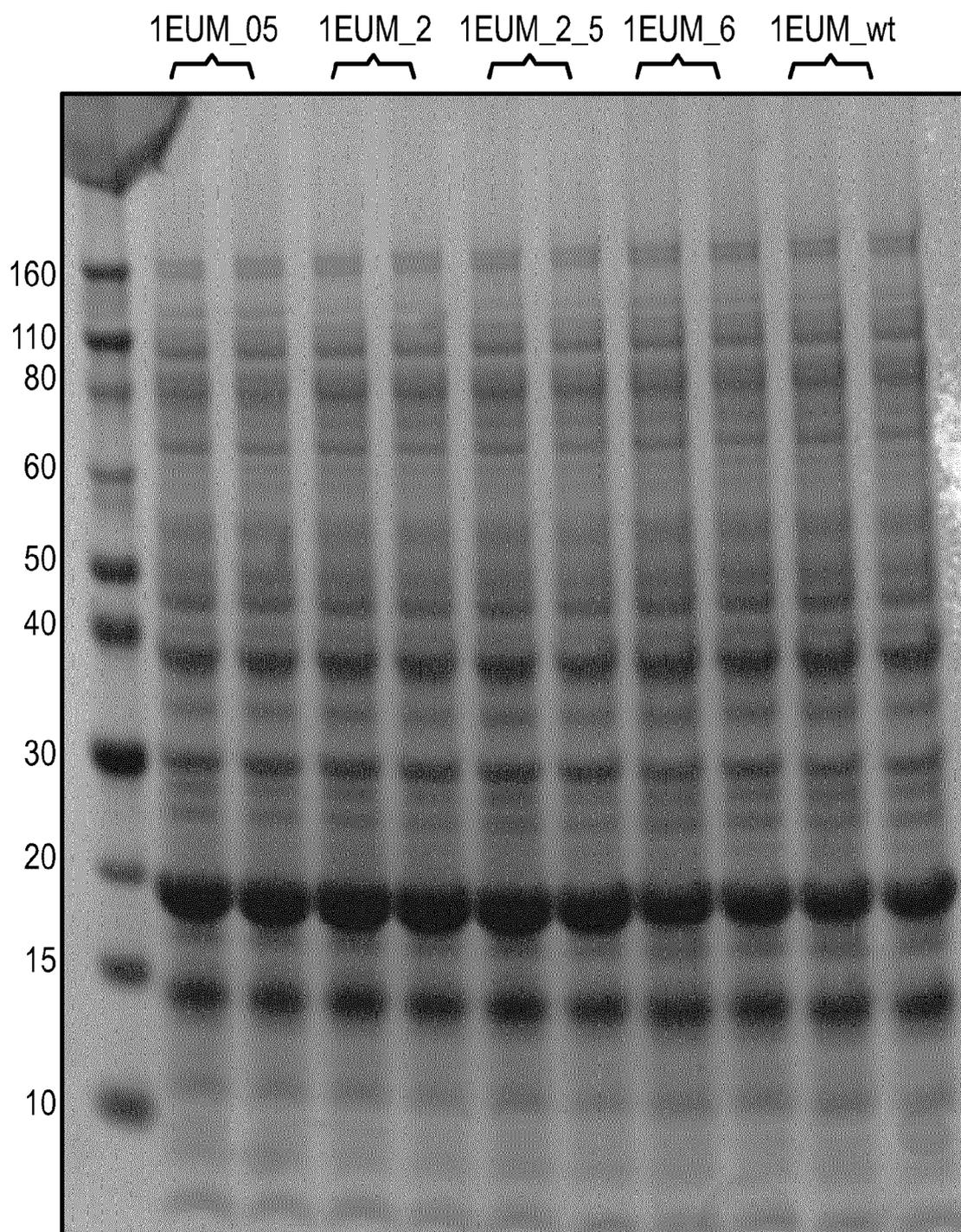
ФИГ. 23D





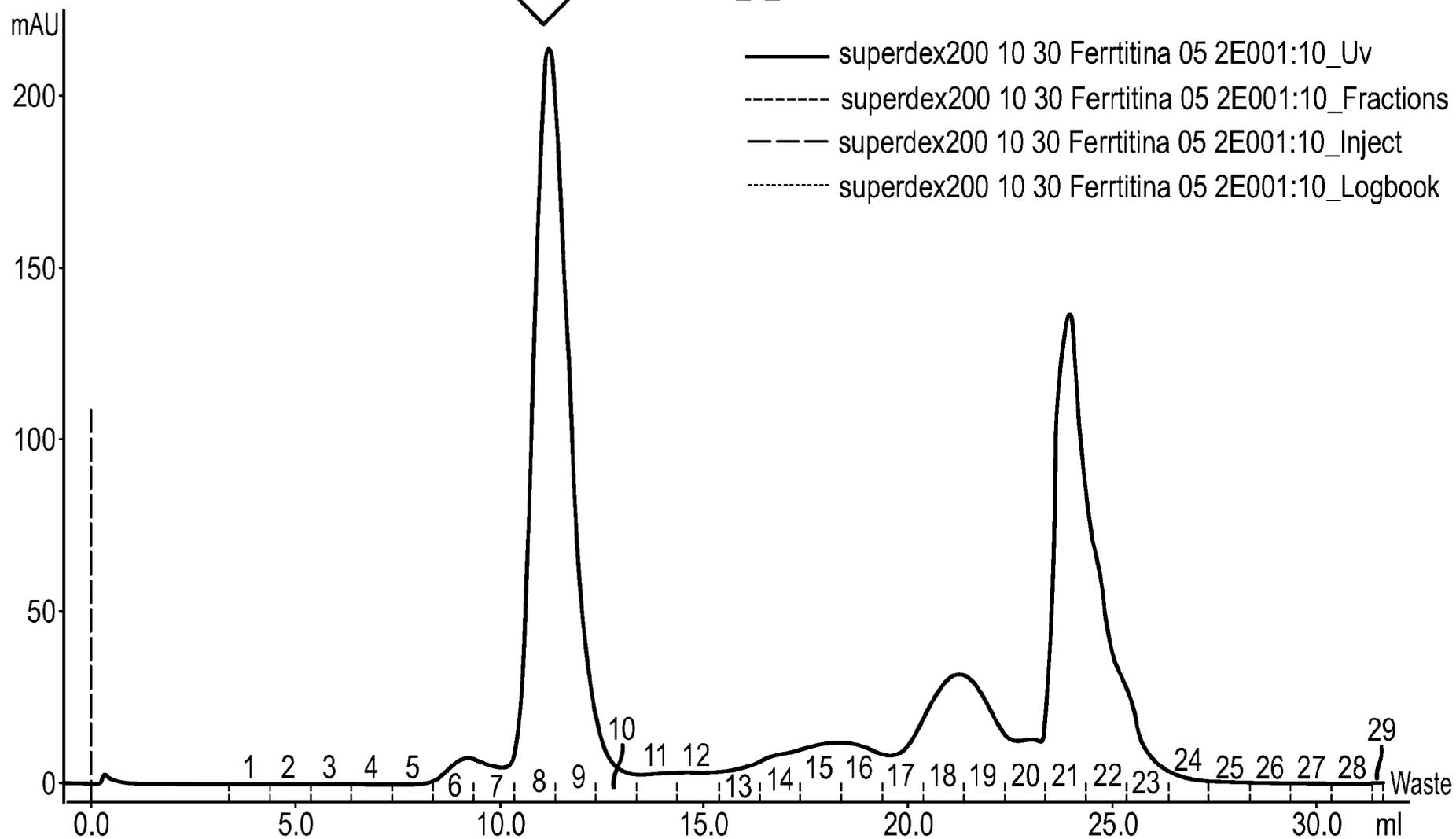
ФИГ. 24

ФИГ. 25А

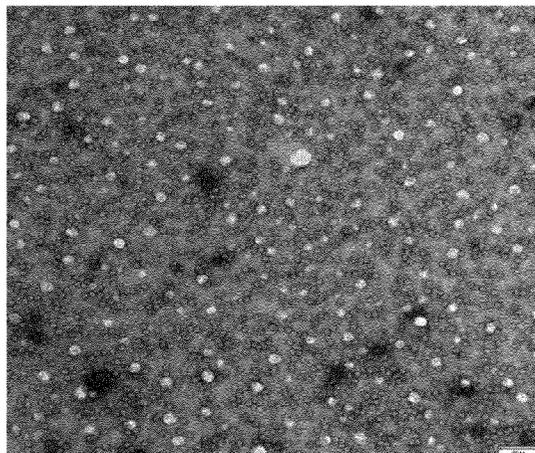


ФИГ. 25В

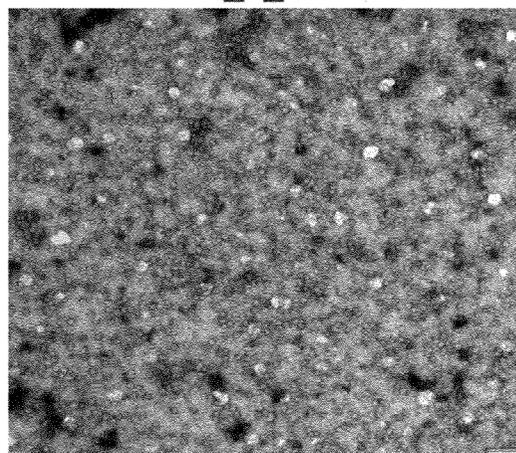
1EUM_0_5



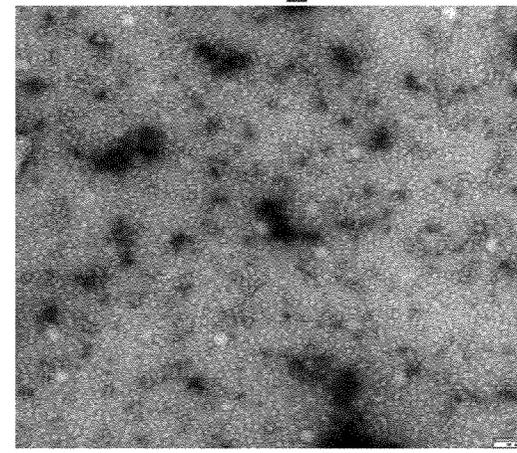
Ферритин WT



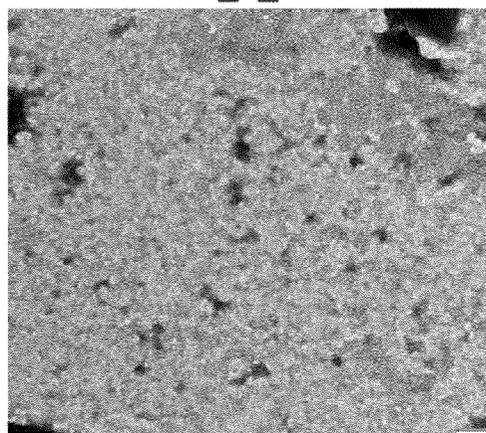
1EUM_0_5



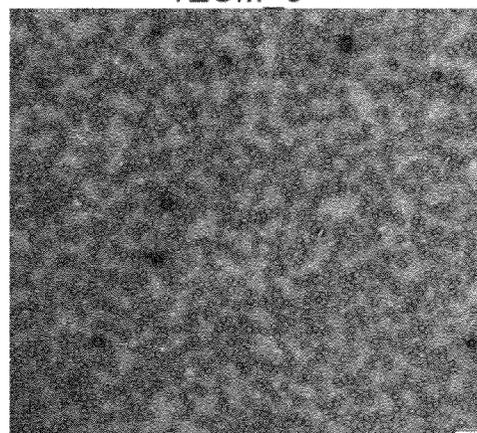
1EUM_2



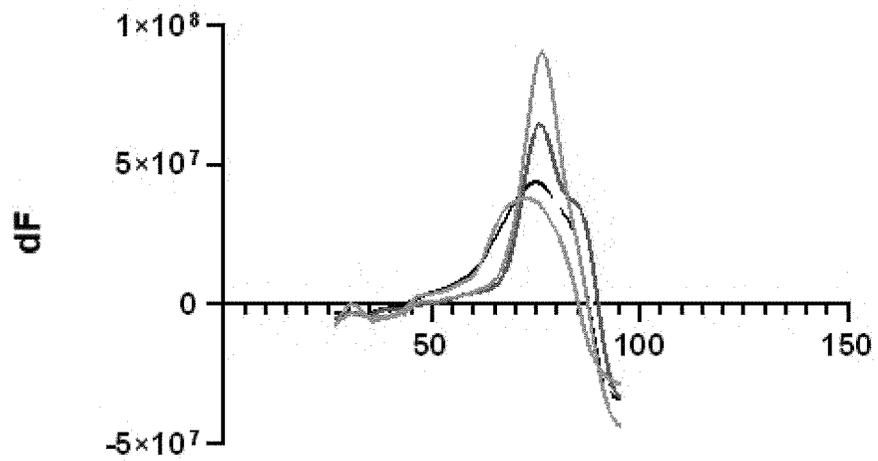
1EUM_2_5



1EUM_6



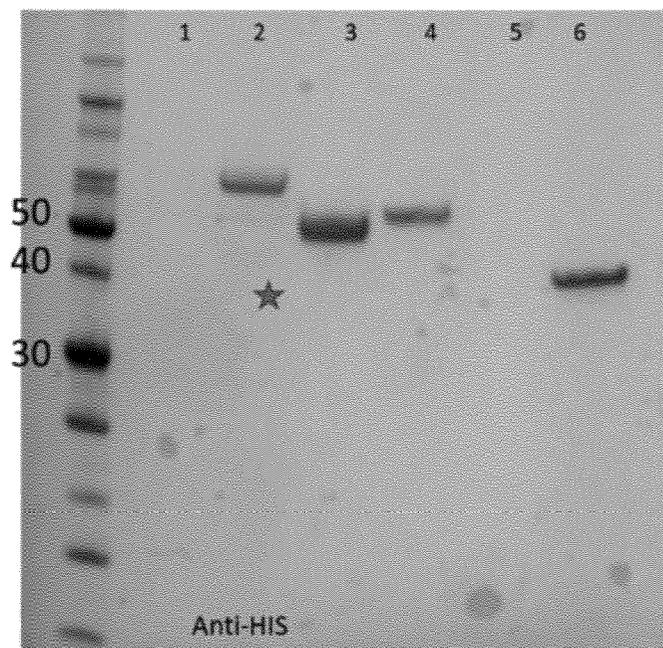
Термостабильность



- wt
- 0.5
- 2
- 6

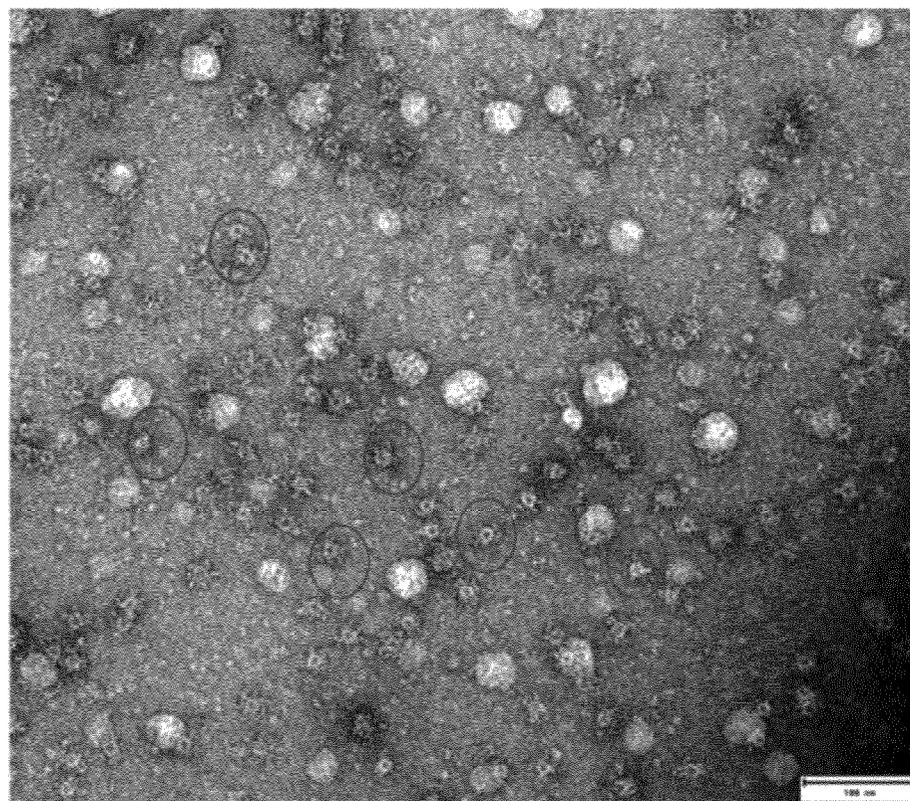
	Tm [°C]
WT	72,5
0.5	76,5
2	75,5
6	74,5

Фиг. 27



Наночастицы:

- 1-Нетрансфицированные клетки
- 2- 1184SI FIMH_DG_PG DGN_536-encapsulin
- 3- 1185SI FIMH_DG_536-1EUM_0_5
- 4-1183SI FIMH_DG_536-MI3
- 5-1126SI FIMH_DG_J96-Hbc
- 6-1096SI FIMHL-MI3



ФИГ. 28