

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392713 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.24(51) Int. Cl. A61K 39/108 (2006.01)
A61P 13/02 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2022.03.31

(54) ПОЛУЧЕНИЕ БИОКОНЬЮГАТОВ E.COLI O18

(31) 21166781.1

(32) 2021.04.01

(33) EP

(86) PCT/IB2022/053013

(87) WO 2022/208430 2022.10.06

(71) Заявитель:
ЯНССЕН ФАРМАСЬЮТИКЛЗ, ИНК.
(US)(72) Изобретатель:
Верденбург Эвелина Марлен, Гёрстен
Йерун, Бургхаут Питер Ян (NL)(74) Представитель:
Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Изобретение относится к клеткам-хозяевам для получения биоконъюгата антигенного полисахарида E.coli O18, конъюгированного с белком-носителем. Клетки-хозяева характеризуются тем, что они содержат модифицированные О-антиген-полимеразы Wzy с конкретными комбинациями аминокислотных замен в одном или более положениях 199, 377 и 395 по сравнению с О-антиген-полимеразой Wzy дикого типа с SEQ ID NO: 1, где модифицированные О-антиген-полимеразы Wzy улучшают выход и профиль гликозилирования биоконъюгатов O18, продуцируемых клетками-хозяевами. Изобретение дополнительно относится к способам, в которых клетки-хозяева используют для получения биоконъюгата антигенного полисахарида E.coli O18, конъюгированного с белком-носителем, композициям, содержащим эти биоконъюгаты, включая поливалентные композиции, содержащие биоконъюгаты дополнительных серотипов полисахаридных О-антигенов.

A1

202392713

202392713

A1

ПОЛУЧЕНИЕ БИОКОНЬЮГАТОВ *E. COLI O18*

5 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к областям медицинской микробиологии, иммунологии и вакцин. В частности, изобретение относится к клеткам-хозяевам, содержащим улучшенные О-антиген-полимеразы Wzy для получения биоконъюгатов антигенного полисахарида *E. coli* O18 с увеличенным выходом и повышенной
10 степенью гликозилирования. Изобретение также относится к композициям, содержащим биоконъюгаты по изобретению, и к применению таких композиций для индуцирования иммунного ответа против *E. coli* с целью профилактики или лечения инфекций, вызванных *E. coli*, в частности заболевания, вызванного инвазивными внекишечными патогенными *E. coli* (ExPEC).

15

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Штаммы внекишечной патогенной *Escherichia coli* (ExPEC) обычно безвредны для желудочно-кишечного тракта человека, наряду с симбиотическими штаммами *E. coli*. Изоляты ExPEC невозможно легко отличить от симбиотических изолятов по
20 серотипу, хотя во многих клональных линиях доминируют ExPEC, что определяется серотипами О-антигена, капсульного и жгутикового антигенов (сокращенно О:К:Н, например, O25:K1:H4). В отличие от симбиотических *E. coli*, штаммы ExPEC экспрессируют широкий набор факторов вирулентности, позволяющих им колонизировать желудочно-кишечный тракт, а также вызывать широкий спектр
25 внекишечных инфекций, которые связаны со значительным бременем затрат на здравоохранение из-за госпитализации и смертности. Новорожденные, пожилые люди и пациенты с ослабленным иммунитетом особенно восприимчивы к инфекции ExPEC, в том числе к инвазивной болезни ExPEC (IED).

О-антиген содержит иммунодоминантный компонент липополисахарида (ЛПС) клеточной стенки грамотрицательных бактерий, в том числе *E. coli*. В настоящее время
30 выявлено >180 серологически уникальных О-антигенов *E. coli*, при этом подавляющее большинство изолятов ExPEC относится менее чем к 20 серотипам О-антигенов. Полноразмерные О-антигены *E. coli* обычно состоят из примерно 10–25 повторяющихся сахарных единиц, присоединенных к высококонсервативной коровой

структуре ЛПС, причем каждый компонент синтезируется отдельно ферментами, кодируемыми преимущественно кластерами генов *rfb* и *rfa* соответственно. После полимеризации О-антигена О-антигенная полисахаридная основа может быть модифицирована, как правило, путем добавления ацетильных или глюкозных остатков.

Эти модификации эффективно увеличивают разнообразие серотипов за счет создания антигенно различных серотипов, имеющих общую полисахаридную основу, но отличающихся боковыми ответвлениями. Гены, кодирующие ферменты, модифицирующие О-антиген, обычно располагаются вне кластера *rfb* на хромосоме, а в некоторых случаях эти гены находятся в составе лизогенных бактериофагов.

Усилия по созданию вакцины для профилактики инфекций ExPEC были сосредоточены на конъюгатах О-антигенного полисахарида. В результате выделения и очистки О-антигенного полисахарида и химической конъюгации с детоксифицированным экзотоксином А *Pseudomonas aeruginosa* была синтезирована 12-валентная вакцина с О-антигенными конъюгатами, которая прошла проверку на безопасность и иммуногенность в клиническом исследовании фазы I (Cross et al., J. Infect. Dis. (1994) v.170, pp.834-40). Эта потенциальная вакцина так и не была лицензирована для клинического применения. Недавно была разработана система биоконъюгации в *E. coli*, в которой антигенный полисахарид и белок-носитель синтезируются *in vivo* и затем конъюгируются *in vivo* под действием олигосахарилтрансферазы PglB, фермента *Campylobacter jejuni*, экспрессированного в *E. coli* (Wacker et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (2006) v. 103, pp. 7088-93). Эта система N-связанного гликозилирования белков способна переносить различные полисахариды на белок-носитель, что позволяет применять методы очистки биоконъюгата от бактерий, в которых он экспрессируется. Биоконъюгация успешно используется для получения конъюгированного полисахарида для потенциальной четырехвалентной вакцины *E. coli* с О-антигеном (Poolman and Wacker, J. Infect. Dis. (2016) v.213(1), pp. 6-13; WO 2015/124769; WO 2017/035181).

Композиция, содержащая 10 биоконъюгатов (O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75, композиция обозначается как ExPEC10V), уже описана и находится в стадии клинических испытаний (например, WO2020/191082A1).

Было замечено, что выход продукта для биоконъюгатов с антигенным полисахаридом O18A был наименьшим по сравнению с другими девятью биоконъюгатами, приготовленными для ExPEC10V (WO2020/191082A1). Кроме того, полученный таким образом биоконъюгат O18A, по-видимому, содержал относительно

большое количество гликанов, состоящих из ограниченного числа полисахаридных единиц повторов антигенного полисахарида O18A, называемых "sEPA" (т. е. белок-носитель EPA, имеющий полисахаридные цепи, состоящие всего из 1–3 единиц повторов, что составляло более 20% биоконъюгатов O18A в периплазматической фракции в процессе получения лекарственного вещества биоконъюгата O18A), причем продукт sEPA нелегко отделить от предпочтительного биоконъюгата, состоящего в основном из гликанов, в котором антигенный полисахарид O18A состоит по меньшей мере из пяти единиц повторов. Изоляты ExPEC, принадлежащие к серогруппе O18, часто упоминаются в современных мониторинговых исследованиях изолятов крови в США и ЕС, поэтому конъюгаты O18 считаются важным компонентом вакцины против ExPEC. Поэтому было бы желательно повысить выход конъюгатов антигенного полисахарида O18.

Таким образом, задачей изобретения является создание материалов и способов для увеличения выхода биоконъюгатов, содержащих антигенный полисахарид O18, в процессе получения и/или создание материалов и способов для получения биоконъюгатов O18 с пониженным относительным количеством sEPA по сравнению с биоконъюгатами O18, полученными с использованием ранее описанного способа получения. Другим объектом изобретения являются материалы и способы получения биоконъюгатов антигенного полисахарида *E. coli* O18 с повышенной степенью гликозилирования по сравнению с биоконъюгатами O18, полученными с использованием материалов и способов, описанных ранее.

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте изобретение относится к граммотрицательной бактериальной клетке-хозяину, содержащей: (a) белок-носитель, содержащий по меньшей мере одну консенсусную последовательность гликозилирования; (b) локус *gfb* O18 *E. coli*; и (c) олигосахарилтрансферазу для переноса олигосахаридов к участкам N-гликозилирования белка-носителя; причем клетка содержит полипептид, обладающий активностью O-антиген-полимеразы Wzy, при этом полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1, причем аминокислотная последовательность содержит i) изолейцин (Ile, I) в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин (Lys, K) в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и аланин (Ala, A) в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1; ii) треонин (Thr, T)

в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и валин (Val, V) в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1; iii) треонин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и аланин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1; iv) изолейцин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и валин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1; или v) изолейцин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, метионин (Met, M) в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и аланин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления в клетке-хозяине полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy, содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1, с той разницей, что аминокислотная последовательность содержит: i) Ile в положении 199, Lys в положении 377 и Ala в положении 395; ii) Thr в положении 199, Lys в положении 377 и Val в положении 395; iii) Thr в положении 199, Lys в положении 377 и Ala в положении 395; iv) Ile в положении 199, Lys в положении 377 и Val в положении 395; или v) Ile в положении 199, Met в положении 377 и Ala в положении 395; причем все положения соответствуют таковым в SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления в клетке-хозяине полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy, содержит Ile в положении 199, Lys в положении 377 и Ala в положении 395, причем положения соответствуют таковым в SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления клетка-хозяин содержит полинуклеотид или вектор, кодирующий полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy, интегрированный в геном клетки-хозяина.

В одном варианте осуществления клеткой-хозяином является клетка-хозяин *Escherichia coli*. В предпочтительном варианте осуществления клеткой-хозяином является штамм K-12 *E. coli*, более предпочтительно штамм K-12 W3110 *E. coli*.

В одном варианте осуществления в клетке-хозяине присутствует по меньшей мере одно из: а) олигосахарилтрансфераза содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 6; b) белок-носитель содержит

SEQ ID NO: 3 и с) локус *rfb* O18 *E. coli* представляет собой локус *rfb* штамма *E. coli* с серотипом O18A. Предпочтительно олигосахарилтрансфераза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В одном варианте осуществления клетка-хозяин включает локус *rfb* O18 *E. coli* с нуклеотидной последовательностью, кодирующей О-антиген-полимеразу Wzy, который кодирует полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy, как определено в настоящем документе.

В дополнительном аспекте изобретение относится к способу получения биоконъюгата антигенного полисахарида *E. coli* O18, конъюгированного с белком-носителем, включающему: (а) культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению, как определено выше, для получения биоконъюгата. Предпочтительно способ дополнительно включает восстановление биоконъюгата.

В одном варианте осуществления способ дополнительно включает включение восстановленного биоконъюгата в фармацевтическую композицию.

В одном варианте осуществления способ дополнительно включает добавление одного или более дополнительных биоконъюгатов полисахаридов О-антигена *E. coli*, конъюгированных с белком-носителем, в фармацевтическую композицию с получением поливалентной композиции биоконъюгата. Предпочтительно один или более дополнительных биоконъюгатов содержат по меньшей мере один О-антигенный полисахарид, выбранный из группы, состоящей из серотипов *E. coli* O1, O2, O4, O6, O8, O15, O16, O25 и O75. В предпочтительном варианте осуществления поливалентная композиция биоконъюгата, полученная в указанном способе, содержит: (i) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O18A, конъюгированного с белком-носителем; (i) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O1A, конъюгированного с белком-носителем; (i) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O2, конъюгированного с белком-носителем; (i) биоконъюгат гликозилированного антигенного полисахарида *E. coli* O4, конъюгированного с белком-носителем; (i) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O6A, конъюгированного с белком-носителем; (vi) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O15, конъюгированного с белком-носителем; (vii) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O16, конъюгированного с белком-носителем; (viii) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O25B, конъюгированного с белком-носителем; и (ix) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O75, конъюгированного с белком-носителем, причем предпочтительно белок-носитель в каждом биоконъюгате содержит SEQ ID NO: 3. В

более предпочтительном варианте осуществления поливалентная композиция биоконъюгата, полученная в указанном способе, дополнительно содержит: (х) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O8, конъюгированного с белком-носителем, причем предпочтительно белок-носитель содержит SEQ ID NO: 3.

5

ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фиг. 1 ДСН-ПААГ, окрашенный кумасси, с внесенными периплазматическими экстрактами культур штамма-продуцента *E. coli* W3110 во встряхиваемых колбах для выявления биоконъюгатов O18A, содержащих варианты Wzy с SEQ ID NO: 1 (дорожки 1 и 3) или с аминокислотными заменами 199I, 377K, 395A (дорожки 2 и 4), в которых была индуцирована экспрессия полисахаридного биоконъюгата O18A. В образцах, внесенных на дорожки 1 и 2, фермент олигосахарилтрансферазу PglB экспрессировали из плазмиды экспрессии уменьшенного размера, тогда как на дорожках 3 и 4 векторная основа плазмиды экспрессии PglB содержала дополнительные 4500 п. о. последовательности ДНК, которые включают некодирующую ДНК и ген *lac*-репрессора *lacI*, что оказалось оптимальным для экспрессии продукта. Стрелками обозначены полосы, в которых находится материал биоконъюгата полисахарида O18A, указывая примерный размер моногликозилированного ЕРА (М), дигликозилированного ЕРА (D) и тригликозилированного ЕРА (Т).

20

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Все технические и научные термины в настоящем документе, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в области, к которой относится данное изобретение. В ином случае определенные термины в данном документе имеют значения, установленные в данном описании. Все патенты, опубликованные заявки на патенты и публикации, процитированные в настоящем документе, включены в него путем ссылки, как если бы они были полностью изложены в настоящем документе. Необходимо отметить, что в настоящем документе и в приложенной формуле изобретения форма единственного числа включает в себя объекты и во множественном числе, если из контекста явно не следует иное.

30

В тексте данного описания и последующей формулы изобретения, если контекст не требует иного, слово «содержать» и его варианты, такие как «содержит» и «содержащий», следует понимать как означающие включение указанного целого числа или стадии, или группы целых чисел или стадий, но не исключение любого другого

целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий. При применении в настоящем документе термин «содержащий» может быть заменен термином «состоящий из» или «включающий в себя» или иногда при применении в настоящем документе может быть заменен термином «имеющий».

5 При применении в настоящем документе термин «состоящий из» исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не упомянутый в элементе формулы изобретения. При применении в настоящем документе термин «состоящий по существу из» не исключает материалы или стадии, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики формулы изобретения. Любые из
10 вышеупомянутых терминов «содержащий», «состоящий из», «включающий в себя» и «имеющий» при применении в настоящем документе в контексте аспекта или варианта осуществления описания могут быть заменены термином «состоящий из» или «состоящий по существу из» для варьирования объемов описания.

В настоящем документе соединительный термин «и/или» между множеством
15 перечисляемых элементов следует понимать как включающий в себя как отдельные, так и комбинированные варианты. Например, если два элемента соединены «и/или», первый вариант относится к возможности применения первого элемента без второго. Второй вариант относится к возможности применения второго элемента без первого. Третий вариант относится к возможности одновременного применения первого и
20 второго элементов. Подразумевается, что любой из этих вариантов соответствует значению и, соответственно, удовлетворяет требованию термина «и/или» в контексте настоящего документа. Кроме того, подразумевается, что одновременное применение более одного из этих вариантов соответствует значению и, соответственно, удовлетворяет требованию термина «и/или».

25 Слово «около» или «приблизительно» при использовании в сочетании с числовым значением означает, что значение может представлять собой заданное значение плюс или минус 20% от значения, предпочтительно плюс или минус 10% от значения, более предпочтительно плюс или минус 5% от значения.

Идентичность последовательности в настоящем документе определена как
30 соотношение между двумя или более аминокислотными (полипептидными или белковыми) последовательностями или двумя или более последовательностями нуклеиновых кислот (полинуклеотидов), определяемое посредством сравнения последовательностей. «Сходство» между двумя аминокислотными последовательностями определяют посредством сравнения аминокислотной

последовательности и ее консервативных аминокислотных заменителей первого полипептида с последовательностью второго полипептида. «Идентичность» и «сходство» можно легко вычислить известными способами.

«Идентичность последовательности» или «сходство последовательностей» может быть определено посредством выравнивания двух пептидных или двух нуклеотидных последовательностей с применением алгоритмов глобального или локального выравнивания в зависимости от длины двух последовательностей. Последовательности одинаковой длины предпочтительно выравнивают с применением алгоритма глобального выравнивания (например, Нидлмана — Вунша), который оптимально выравнивает последовательности по всей длине, в то время как последовательности существенно различающейся длины предпочтительно выравнивают с использованием алгоритма локального выравнивания (например, Смита — Уотермана). Затем последовательности могут называться «по существу идентичными» или «по существу сходными», когда они (при оптимальном выравнивании, например, программами GAP или BESTFIT с применением параметров по умолчанию) имеют по меньшей мере определенный минимальный процент идентичности последовательностей (определенный ниже). Наиболее предпочтительно выравнивание последовательностей выполняют в ClustalW (1.83) с использованием настроек по умолчанию.

Альтернативно процент сходства или идентичности можно определить посредством поиска в общедоступных базах данных с применением таких алгоритмов, как FASTA, BLAST и т. д. Таким образом, последовательности нуклеиновых кислот и белков настоящего изобретения можно дополнительно применять в качестве «последовательности запроса» для выполнения поиска в общедоступных базах данных, например, для идентификации других членов семейства или связанных последовательностей. Такие поиски можно выполнять с помощью программ BLASTn и BLASTx (версия 2.0) Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403–10). Нуклеотидные поиски на основе BLAST могут быть выполнены с помощью программы NBLAST, оценка = 100, длина слова = 12 для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновой кислоты wzu по настоящему изобретению. Поиски белка на основе BLAST могут быть выполнены с помощью программы BLASTx, оценка = 50, длина слова = 3 для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам белка изобретения. Чтобы получить совмещенные гэпы для сравнения, можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402. При использовании программ

BLAST и Gapped BLAST можно применять параметры по умолчанию соответствующих программ (например, BLASTx и BLASTn). См. домашнюю страницу Национального центра биотехнологической информации по адресу <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

- 5 Если не указано иное, термин «по меньшей мере», предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в этом ряду.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

10 Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что применение О-антиген-полимеразы Wzy, которая отличается от эталонной последовательности в одном или более конкретных положениях, приводит к значительному улучшению выхода биоконъюгата антигенного полисахарида O18. Кроме того, было обнаружено, что использование такой полимеразы удивительным образом способствует получению конъюгата антигенного полисахарида O18 с повышенным соотношением гликанов к
15 белку и/или повышенной заполненностью сайтов гликозилирования.

Соответственно, в первом аспекте в изобретении предложена клетка-хозяин для применения при получении биоконъюгата антигенного полисахарида *E. coli* O18, конъюгированного с белком-носителем.

20 В одном варианте осуществления клетка-хозяин по изобретению по меньшей мере содержит: (a) белок-носитель, содержащий по меньшей мере одну консенсусную последовательность гликозилирования; (b) локус *rfb* O18 *E. coli*; (c) олигосахарилтрансферазу; и (d) полипептид по изобретению, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy.

25 В клетке-хозяине полипептид по изобретению, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy, представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1, и дополнительно обладающий активностью полимеразы О-антигена. Наличие или отсутствие у полипептида по изобретению активности полимеразы О-антигена можно
30 определить путем экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей О-антиген полимеразу Wzy, в подходящей клетке-хозяине и определения количества образующегося полимеризованного О-антигена методами, известными специалистам в данной области, например, как описано в публикации Woodward et al. (2010, Nat Chem

Biol. 2010 Jun; 6(6): 418–423), которая полностью включена в данный документ путем ссылки.

В одном варианте осуществления клетка-хозяин по настоящему изобретению содержит полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy, причем полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 1, причем аминокислотная последовательность содержит:

i) изолейцин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и аланин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1;

ii) треонин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и валин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1;

iii) треонин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и аланин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1;

iv) изолейцин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и валин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1; или

v) изолейцин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, метионин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и аланин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1.

Аминокислотное положение, которое соответствует одному из аминокислотных положений 199, 377 или 395 в SEQ ID NO: 1 соответственно, в настоящем документе относится к положению в аминокислотной последовательности, отличной от SEQ ID NO: 1, которое соответствует одному из положений 199, 377 или 395 в SEQ ID NO: 1 соответственно, в выравнивании последовательности SEQ ID NO: 1 с этой последовательностью, отличной от SEQ ID NO: 1, предпочтительно в выравнивании последовательности ClustalW (1.83) с SEQ ID NO: 1, предпочтительно с использованием настроек по умолчанию. Специалисту в данной области известно, как идентифицировать соответствующие положения аминокислот в аминокислотных последовательностях О-антиген полимеразы Wzy, отличных от SEQ ID NO: 1, с использованием алгоритмов выравнивания аминокислотных последовательностей, как определено выше.

В предпочтительном варианте осуществления клетка-хозяин по настоящему изобретению содержит полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy, причем полипептид содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1, с той разницей, что аминокислотная последовательность содержит: i) изолейцин в положении, соответствующем положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и аланин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1; ii) треонин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и валин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1; iii) треонин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и аланин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1; iv) изолейцин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и валин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1; или v) изолейцин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, метионин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и аланин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1. Таким образом, в этом варианте осуществления клетка-хозяин по настоящему изобретению содержит полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy, причем полипептид содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1, с той разницей, что аминокислотная последовательность содержит: i) изолейцин в положении 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении 377 в SEQ ID NO: 1 и аланин в положении 395 в SEQ ID NO: 1; ii) лизин в положении 377 в SEQ ID NO: 1; iii) лизин в положении 377 в SEQ ID NO: 1 и аланин в положении 395 в SEQ ID NO: 1; iv) изолейцин в положении 199 в SEQ ID NO: 1 и лизин в положении 377 в SEQ ID NO: 1; или v) изолейцин в положении 199 в SEQ ID NO: 1 и аланин в положении 395 в SEQ ID NO: 1.

В предпочтительном варианте осуществления клетка-хозяин по настоящему изобретению содержит полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy, причем полипептид содержит изолейцин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и аланин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1.

Как будет понятно специалисту, в одном из вариантов осуществления для экспрессии полипептида, обладающего активностью О-антиген-полимеразы Wzy, клетка-хозяин по изобретению предпочтительно включает полинуклеотид, кодирующий полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy по изобретению, как определено в настоящем документе выше. Полинуклеотиду может предшествовать промотор, функционально связанный с ним. В определенных вариантах осуществления промотор является эндогенным к кодирующей последовательности О-антиген-полимеразы Wzy. В определенных предпочтительных вариантах осуществления промотор представляет собой эндогенный промотор, приводящий к экспрессии О-антиген-полимеразы Wzy в бактериях семейства *Enterobacteriaceae*, предпочтительно бактерии рода *Escherichia*, более предпочтительно бактерии вида *E. coli*. В других вариантах осуществления промотор гетерологичен кодирующей последовательности Wzy, например, известно, что в рекомбинантных системах экспрессии применяют сильный промотор, известный специалисту в данной области. Например, промотор представляет собой индуцибельный или конститутивный прокариотический промотор, такой как промотор *ara*, *phoA*, *tac*, *tet*, *trc*, *trp*, *PBAD*, λ P_L, T5 или T7.

В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложен выделенный полинуклеотид, который можно использовать при конструировании клетки-хозяина в соответствии с изобретением. Полинуклеотид может представлять собой рекомбинантный, синтетический или искусственный полинуклеотид. Полинуклеотид может быть представлен в любой форме нуклеиновой кислоты, например ДНК или РНК, предпочтительно ДНК. Полинуклеотид может содержать один или более нуклеотидов, которые не присутствуют во встречающемся в природе полинуклеотиде, кодирующем Wzy, таком как встречающийся в природе полинуклеотид, кодирующий Wzy, с SEQ ID NO: 2. В частности, полинуклеотид для применения в изобретении будет по меньшей мере отличаться от встречающегося в природе полинуклеотида, кодирующего Wzy, такого как SEQ ID NO: 2, в одном или более кодонов, соответствующих положениям 199, 377 и 395 в SEQ ID NO: 1. Кроме того, полинуклеотид для применения в изобретении может отличаться от встречающегося в природе нуклеотида, кодирующего Wzy, в кодонах, отличных от положений, соответствующих по меньшей мере одному из положений 199, 377 и 395 в SEQ ID NO: 1. Полинуклеотид может иметь один или более нуклеотидов, которые не присутствуют во встречающемся в природе полинуклеотиде, кодирующем Wzy, на его

5'-конце и/или 3'-конце. Специалисты в данной области могут, используя стандартные методики, производить замены нуклеотидов, которые не влияют на полипептидную последовательность с кодированием описанными полинуклеотидами, чтобы показать особенности использования кодонов любым конкретным организмом-хозяином, в котором должны экспрессироваться полипептиды. Таким образом, если не указано иное, «нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность», включает все нуклеотидные последовательности, которые являются дегенеративными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность.

Как будет понятно специалисту в данной области, в одном из вариантов осуществления полинуклеотид, кодирующий полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy по изобретению, как определено в настоящем документе, может быть включен в конструкт экспрессии или вектор. Предпочтительно в конструкте экспрессии полинуклеотид, кодирующий полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy, функционально связан с последовательностью контроля экспрессии для экспрессии полипептида в клетке-хозяине согласно настоящему изобретению, например в экспрессионной кассете. Такая последовательность контроля экспрессии может включать промотор, как указано выше, и может дополнительно включать в себя последовательность Шайна — Дальгарно, последовательность терминации транскрипции и т. д., и т. д. В одном варианте осуществления конструкт экспрессии содержится в векторе. В одном варианте осуществления вектор представляет собой эпистомальный вектор, например плазмиду или вирусный вектор, предпочтительно плазмиду. В другом варианте осуществления полинуклеотид, вектор или конструкт экспрессии интегрированы в геном клетки-хозяина. В определенных вариантах осуществления вектор или конструкт экспрессии предпочтительно находится в форме ДНК. В определенных вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид изобретения, функционально связанный с промотором, что означает, что полинуклеотид находится под контролем промотора. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy, по настоящему изобретению, как определено в настоящем документе, интегрирован в его естественное положение в локус *rfb* в геноме клетки-хозяина, например, создан с помощью сайт-направленного мутагенеза с использованием методов генетической модификации на основе

гомологичных рекомбинаций, которые известны специалисту в области молекулярной биологии.

Клетка-хозяин по настоящему изобретению для применения при получении биоконъюгата антигенного полисахарида *E. coli* O18, конъюгированного с белком-носителем, является бактериальной клеткой-хозяином. В одном варианте осуществления клетка-хозяин является грамотрицательной бактериальной клеткой-хозяином. Подходящие бактериальные или прокариотические клетки-хозяева для применения при получении биоконъюгата, содержащего антиген O18 *E. coli*, включают, без ограничений, виды *Escherichia*, виды *Shigella*, виды *Klebsiella*, виды *Xanthomonas*.
 5 Виды *Salmonella*. Виды *Yersinia*, виды *Lactococcus*, виды *Lactobacillus*. Виды *Pseudomonas*, виды *Corynebacterium*, виды *Streptomyces*. Виды *Streptococcus*. Виды *Staphylococcus*. Виды *Bacillus* и виды *Clostridium*. В предпочтительном варианте осуществления клетка-хозяин по изобретению представляет собой клетку-хозяина *Escherichia coli*, более предпочтительно штамм K-12 *E. coli*, такой как штамм W3110,
 10 причем последний является особенно предпочтительным.

В одном варианте осуществления клетка-хозяин является клеткой-хозяином, которая не встречается в природе. Таким образом, клетка-хозяин может быть получена из встречающегося в природе изолята, например клинического изолята, который был модифицирован для экспрессии полипептида, обладающего активностью О-антиген-
 20 полимеразы Wzy, как описано в данном документе, и который предпочтительно был дополнительно модифицирован для включения одного или более или всех из i) локуса *rfb* O18, как определено в данном документе, ii) (конструкта нуклеиновой кислоты для экспрессии) белка-носителя, содержащего по меньшей мере одну консенсусную последовательность гликозилирования, как определено в данном документе, и iii)
 25 (конструкта нуклеиновой кислоты для экспрессии) олигосахарилтрансферазы, как определено в данном документе.

Клетка-хозяин по настоящему изобретению для применения при получении биоконъюгата антигенного полисахарида *E. coli* O18, конъюгированного с белком-носителем, дополнительно предпочтительно содержит олигосахарилтрансферазу (OST)
 30 для переноса олигосахаридов в сайты N-гликозилирования на белке-носителе. Поэтому предпочтительно, чтобы клетка-хозяин в соответствии с настоящим документом содержала нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу (OST). Олигосахарилтрансферазы, используемые в данном документе, представляют собой ферменты, которые переносят соединенные с липидом олигосахариды в остатки

растущих полипептидных цепей, которые содержат консенсусный мотив гликозилирования, например аспарагиновые (Asn, N) остатки растущих полипептидных цепей, которые содержат консенсусный мотив N-гликозилирования, примерами таких консенсусных мотивов N-гликозилирования являются SEQ ID NO: 4 или Asn-X-Ser(Thr). В рамках данной заявки следует понимать, что для мотива N-гликозилирования Asn-X-Ser(Thr) X может представлять собой любую аминокислоту, за исключением пролина. Предпочтительно такие олигосахарилтрансферазы переносят олигосахариды в аспарагиновые остатки с SEQ ID NO: 4 в полипептидной цепи белка-носителя, как описано в данном документе. Нуклеиновая кислота, кодирующая олигосахарилтрансферазу, может быть нативной для клетки-хозяина или может быть введена в клетку-хозяина с использованием генетических подходов. В предпочтительных вариантах осуществления олигосахарилтрансфераза гетерологична для клетки-хозяина. *E. coli* не содержит олигосахарилтрансферазу, и, следовательно, если *E. coli* используют в качестве клетки-хозяина для получения биоконъюгатов, гетерологичная олигосахарилтрансфераза содержится в такой клетке-хозяине, например, после введения путем генной инженерии. Олигосахарилтрансфераза может быть получена из любого источника, известного в данной области, в контексте настоящего описания.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления олигосахарилтрансфераза представляет собой олигосахарилтрансферазу из *Campylobacter*. Например, в одном варианте осуществления олигосахарилтрансфераза представляет собой олигосахарилтрансферазу из *Campylobacter jejuni* (т. е. PglB; см., например, Wacker et al., 2002, Science 298:1790-1793; см. также, например, идентификационный номер гена NCBI: 3231775 (номер доступа UniProt O86154). В другом варианте осуществления олигосахарилтрансфераза представляет собой олигосахарилтрансферазу из *Campylobacter lari* (см., например, идентификационный номер гена NCBI: 7410986).

В конкретных вариантах осуществления олигосахарилтрансфераза представляет собой PglB из *Campylobacter jejuni*, включая натуральный (дикого типа) белок или любой его вариант, такие как описаны в международных патентных публикациях WO2016/107818 и WO2016/107819. PglB может переносить соединенные с липидом олигосахариды в аспарагиновые остатки в консенсусных последовательностях с SEQ ID NO: 4 и Asn-X-Ser(Thr). В конкретных вариантах осуществления олигосахарилтрансфераза PglB представляет собой полипептид, включающий

олигосахарилтрансферазу, как определено в данном документе, причем полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности с SEQ ID NO: 6. В предпочтительном варианте осуществления олигосахарилтрансфераза PglB содержит

5 аминокислотную последовательность, которая идентична SEQ ID NO: 6. В определенных вариантах осуществления одна или более эндогенных консенсусных последовательностей гликозилирования в PglB дикого типа были мутированы, чтобы избежать аутогликозилирования PglB, например SEQ ID NO: 6, содержащая мутацию N534Q. Примеры варианта PglB, подходящего для применения в клетке-хозяине,

10 представленные в данном документе, включают PglB с SEQ ID NO: 6, содержащую мутацию N311V.

Клетка-хозяин по настоящему изобретению для применения при получении биоконъюгата антигенного полисахарида *E. coli* O18, конъюгированного с белком-носителем, дополнительно предпочтительно содержит нуклеотидную

15 последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий по меньшей мере один сайт гликозилирования, содержащий консенсусную последовательность гликозилирования Asn-X-Ser(Thr), более предпочтительно по меньшей мере один сайт гликозилирования, имеющий SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления белок-носитель выбирают из группы, состоящей из детоксифицированного экзотоксина A *P. aeruginosa* (EPA), флагеллина *E. coli* (FliC), CRM197, белка связывания мальтозы (MBP), дифтерийного анатоксина, столбнячного анатоксина, детоксифицированного гемолизина A *S. Aureus*, фактора агглютинации A, фактора агглютинации B, термолабильного энтеротоксина *E. coli*, детоксифицированных вариантов термолабильного энтеротоксина *E. coli*, субъединицы

25 холерного токсина B (CTB), холерного токсина, детоксифицированных вариантов холерного токсина, Sat-белка *E. coli*, домена-пассажира Sat-белка *E. coli*, пневмолизина *Streptococcus pneumoniae*, гемоцианина фисуреллы (KLH), PcrV *P. aeruginosa*, наружного мембранного белка *Neisseria meningitidis* (OMPC) и белка D из нетипируемого *Haemophilus influenzae*.

В определенных вариантах осуществления белок-носитель представляет собой детоксифицированный экзотоксин A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) или CRM197, предпочтительно белок-носитель представляет собой EPA. Для EPA в литературе описаны различные варианты детоксицированных белков, которые могут быть использованы в качестве белков-носителей. В некоторых вариантах осуществления

30

белки-носители ЕРА, используемые в конъюгате по настоящему изобретению, модифицированы таким образом, что белок является менее токсичным и/или более чувствительным к гликозилированию. Например, детоксификация может быть достигнута путем мутирования и делеции каталитически важных остатков L552V и ΔE553 по данным Lukas et al., 1988, Infect Immun, 56: 3095-3098, и Ho et al., 2006, Hum Vaccin, 2:89-98. В конкретном варианте осуществления белки-носители, используемые при получении конъюгатов по настоящему изобретению, модифицированы таким образом, что количество сайтов гликозилирования в белках-носителях оптимизировано так, чтобы обеспечивать более низкие концентрации белка, подлежащего введению, например, в иммуногенной композиции, в форме биоконъюгата. В конкретном варианте осуществления клетка-хозяин кодирует ЕРА, содержащую 1–10, предпочтительно 2–4, предпочтительно 4 сайта гликозилирования, включающих консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 4. В одном варианте осуществления белок-носитель содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности с SEQ ID NO: 3, и содержит 1–10, предпочтительно 2–4, предпочтительно 4 сайта гликозилирования, содержащих консенсусную последовательность гликозилирования Asn-X-Ser(Thr), более предпочтительно с SEQ ID NO: 4. В конкретном варианте осуществления белок-носитель содержит ЕРА, которая содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 3.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления клетка-хозяин в соответствии с настоящим изобретением содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу, содержащую SEQ ID NO: 6, и нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий SEQ ID NO: 3.

Клетка-хозяин по настоящему изобретению для применения при получении биоконъюгата антигенного полисахарида *E. coli* O18, конъюгированного с белком-носителем, дополнительно предпочтительно содержит локус *rfb* O18 *E. coli* для синтеза структуры O18-антигенного полисахарида.

В *E. coli* генные продукты, участвующие в биогенезе О-антигена, кодируются локусом *rfb*. Таким образом, клетка-хозяин, как представлено в настоящем документе, предпочтительно содержит нуклеотидную последовательность локуса *rfb* O18 *E. coli*, предпочтительно локуса *rfb* штамма *E. coli*, имеющего серотип O18A. Используемый в настоящем документе термин «локус *rfb* O18» и «генный кластер *rfb* O18» относится к локусу в граммотрицательном бактериальном геноме, который содержит кластер генов,

которые вместе кодирует ферментативный механизм, способный синтезировать структуру O18-антигенного полисахарида. Термин «локус *rfb*» предпочтительно относится к геномному локусу рода *Escherichia*, в частности *E. coli*.

В определенных вариантах осуществления локус *rfb* O18 гетерологичен для клетки-хозяина, например, введен в клетку-предшественника клетки-хозяина и предпочтительно интегрирован в ее геном. Предпочтительно исходный генный кластер *rfb*, если таковой присутствует в клетке-предшественнике, заменен на генный кластер O18 *rfb* в клетке-хозяине для обеспечения получения биоконъюгата O18.

В определенных вариантах осуществления генный кластер *rfb* для антигенного полисахарида *E. coli* O18 представляет собой генный кластер *rfb* для антигенного полисахарида *E. coli* O18A. Таким образом, предпочтительно генный кластер *rfb* для антигенного полисахарида *E. coli* O18A содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 5, причем нуклеотидная последовательность кодирует ферменты, которые создают антигенный полисахарид *E. coli* O18A, и при этом предпочтительно нуклеотидная последовательность, кодирующая О-антиген-полимеразу Wzy, представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy, в соответствии с настоящим изобретением, как определено выше. В определенных вариантах осуществления генный кластер *rfb* содержит полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 5, за исключением последовательности, кодирующей О-антиген-полимеразу Wzy, которая представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy, в соответствии с настоящим изобретением, как определено выше. Структура единицы повтора для антигенного полисахарида *E. coli* O18A показана как запись (O18A) в таблице 1.

Таким образом, в определенных предпочтительных вариантах осуществления клетка-хозяин по изобретению содержит генный кластер *rfb* *E. coli*, в котором нуклеотидная последовательность, кодирующая О-антиген-полимеразу Wzy, представляет собой нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy, в соответствии с настоящим изобретением, как определено выше. Таким образом, в определенных предпочтительных вариантах осуществления эндогенная кодирующая последовательность О-антиген-полимеразы Wzy была заменена нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид, обладающий активностью О-антиген-

полимеразы Wzy, в соответствии с настоящим изобретением, как определено выше. Удаление эндогенных кодирующих последовательностей Wzy и замена их на последовательности, кодирующие Wzy-полимеразу по изобретению, могут быть выполнены с помощью методов редактирования генов, широко известных в данной области.

В одном варианте осуществления ген *waal* удаляют из или функционально инактивируют в геноме клетки-хозяина в соответствии с настоящим изобретением. Термины «*waal*» и «ген *waal*» относятся к гену лигазы О-антигена, кодирующему связанный с мембраной фермент с активным центром, расположенным в периплазме. Кодируемый геном *waal* фермент переносит связанный с ундекапренилфосфатом (UPP) О-антиген на липидное ядро А, образуя липополисахарид. Удаление или нарушение эндогенного гена *waal* (например, штаммы $\Delta waal$) нарушает перенос О-антигена в липид А и вместо этого может усиливать перенос О-антигена в другую доступную биомолекулу, такую как белок-носитель, экспрессируемый в клетке-хозяине по изобретению.

В одном варианте осуществления клетки-хозяина по изобретению гены *gtrABS E. coli*, которые отвечают за гликозилирование О-антигена O16, удаляют или функционально инактивируют в геноме клетки-хозяина. В предпочтительном варианте осуществления гены *gtrABS E. coli* удаляют или функционально инактивируют в геноме W3110 *E. coli* клетки-хозяина. Хотя гены *gtrA* и *gtrB* в разных серотипах являются высокоомологичными и взаимозаменяемыми, ген *gtrS* кодирует серотип-специфическую О-антиген-гликозилтрансферазу. *GtrS* в W3110 *E. coli* может переносить остаток глюкозы (Glc) в сахар GlcNAc в мотиве α -L-Rha-(1 $\rightarrow$ 3)-D-GlcNAc О-антигена *E. coli* O16.

Как будет понятно специалисту в данной области, полипептид по настоящему изобретению, содержащийся в клетке-хозяине по изобретению, такой как белок-носитель, олигосахарилтрансфераза, полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy и другие ферменты генного кластера *rfb*, удобно вводить в клетку-хозяина в форме нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды по изобретению. Нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды по изобретению, предпочтительно представляют собой конструкции нуклеиновых кислот, в частности конструкции экспрессии, содержащие одну или более экспрессионных кассет для экспрессии полипептидов по изобретению, причем нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептиды по изобретению, функционально связаны с

последовательностями контроля экспрессии для экспрессии полипептидов в клетке-хозяине по изобретению. Подходящие последовательности контроля экспрессии упоминаются выше и обычно по меньшей мере включают промотор. Промотор может представлять собой конститутивный промотор, или он может представлять собой промотор, который можно регулировать, например репрессировать или индуцировать при определенных условиях, например при изменениях температуры или наличии определенных химических веществ или белков в клетке, все из которых являются такими, как хорошо известно в данной области. Конструкты нуклеиновой кислоты могут являться экстрахромосомными, например плазида или другой вектор, или конструкты нуклеиновой кислоты могут быть встроены в геном клетки-хозяина по изобретению. Молекулярно-биологические способы конструирования и/или синтеза конструктов нуклеиновых кислот для экспрессии полипептидов в клетке-хозяине по данному изобретению в целом хорошо известны в данной области.

Необязательно, длиной цепи О-антигенов можно манипулировать с помощью нативного механизма регуляции длины цепи О-антигена Wzz, например путем сверхэкспрессии или дополнения регулятора цепи О-антигена Wzz, например путем замены гена *wzzB* *E. coli* на один из его аналогов из видов *Salmonella* и *Shigella* или из *P. aeruginosa*, например на аналог *Salmonella enterica*, *fepE* или другой гомолог *wzz* (см., например, US 2018/0099038, WO 2020/039359), при этом, например, количество единиц повтора О-антигена может быть увеличено с помощью дополнительной сверхэкспрессии белка Wzy или без нее. Влияние *wzz*-подобных генов описано в литературе для этих видов. Однако для получения биоконъюгатов с хорошей иммуногенностью ничего этого не требуется, и в предпочтительных вариантах осуществления биоконъюгаты по изобретению получают без манипуляций с механизмом регулятора длины цепи Wzz.

В одном варианте осуществления выход биоконъюгата антигена O18 *E. coli*, полученного с использованием клетки-хозяина по изобретению, содержащей полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy и имеющий специфические аминокислоты в указанных положениях, как определено выше, составляет по меньшей мере 105%, 110%, 120%, 150% или 200% от выхода, полученного при использовании тех же условий с идентичной клеткой-хозяином, экспрессирующей эталонную О-антиген-полимеразу Wzy, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления заполненность сайтов гликозилирования биоконъюгата антигена O18 *E. coli*, полученного с использованием клетки-хозяина, содержащей полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy и имеющий специфические аминокислоты в указанных положениях, как определено в настоящем документе, улучшается по сравнению с заполненностью сайтов гликозилирования биоконъюгата, полученного при тех же условиях с использованием идентичной клетки-хозяина, экспрессирующей эталонную О-антиген-полимеразу Wzy, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. Таким образом, в одном варианте осуществления в композиции, содержащей биоконъюгат антигена O18 *E. coli*, полученный с помощью клетки-хозяина по изобретению, в которой белок-носитель содержит 4 сайта гликозилирования, по меньшей мере 50, 55, 60, 65 или 70% молекул биоконъюгата являются ди-, три- или тетрагликозилированными, т. е. имеют от двух до четырех заполненных сайтов гликозилирования. Предпочтительно в этом варианте осуществления белок-носитель содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности с SEQ ID NO: 3, содержащий 4 сайта гликозилирования, содержащие консенсусную последовательность гликозилирования Asn-X-Ser(Thr), более предпочтительно с SEQ ID NO: 4. Наиболее предпочтительно в этом варианте осуществления белок-носитель содержит EPA, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В определенных вариантах осуществления такие композиции представляют собой периплазматическую фракцию клетки-хозяина, продуцирующей биоконъюгат O18. Предпочтительно такие композиции содержат не более 20%, 15%, 10% биоконъюгатов со средним числом единиц повторов антигена O18 ('sEPA) от 1 до 3.

В дополнительном аспекте изобретение дополнительно относится к способам, в которых клетку-хозяина по изобретению используют для получения биоконъюгата антигенного полисахарида *E. coli* O18, конъюгированного с белком-носителем. Таким образом, один вариант осуществления относится к способу получения биоконъюгата антигенного полисахарида *E. coli* O18, конъюгированного с белком-носителем, причем предпочтительно способ по меньшей мере включает стадию а) культивирования клетки-хозяина по изобретению для получения биоконъюгата. В одном варианте осуществления на стадии а) клетку-хозяина по изобретению культивируют в условиях, способствующих получению биоконъюгата. В определенных вариантах осуществления способ относится к получению биоконъюгата O18A. Клетку-хозяина по изобретению

культивируют в условиях, подходящих для экспрессии биоконъюгата, который содержит белок-носитель, ковалентно связанный с антигенным полисахаридом *E. coli* O18, такие условия известны специалистам в данной области, с использованием методов, описанных, например, ранее в WO 2015/124769 или WO 2020/191082.

В одном варианте осуществления способ получения биоконъюгата O18 дополнительно включает стадию b) восстановления биоконъюгата. Биоконъюгат O18 может быть выделен, отделен и/или очищен из рекомбинантных клеток-хозяев или культуральной среды с помощью любого способа, известного в данной области, с учетом настоящего описания. Например, биоконъюгат O18 может быть очищен любым известным в данной области способом очистки белка, например методом хроматографии (например, ионообменной, анионообменной, аффинной, колоночной хроматографии), центрифугирования, дифференциальной растворимости или любым другим стандартным методом очистки белков. См., например, Saraswat et al., 2013, Biomed. Res. Int., (p. 1-18); см. также способы, описанные в WO2009/104074. Дополнительно, чтобы упростить очистку, биоконъюгат может быть слит с гетерологичными полипептидными последовательностями. Способы очистки и определения характеристик биоконъюгатов описаны, например, в публикации Ihssen et al., 2010, упомянутой выше, а также в публикациях WO 2006/119987, WO 2009/104074 и, в частности, в WO 2015/124769, WO 2017/035181 и WO2020/191082A1, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления способ получения биоконъюгата O18 дополнительно включает стадию c) включения восстановленного биоконъюгата в фармацевтическую композицию. Включение биоконъюгата в фармацевтическую композицию обычно включает получение композиции, содержащей биоконъюгат по изобретению, и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, как более подробно описано ниже. В одном варианте осуществления способ получения биоконъюгата O18 дополнительно включает добавление адъюванта к фармацевтической композиции, содержащей биоконъюгат. Подходящие адъюванты для включения в фармацевтическую композицию описаны ниже более подробно.

В одном варианте осуществления способ получения биоконъюгата O18 дополнительно включает добавление одного или более дополнительных конъюгатов или биоконъюгатов О-антигенных полисахаридов *E. coli*, конъюгированных с белком-носителем, в фармацевтическую композицию для получения поливалентной композиции, предпочтительно поливалентной композиции биоконъюгата. Таким

образом, один или более дополнительных конъюгатов О-антигенных полисахаридов *E. Coli*, конъюгированных с белком-носителем, предпочтительно являются биоконъюгатами О-антигенных полисахаридов *E. coli* серотипов, отличных от O18, или более предпочтительно, отличных от O18A. В предпочтительном варианте

5 осуществления один или более дополнительных конъюгатов или биоконъюгатов содержат по меньшей мере одно, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или все девять О-антигенных полисахаридов, выбранных из группы, состоящей из серотипов *E. coli* O1, O2, O4, O6, O8, O15, O16, O25 и O75. Подробное описание серотипов О-антигенных полисахаридов *E. coli* представлено в настоящем документе ниже (см.

10 также таблицу 1). Такие дополнительные конъюгаты или биоконъюгаты могут быть получены, как описано выше, например в WO2020/191082 A1.

Таким образом, в одном предпочтительном варианте осуществления способ получения биоконъюгата O18 дополнительно включает добавление дополнительных биоконъюгатов О-антигенных полисахаридов *E. coli*, конъюгированных с белком-

15 носителем, в фармацевтическую композицию для получения поливалентной композиции, причем поливалентная композиция биоконъюгата содержит: (i) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O18A, конъюгированного с белком-носителем; (i) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O1A, конъюгированного с белком-носителем; (i) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O2,

20 конъюгированного с белком-носителем; (i) биоконъюгат гликозилированного антигенного полисахарида *E. coli* O4, конъюгированного с белком-носителем; (i) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O6A, конъюгированного с белком-носителем; (vi) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O15, конъюгированного с белком-носителем; (vii) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O16,

25 конъюгированного с белком-носителем; (viii) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O25B, конъюгированного с белком-носителем; и (ix) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O75, конъюгированного с белком-носителем. В одном варианте осуществления поливалентная композиция биоконъюгата дополнительно содержит: (x) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O8, конъюгированного с белком-

30 носителем. Предпочтительно в этих вариантах осуществления белок-носитель в каждом биоконъюгате от (i) до (ix) содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 3.

В другом аспекте изобретение относится к применению клетки-хозяина по настоящему изобретению, содержащей полипептид, обладающий активностью О-

антиген-полимеразы Wzy и имеющий специфические аминокислоты в указанных положениях, как определено выше (т. е., в (i) I199, K377 и A395; или в (ii) T199, K377 и V395; или в (iii) T199, K377 и A395; или в (iv) I199, K377 и V395; или в (v) I199, M377 и A395; причем в каждом случае положения соответствуют положениям SEQ ID NO:1),
 5 для улучшения заполненности сайтов гликозилирования биоконъюгата антигена *E. coli* O18. Улучшение заполненности сайтов гликозилирования биоконъюгата антигена *E. coli* O18 может, например, проявляться в уменьшении количества биоконъюгатов с единицами коротких повторов (при этом n в структуре O18 в таблице 1 составляет всего около 1–3) и/или предпочтительно в увеличении количества биоконъюгатов,
 10 состоящих из белков-носителей, содержащих антигенные полисахариды O18, конъюгированные по крайней мере с двумя или более консенсусными последовательностями N-гликозилирования в белке-носителе (при этом предпочтительно n в структуре O18 в таблице 1 составляет по меньшей мере 5), по сравнению с заполненностью сайтов гликозилирования биоконъюгата, полученного
 15 при использовании тех же условий с идентичной клеткой-хозяином, экспрессирующей эталонную О-антиген-полимеразу Wzy, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

В другом аспекте изобретение относится к биоконъюгату антигенного полисахарида *E. coli* O18, конъюгированного с белком-носителем, который получают
 20 или который может быть получен в соответствии со способом по изобретению для получения биоконъюгата с использованием клетки-хозяина по настоящему изобретению, как описано выше.

В настоящем документе термины «конъюгат», «гликоконъюгат» и «биоконъюгат» относятся к конъюгированному продукту, содержащему О-антиген *E. coli*, ковалентно
 25 связанный с белком-носителем. Конъюгат по изобретению предпочтительно представляет собой биоконъюгат, который является продуктом конъюгации, продуцируемым в клетке-хозяине, где О-антиген и белок-носитель получают биосинтетически с помощью механизмов клетки-хозяина и где О-антиген также ковалентно присоединен к белку-носителю ферментативно, например, через N-связи с
 30 помощью ферментов клетки-хозяина.

В еще одном аспекте изобретение относится к композиции, содержащей биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O18, конъюгированного с белком-носителем, который получают или который может быть получен в соответствии со

способом получения биоконъюгата по изобретению с использованием клетки-хозяина по настоящему изобретению, как описано выше.

В одном варианте осуществления композиция, содержащая биоконъюгат антигена *E.coli* O18, конъюгированного с белком-носителем, представляет собой композицию, содержащую биоконъюгат, причем белок-носитель содержит 4 сайта гликозилирования, и при этом по меньшей мере 50, 55, 60, 65 или 70% молекул белка-носителя в композиции гликозилированы с повторами антигена *E.coli* O18 на по меньшей мере двух последовательностях N-гликозилирования, т. е. является ди-, три- или тетрагликозилированным, и, таким образом, имеет два-четыре заполненных сайта гликозилирования. Предпочтительно в этом варианте осуществления белок-носитель содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности с SEQ ID NO: 3, содержащий 4 сайта гликозилирования, содержащие консенсусную последовательность гликозилирования Asn-X-Ser(Thr), более предпочтительно с SEQ ID NO: 4. Наиболее предпочтительно в этом варианте осуществления белок-носитель содержит ЕРА, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В определенных вариантах осуществления такие композиции представляют собой периплазматическую фракцию клетки-хозяина, продуцирующей биоконъюгат O18. Предпочтительно такие композиции содержат не более 20%, 15%, 10% биоконъюгатов со средним числом единиц повторов антигенного полисахарида *E. coli* O18 (sЕРА) от 1 до 3.

В одном варианте осуществления композиция, содержащая биоконъюгат антигена *E. coli* O18, конъюгированного с белком-носителем, представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую, помимо биоконъюгата, фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. (Фармацевтические) композиции изобретения могут содержать любой фармацевтически приемлемый эксципиент, включающий в себя носитель, наполнитель, консервант, солюбилизатор и/или разбавитель. Солевые растворы, водный раствор декстрозы и растворы глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, в частности в растворах для инъекций. К приемлемым эксципиентам относятся крахмал, глюкоза, лактоза, сахароза, желатин, солод, рис, мука, мел, силикагель, стеарат натрия, глицеринмоностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое снятое молоко, глицерин, пропилен-гликоль, вода, этанол и т. д. Дополнительные примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны специалистам в данной области и описаны в справочниках.

В настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к нетоксичному материалу, который не оказывают негативное влияние на эффективность композиции в соответствии с настоящим изобретением или биологической активности композиции в соответствии с настоящим изобретением.

5 Термин «фармацевтически приемлемый носитель» может относиться к любому эксципиенту, разбавителю, наполнителю, соли, буферу, стабилизатору, солюбилизатору, маслу, липиду, содержащей липид везикуле, микросфере, липосомальной оболочке или другому материалу, хорошо известному в данной области для применения в фармацевтических составах. Следует понимать, что характеристики
10 фармацевтически приемлемого носителя будут зависеть от способа введения для конкретного применения. В соответствии с конкретными вариантами осуществления в свете настоящего описания в изобретении можно применять любой фармацевтически приемлемый носитель, подходящий для применения в вакцине. Приемлемые эксципиенты включают в себя, без ограничений, стерильную воду, солевой раствор, декстрозу, глицерин, этанол или т.п. и их комбинации, а также стабилизаторы,
15 например альбумин сыворотки человека (HSA) или другие приемлемые белки и восстанавливающие сахара.

Подходящие буферы включают в себя трис-буферный физиологический раствор, фосфатный буфер и сахарозофосфатно-глутаматный буфер. Например, трис-буферный
20 физиологический раствор (TBS) pH 7,4 (например, содержащий Tris, NaCl и KCl, например, в концентрации 25 mM, 137 mM и 2,7 mM соответственно); фосфатный буфер, содержащий около 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ при pH около 7,0, около 5% (масс./об.) сорбита, около 10 mM метионина и около 0,02% (масс./об.) полисорбата 80; или фосфатный буфер, содержащий около 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ при pH около 7,0,
25 около 8% (масс./об.) сахарозы, около 1 mM EDTA и около 0,02% (масс./об.) полисорбата 80.

Подходящие соли включают одну или более из, например, трис-гидрохлорида, хлорида натрия, хлорида кальция, хлорида калия, фосфата натрия, глутамата
30 моносодия и солей алюминия (например, гидроксид алюминия, фосфат алюминия, сульфат алюминия-калия или смесь таких алюминиевых солей).

Подходящие консерванты включают фенол, бензетония хлорид, 2-феноксиэтанол или тимеросал в концентрации от 0,001% до 0,01% (масс./об.) консерванта. В других вариантах осуществления консервант не включен.

Композиции могут быть составлены таким образом, чтобы они подходили для предполагаемого способа введения субъекту. Например, композиции могут быть предназначены для подкожного, парентерального, перорального, внутрикожного, трансдермального, колоректального, внутрибрюшинного, интравагинального, ректального, внутривенного, буккального, интраназального, интратрахеального, внутримышечного, местного, трансдермального или легочного введения, предпочтительно внутримышечного введения.

Композиции изобретения могут быть включены в контейнер, упаковку или дозатор совместно с инструкциями по введению.

В определенных вариантах осуществления композиции изобретения можно хранить перед применением, например, композиции можно хранить в замороженном состоянии (например, при температуре около -20°C или около -70°C); хранить в условиях холодильника (например, при температуре около $2-8^{\circ}\text{C}$, например около 4°C) или хранить при комнатной температуре.

Фармацевтические композиции необязательно могут содержать или необязательно вводиться в комбинации с адъювантом. Адъювант для введения в комбинации с композицией изобретения можно вводить до, одновременно с или после введения иммуногенных композиций. В других предпочтительных вариантах осуществления фармацевтические композиции по изобретению не содержат адъюванта и/или не вводятся в комбинации с ним.

В настоящем документе термин «адъювант» относится к соединению, которое при введении вместе или в составе композиции по изобретению усиливает и/или ускоряет иммунный ответ на конъюгат, содержащий антиген *E. coli* O18, соединенный с белком-носителем, но когда адъювантное соединение вводят отдельно, оно не вызывает иммунного ответа на конъюгат. Адъюванты могут усиливать иммунный ответ по нескольким механизмам, включая, например, рекрутирование лимфоцитов, стимуляцию В и/или Т-клеток и/или стимуляцию антигенпрезентирующих клеток.

Конкретные примеры адъювантов включают в себя, без ограничений, алюминиевые соли (алюм) (такие как гидроксид алюминия, фосфат алюминия, сульфат алюминия и оксид алюминия, включая наночастицы, содержащие составы алюма и наноалюма), фосфат кальция, монофосфориллипид А (MPL) или 3-ди-О-ацилированный монофосфорил А (3D-MPL) (см., например, патент Великобритании GB2220211, EP0971739, EP1194166, US6491919), AS01, AS02, AS03 и AS04 (все GlaxoSmithKline; см., например, EP1126876, US7357936 для AS04, EP0671948,

EP0761231, US5750110 для AS02), соединения имидазопиридина (см. WO2007/109812), соединения имидазохиноксалина (см. WO2007/109813), дельта-инулин, активирующие STING синтетические циклические динуклеотиды (например, US20150056224), комбинации лецитина и гомополимеров карбомера (например, US6676958) и сапонины, такие как Quil A и QS21, необязательно в комбинации с QS7 (например, US 5,057,540). В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой адъювант Фрейнда (полный или неполный). В определенных вариантах осуществления адъювант содержит Quil-A, например, доступный в продаже от Brenntag (сейчас — Croda) или Invivogen. QuilA содержит экстрагируемую водой фракцию сапонинов из дерева *Quillaia saponaria* Molina. Эти сапонины относятся к группе тритерпеноидных сапонинов, которые имеют общую структуру тритерпеноидного каркаса. Известно, что сапонины индуцируют сильный адъювантный ответ на Т-зависимые и Т-независимые антигены, а также сильные цитотоксические CD8-лимфоцитарные ответы и усиливают ответ на слизистые антигены. Они также могут быть объединены с холестерином и фосфолипидами с образованием иммуностимулирующих комплексов (ISCOM), где адъювант QuilA может активировать как опосредованные антителами, так и опосредованные клетками иммунные ответы на широкий диапазон антигенов из разных источников. В определенных вариантах осуществления адъювант представляет собой AS01, например AS01B. AS01 представляет собой адъювантную систему, содержащую MPL (3-О-дезацил-4'-монофосфориллипид A), QS21 (*Quillaia saponaria* Molina, фракция 21) и липосомы. В определенных вариантах осуществления AS01 доступен в продаже (GSK) или может быть получен так, как описано в документе WO 96/33739, включенном в настоящий документ путем ссылки. Определенные адъюванты содержат эмульсии, которые представляют собой смеси двух несмешивающихся текучих сред, например масла и воды, одна из которых суспендирована в виде небольших капель внутри другой и стабилизируется поверхностно-активными агентами. Эмульсии типа «масло в воде» содержат воду, образующую непрерывную фазу, окружающую небольшие капли масла, а эмульсии типа «вода в масле» содержат масло, образующее непрерывную фазу. Некоторые эмульсии содержат сквален (метаболизируемое масло). Некоторые адъюванты содержат блок-сополимеры, которые представляют собой сополимеры, образованные, когда два мономера совместно кластеризуются и образуют блоки повторяющихся звеньев. Примером эмульсии масла в воде, содержащей блок-сополимер, сквален и стабилизатор микрочастиц, является TiterMax®, который может быть коммерчески получен из Sigma-Aldrich. Необязательно эмульсии могут быть

комбинированы или могут содержать дополнительные иммуностимулирующие компоненты, такие как агонист TLR4. Некоторые адъюванты представляют собой эмульсии типа «масло в воде» (такое как сквален или арахисовое масло), также используемые в MF59 (см., например, EP0399843, US 6299884, US6451325) и AS03, 5
необязательно в комбинации с иммунными стимуляторами, такими как монофосфориллипид А и/или QS21, например в AS02 (см. Stoute et al., 1997, N. Engl. J. Med. 336, 86–91). Дополнительные примеры адъювантов представляют собой липосомы, содержащие иммунные стимуляторы, такие как MPL и QS21, такие как AS01E и AS01B (например, US 2011/0206758). Другими примерами адъювантов 10
являются CpG и имидазохинолины (такие как имиквимод и R848). См., например, Reed G, et al., 2013, Nature Med, 19: 1597-1608. В определенных вариантах осуществления адъювант представляет собой адъювант Th1.

В определенных вариантах осуществления адъювант содержит сапонины, предпочтительно экстрагируемую водой фракцию сапонинов, полученную из *Quillaja 15
saponaria*. В определенных вариантах осуществления адъювант содержит QS-21.

В определенных вариантах осуществления адъювант содержит агонист toll-подобного рецептора 4 (TLR4). Агонисты TLR4 хорошо известны в данной области, см., например, Ireton GC and SG Reed, 2013, Expert Rev Vaccines 12: 793-807. В определенных вариантах осуществления адъювант представляет собой агонист TLR4, 20
содержащий липид А, или его аналог или производное.

Адъювант, например, включая агонист TLR4, может быть составлен различными способами, например, в виде эмульсий, таких как эмульсии типа «вода в масле» (в/м) или эмульсии типа «масло в воде» (м/в) (примерами являются MF59, AS03), стабильные (нано-)эмульсии (SE), липидные суспензии, липосомы, (полимерные) 25
наночастицы, виросомы, адсорбированные квасцы, водные составы (AF) и т. п., представляющие собой различные системы доставки для иммуномодулирующих молекул в адъюванте и/или для иммуногенов.

Иммуностимулирующий агонист TLR4 можно необязательно комбинировать с другими иммуномодулирующими компонентами, такими как сапонины (например, 30
QuilA, QS7, QS21, Matrix M, Iscoms, Iscomatrix и т. д.), соли алюминия, активаторы других TLR (например, имидазохинолины, флагеллин, аналоги дцРНК, агонисты TLR9, такие как CpG, и т. д.) и т. п. (см., например, Reed et al., 2013 выше).

В настоящем документе термин «липид А» относится к гидрофобному липидному фрагменту молекулы ЛПС, которая содержит глюкозамин и связана с кето-

дезоксиоктулозонатом во внутреннем ядре молекулы ЛПС посредством кетозидной
 связи, которая закрепляет молекулу ЛПС в наружном слое наружной мембраны
 грамотрицательных бактерий. Обзор синтеза ЛПС и структур липида А см., например,
 в Raetz, 1993, J. Bacteriology 175:5745-5753, Raetz CR and C Whitfield, 2002, Annu Rev
 Biochem 71: 635-700; US 5,593,969 и US 5,191,072. Липид А, используемый в
 настоящем документе, включает в себя встречающийся в природе липид А, его смеси,
 аналоги, производные и предшественники. Термин включает в себя моносахариды,
 например предшественник липида А, называемый липидом Х; дисахаридный липид А;
 гептаацильный липид А; гексаацильный липид А; пентаацильный липид А;
 тетраацильный липид А, например тетраацильный предшественник липида А,
 называемый липидом IVA; дефосфорилированный липид А; монофосфорильный липид
 А; дифосфорильный липид А, такой как липид А из *Escherichia coli* и *Rhodobacter*
sphaeroides. Некоторые иммуноактивирующие структуры липида А содержат 6
 ацильных цепей. Четыре первичные ацильные цепи, присоединенные непосредственно
 к глюкозаминовым сахарам, представляют собой 3-гидроксиацильные цепи, обычно
 имеющие длину от 10 до 16 атомов углерода. Две дополнительные ацильные цепи
 часто присоединяются к 3-гидроксигруппам первичных ацильных цепей. В качестве
 примера липид А *E. coli*, как правило, содержит четыре C14 3-гидроксиацильные цепи,
 присоединенные к сахарам, и одну C12 и одну C14, присоединенные к 3-
 гидроксигруппам первичных ацильных цепей в 2'- и 3'-положении соответственно.

В настоящем документе термин «аналог или производное липида А» относится к
 молекуле, которая напоминает по структуре и иммунологической активности липид А,
 но не обязательно встречается в природе. Аналоги или производные липида А могут
 быть модифицированы, например, для укорочения или конденсации и/или для замены
 остатков глюкозамина другим остатком аминного сахара, например остатками
 галактозамина, с обеспечением содержания 2-деокси-2-аминоглюконата вместо
 глюкозамин-1-фосфата на восстанавливающем конце, чтобы нести фрагмент
 галактуроновой кислоты вместо фосфата в 4'-положении. Аналоги или производные
 липида А могут быть получены из липида А, выделенного из бактерии, например,
 химическим путем, или синтезированы химическим путем, например, посредством
 первоначального определения структуры предпочтительного липида А и синтеза его
 аналогов или производных. Аналоги или производные липида А также можно
 применять в качестве адъювантов агонистов TLR4 (см., например, Gregg KA et al, 2017,
 MBio 8, eDD492-17, doi: 10.1128:mBio.00492-17).

Например, аналог или производное липида А можно получить посредством деацилирования молекулы липида А дикого типа, например, обработкой щелочью. Аналоги или производные липида А могут быть получены, например, из липида А, выделенного из бактерий. Такие молекулы также могут быть синтезированы химическим путем. Другим примером аналогов или производных липида А являются молекулы липида А, выделенные из бактериальных клеток, несущих мутации, делеции или вставки в ферментах, участвующих в биосинтезе липида А и/или модификации липида А.

MPL и 3D-MPL представляют собой аналоги или производные липида А, которые были модифицированы для снижения токсичности липида А. Липид А, MPL и 3D-MPL имеют сахарный остов, к которому присоединены длинные цепи жирных кислот, причем остов содержит два 6-углеродных сахара, соединенных гликозидной связью, и фосфорильный фрагмент в положении 4. Как правило, от пяти до восьми жирных кислот с длинной цепью (обычно 12–14 атомов углерода) присоединены к основной цепи сахара. Благодаря происхождению из природных источников MPL или 3D-MPL может присутствовать в виде композита или смеси ряда моделей замещения жирных кислот, например гептацильной, гексаацильной, пентаацильной и т. д., с различными длинами жирных кислот. Это также верно и для некоторых других аналогов или производных липида А, описанных в настоящем документе, однако синтетические варианты липида А также могут быть определенными и гомогенными. MPL и его получение описаны, например, в US 4,436,727. 3D-MPL, например, описан в US 4,912,094B1 и отличается от MPL селективным удалением 3-гидроксимиристинового ацильного остатка, который связан посредством сложноэфирной связи с глюкозамином на восстанавливающем конце в положении 3 (сравните, например, структуру MPL в столбце 1 с 3D-MPL в столбце 6 в US 4,912,094B1). В данной области часто применяют 3D-MPL, который иногда называют MPL (например, в первой структуре в таблице 1 в Ireton GC and SG Reed, 2013, см. выше, эта структура обозначена как MPL®, но на самом деле изображает структуру 3D-MPL).

Примеры липида А (аналоги, производные) включают в себя MPL, 3D-MPL, RC529 (например, EP1385541), PET-липид А, GLA (гликопиранозиллипидный адъювант, синтетический дисахаридный гликолипид; например, US20100310602, US8722064), SLA (например, Carter D et al, 2016, Clin Transl Immunology 5: e108 (doi: 10.1038/cti.2016.63), в которой описан структурно-функциональный подход к оптимизации лигандов TLR4 для человеческих вакцин), PHAD (фосфорилированный

гексаацилдисахарид; структура которого такая же, как у GLA), 3D-PHAD, 3D-(6-ацил)-PHAD (3D(6A)-PHAD) (PHAD, 3D-PHAD и 3D(6A)PHAD представляют собой варианты синтетических липидов, см., например, avantilipids.com/divisions/adjuvants, где также представлены структуры этих молекул), E6020 (номер CAS 287180-63-6),
 5 ONO4007, OM-174 и т. п. Примеры химических структур 3D-MPL, RC529, PET-липидов A, GLA/PHAD, E6020, ONO4007 и OM-174 см., например, в таблице 1 в Ireton GC and SG Reed, 2013, выше. Структуру SLA см., например, на Фиг. 1 в Reed SG et al, 2016, Curr Opin Immunol 41: 85-90. В определенных предпочтительных вариантах осуществления адъювант агониста TLR4 содержит аналог или производное липида A,
 10 выбранное из 3D-MPL, GLA или SLA. В определенных вариантах осуществления аналог или производное липида A получают в липосомах.

Примеры адъювантов, содержащих аналог или производное липида A, включают в себя GLA-LSQ (синтетический MPL [GLA], QS21, липиды, приготовленные в виде липосом), SLA-LSQ (синтетический MPL [SLA], QS21, липиды, приготовленные в виде
 15 липосом), GLA-SE (синтетический MPL [GLA], скваленовая эмульсия масло/вода), SLA-SE (синтетический MPL [SLA], скваленовая эмульсия масло/вода), SLA-Nanoalum (синтетический MPL [SLA], соль алюминия), GLA-Nanoalum (синтетический MPL [GLA], соль алюминия), SLA-AF (синтетический MPL [SLA], водная суспензия), GLA-AF (синтетический MPL [GLA], водная суспензия), SLA-алюм (синтетический MPL
 20 [SLA], соль алюминия), GLA-алюм (синтетический MPL [GLA], соль алюминия) и несколько адъювантов серии GSK ASxx, включая AS01 (MPL, QS21, липосомы), AS02 (MPL, QS21, эмульсия масло/вода), AS25 (MPL, эмульсия масло/вода), AS04 (MPL, соль алюминия) и AS15 (MPL, QS21, CpG, липосомы). См., например, WO 2013/119856, WO 2006/116423, US 4,987,237, U.S. 4,436,727, US 4,877,611, US 4,866,034, US
 25 4,912,094, US 4,987,237, US5191072, US5593969, US 6,759,241, US 9,017,698, US 9,149,521, US 9,149,522, US 9,415,097, US 9,415,101, US 9,504,743, Reed G, et al., 2013, выше.

Негликолипидные молекулы также можно использовать в качестве адъювантов-агонистов TLR4, например, синтетические молекулы, такие как неосептин-3, или
 30 природные молекулы, такие как LeIF, см., например, Reed SG et al, 2016, выше.

В одном варианте осуществления композиция по изобретению, содержащая биоконъюгат антигена *E. coli* O18, конъюгированного с белком-носителем, дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный конъюгат, содержащий О-антигенный полисахарид *E. coli*, ковалентно связанный с белком-

носителем. Один или более дополнительных биоконъюгатов О-антигенных полисахаридов *E. Coli*, конъюгированных с белком-носителем, предпочтительно являются биоконъюгатами О-антигенных полисахаридов *E. coli* серотипов, отличных от O18, или более предпочтительно, отличных от O18A. В предпочтительном варианте осуществления один или более дополнительных конъюгатов или биоконъюгатов содержат по меньшей мере одно, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или все девять О-антигенных полисахаридов, выбранных из группы, состоящей из серотипов *E. coli* O1, O2, O4, O6, O8, O15, O16, O25 и O75.

В предпочтительном варианте осуществления один или более дополнительных О-антигенов *E. coli* в дополнительном (-ых) конъюгате (-ах) выбирают из группы, состоящей из антигенного полисахарида *E. coli* O1 (например, антигенный полисахарид O1A), антигенного полисахарида *E. coli* O2, антигенного полисахарида *E. coli* O4 (например, глюкозилированный антигенный полисахарид *E. coli* O4), антигенного полисахарида *E. coli* O6 (например, антигенный полисахарид O6A), антигенного полисахарида *E. coli* O8, антигенного полисахарида *E. coli* O15, антигенного полисахарида *E. coli* O16, антигенного полисахарида *E. coli* O25 (например, антигенный полисахарид O25A или O25B, предпочтительно антигенный полисахарид O25B) и антигенного полисахарида *E. coli* O75. Предпочтительно каждый из дополнительных О-антигенных полисахаридов ковалентно связан с белком-носителем. В определенных вариантах осуществления каждый из белков-носителей, т. е. белок-носитель для каждого конъюгата, представляет собой белок-носитель ЕРА. Предпочтительно один или более, предпочтительно все дополнительные конъюгаты представляют собой биоконъюгаты.

Используемый в настоящем документе термин «O18» относится к антигену *E. Coli* O18 (серотип *E. coli* O18) и может представлять собой антиген O18A, O18B, O18A1 или O18B1 (каждый из четырех подсеротипов серотипа *E. coli* O18), а в предпочтительных вариантах осуществления O18 относится к O18A. Антигенный полисахарид O18A может содержать структуру формулы (O18A), как показано в таблице 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, например 3–50, предпочтительно 5–40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Термин «O1A» относится к антигену *E. coli* O1A (субсеротип серотипа *E. coli* O1). Термин «O2» относится к антигену *E. Coli* O2 (серотип *E. coli* O2). Термин «O4» относится к антигену *E. coli* O4 (серотип *E. coli* O4), который может включать или не включать в себя боковое ответвление глюкозы (называемое глюкозилированным антигенным

полисахаридом O4 (O4-Glc+) и негликозилированным антигенным полисахаридом O4 (O4-Glc-) соответственно; в предпочтительных вариантах осуществления O4 представляет собой O4-Glc+). Термин «O6A» относится к антигену *E. coli* O6A (субсеротип серотипа *E. coli* O6). Термин «O8» относится к антигену *E. coli* O8 (серотип *E. coli* O8). Термин «O15» относится к антигену *E. coli* O15 (серотип *E. coli* O15). Термин «O16» относится к антигену *E. coli* O16 (серотип *E. coli* O16). Термин «O25B» относится к антигену *E. coli* O25B (субсеротип серотипа *E. coli* O25). Термин «O75» относится к антигену *E. coli* O75 (серотип *E. coli* O75).

Структуры O-антигенных полисахаридов *E. coli*, упомянутые в настоящей заявке, показаны ниже в таблице 1. Показана одна единица повтора для каждого O-антигенного полисахарида *E. coli*.

Таблица 1. Структуры O-антигенных полисахаридов *E. coli*

O-антигенный полисахарид <i>E. coli</i>	Структура единицы повтора ¹
Негликозилированный антигенный полисахарид O4 (O4-Glc-)	$[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-FucpNAc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow]_n$
Гликозилированный антигенный полисахарид O4 (O4-Glc+)	$\begin{array}{c} \alpha\text{-D-Glcp} \\ \downarrow \\ 1 \\ \downarrow \\ 3 \\ [\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-FucpNAc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow]_n \end{array}$
Антигенный полисахарид O1A (O1A)	$\begin{array}{c} [\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow]_n \\ \uparrow \\ 2 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta\text{-D-ManpNAc} \end{array}$
Антигенный полисахарид O2 (O2)	$\begin{array}{c} [\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow]_n \\ \uparrow \\ 2 \\ \uparrow \\ 1 \\ \alpha\text{-D-Fucp3NAc} \end{array}$

Антигенный полисахарид O6A (O6A)	$\begin{array}{c} [\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpNAc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Manp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Manp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow]_n \\ \uparrow \\ 2 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta\text{-D-Glcp} \end{array}$
Антигенный полисахарид O8 (O8)	$\alpha\text{-D-Manp3Me-(1}\rightarrow [3)\text{-}\beta\text{-D-Manp-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow]_n$
Антигенный полисахарид	$[\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-FucpNAc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow]_n$

O15 (O15)	
Антигенный полисахарид O16 (O16)	$[\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow)]_n$ $\begin{array}{c} 2 \\ \uparrow \\ \text{Ac} \end{array}$
Антигенный полисахарид O18A (O18A)	$[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow)]_n$ $\begin{array}{c} 3 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta\text{-D-GlcpNAc} \end{array}$
Антигенный полисахарид O18B (O18B)	$[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow)]_n$ $\begin{array}{c} 3 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta\text{-D-Glcp} \end{array}$

Антигенный полисахарид O18A1 (O18A1)	$[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow)]_n$ $\begin{array}{c} \alpha\text{-D-Glcp} \\ \downarrow \\ 6 \\ 3 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta\text{-D-GlcpNAc} \end{array}$
Антигенный полисахарид O18B1 (O18B1)	$[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow)]_n$ $\begin{array}{c} \alpha\text{-D-Glcp} \\ \downarrow \\ 4 \\ 3 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta\text{-D-Glcp} \end{array}$
Антигенный полисахарид O25B (O25B)	$[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow)]_n$ $\begin{array}{cc} \beta\text{-D-Glcp} & \\ \downarrow & \\ 6 & \\ 3 & \uparrow \\ \uparrow & \text{Ac} \\ \alpha\text{-L-Rhap} & \end{array}$

Антигенный полисахарид O75 (O75)	$[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow)]_n$ $\begin{array}{c} \beta\text{-D-Manp} \\ \downarrow \\ 4 \end{array}$
--	--

¹ Каждое n независимо представляет собой целое число от 1 до 100, например 1–50, 1–40, 1–30, 1–20 и 1–10, 3–50, 3–40, например по меньшей мере 5, например 5–40, например 7–30, например 7–25, например 10–20

Все моносахариды, описанные в настоящем документе, имеют общепринятое значение, известное в данной области техники. Моносахариды могут иметь конфигурацию D или L. Если D или L не указано, следует понимать, что сахар имеет конфигурацию D. Моносахариды обычно называют сокращениями, общеизвестными и используемыми в данной области. Например, Glc относится к глюкозе; D-Glc относится к D-глюкозе; и L-Glc относится к L-глюкозе. Другие общие сокращения моносахаридов включают: Rha, рамнозу; GlcNAc, N-ацетилглюкозамин; GalNAc, N-ацетилгалактозамин; Fuc, фукозу; Man, маннозу; Man3Me, 3-O-метилманнозу; Gal, галактозу; FucNAc, N-ацетилфукозамин; и Rib, рибозу. Суффикс «f» относится к фуранозе, а суффикс «p» относится к пиранозе.

Композиция, содержащая биоконъюгат белка-носителя, ковалентно связанного с антигенным полисахаридом *E. coli* O18, в соответствии с данным изобретением, может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный конъюгат белка-носителя, ковалентно связанный с О-антигеном *E. coli*, и в определенных вариантах осуществления по меньшей мере один дополнительный конъюгат содержит О-антигенный полисахарид *E. coli*, который выбран из группы, состоящей из антигенного полисахарида *E. coli* O1A, антигенного полисахарида *E. coli* O2, антигенного полисахарида *E. coli* O4, антигенного полисахарида *E. coli* O6A, антигенного полисахарида *E. coli* O8, антигенного полисахарида *E. coli* O15, антигенного полисахарида *E. coli* O16, антигенного полисахарида *E. coli* O25B и антигенного полисахарида *E. coli* O75. Такие композиции могут быть получены путем сочетания конъюгатов для получения поливалентной композиции конъюгата. Предпочтительно один или более и предпочтительно все дополнительные конъюгаты также представляют собой биоконъюгаты.

В определенных вариантах осуществления антигенный полисахарид O1A (например, в выделенной форме или как часть гликоконъюгата, предпочтительно биоконъюгат) присутствует в (фармацевтической) композиции, как описано в настоящем документе (например, композиции, содержащей биоконъюгат *E. coli* O18, полученный способом, описанным в настоящем документе). Антигенный полисахарид O1A может содержать структуру формулы (O1A), как показано в таблице 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, например 3–50, предпочтительно 5–40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Предпочтительно, антигенный полисахарид O1A является частью конъюгата, более предпочтительно биоконъюгата, и ковалентно связан с белком-носителем, например ЕРА.

В определенных вариантах осуществления антигенный полисахарид O2 (например, в выделенной форме или как часть гликоконъюгата, предпочтительно биоконъюгат) присутствует в (фармацевтической) композиции, как описано в настоящем документе (например, композиции, содержащей биоконъюгат *E. coli* O18, полученный способом, описанным в настоящем документе). Антигенный полисахарид O2 может содержать структуру формулы (O₂), как показано в таблице 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, например 3–50, предпочтительно 5–40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Предпочтительно, антигенный полисахарид O2 является частью конъюгата, более предпочтительно биоконъюгата, и ковалентно связан с белком-носителем, например ЕРА.

В определенных вариантах осуществления антигенный полисахарид O4 (например, в выделенной форме или как часть гликоконъюгата, предпочтительно биоконъюгат) присутствует в (фармацевтической) композиции, как описано в настоящем документе (например, композиции, содержащей биоконъюгат *E. coli* O18, полученный способом, описанным в настоящем документе). Известно, что структурная модификация О-антигена существует в пределах серотипа *E. coli* O4. В частности, некоторые серотипы O4 экспрессируют модифицированный О-антиген, имеющий разветвленный глюкозный остаток. Используемый в настоящем документе термин «глюкозилированный антиген O4», «глюкозилированный антигенный полисахарид O4», «глюкозный разветвленный O4», «антигенный полисахарид O4-Glc+», «Glc+ O4» и «антиген O4-Glc+» относятся к антигену O4, имеющему глюкозную ветвь. Некоторые серотипы O4 имеют антиген O4, не содержащий разветвленной глюкозы, и в настоящем документе он обозначается как «неглюкозилированный антиген O4», «неглюкозилированный антигенный полисахарид O4», «антиген O4-Glc-» или «O4-Glc-». При упоминании в данном документе «антигена O4» речь может идти либо об антигене O4-Glc+, либо об антигене O4-Glc-. В предпочтительных вариантах осуществления O4 относится к антигену O4-Glc+. Структуры неглюкозилированного антигена *E. coli* O4 и глюкозилированного антигена *E. coli* O4 представлены в формулах (O4-Glc-) и (O4-Glc+) соответственно, в табл. 1, где n — целое число от 1 до 100, например от 3 до 50, предпочтительно от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Способы специфического получения биоконъюгатов O4-Glc+ описаны в публикации WO2020/191082A1, которая полностью включена в настоящий документ. Предпочтительно, антигенный полисахарид O4 является частью конъюгата, более

предпочтительно биоконъюгата, и ковалентно связан с белком-носителем, например ЕРА.

В определенных вариантах осуществления антигенный полисахарид О6А (например, в выделенной форме или как часть гликоконъюгата, предпочтительно биоконъюгат) присутствует в (фармацевтической) композиции, как описано в настоящем документе (например, композиции, содержащей биоконъюгат *E. coli* O18, полученный способом, описанным в настоящем документе). Антигенный полисахарид О6А может содержать структуру формулы (О6А), как показано в таблице 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, например 3–50, предпочтительно 5–40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Предпочтительно, антигенный полисахарид О6А является частью конъюгата, более предпочтительно биоконъюгата, и ковалентно связан с белком-носителем, например ЕРА.

В определенных вариантах осуществления антигенный полисахарид О8 (например, в выделенной форме или как часть гликоконъюгата, предпочтительно биоконъюгат) присутствует в (фармацевтической) композиции, как описано в настоящем документе (например, композиции, содержащей биоконъюгат *E. coli* O18, полученный способом, описанным в настоящем документе). Антигенный полисахарид О8 может содержать структуру формулы (О8), как показано в таблице 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, например 3–50, предпочтительно 5–40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Предпочтительно, антигенный полисахарид О8 является частью конъюгата, более предпочтительно биоконъюгата, и ковалентно связан с белком-носителем, например ЕРА.

В определенных вариантах осуществления антигенный полисахарид О15 (например, в выделенной форме или как часть гликоконъюгата, предпочтительно биоконъюгат) присутствует в (фармацевтической) композиции, как описано в настоящем документе (например, композиции, содержащей биоконъюгат *E. coli* O18, полученный способом, описанным в настоящем документе). Антигенный полисахарид О15 может содержать структуру формулы (О15), как показано в таблице 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, например 3–50, предпочтительно 5–40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Предпочтительно, антигенный полисахарид О15 является частью конъюгата, более предпочтительно биоконъюгата, и ковалентно связан с белком-носителем, например ЕРА.

В определенных вариантах осуществления антигенный полисахарид О16 (например, в выделенной форме или как часть гликоконъюгата, предпочтительно

биоконъюгат) присутствует в (фармацевтической) композиции, как описано в настоящем документе (например, композиции, содержащей биоконъюгат *E. coli* O18, полученный способом, описанным в настоящем документе). Антигенный полисахарид O16 может содержать структуру формулы (O16), как показано в таблице 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, например 3–50, предпочтительно 5–40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Предпочтительно, антигенный полисахарид O16 является частью конъюгата, более предпочтительно биоконъюгата, и ковалентно связан с белком-носителем, например ЕРА. Конъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O16, ковалентно связанный с белком-носителем, может иметь определенную степень ацетилирования в положении 2 сахара L-Rha. Степень этого О-ацетилирования антигенного полисахарида O16 в конъюгате предпочтительно составляет по меньшей мере 30%, предпочтительно по меньшей мере 50%, например по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100%.

В определенных вариантах осуществления антигенный полисахарид O25B (например, в выделенной форме или как часть гликоконъюгата, предпочтительно биоконъюгат) присутствует в (фармацевтической) композиции, как описано в настоящем документе (например, композиции, содержащей биоконъюгат *E. coli* O18, полученный способом, описанным в настоящем документе). Антигенный полисахарид O25B может содержать структуру формулы (O25B), как показано в таблице 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, например 3–50, предпочтительно 5–40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Предпочтительно, антигенный полисахарид O25B является частью конъюгата, более предпочтительно биоконъюгата, и ковалентно связан с белком-носителем, например ЕРА. Аналогично антигенному полисахариду O16, как описано выше, конъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O25B, ковалентно связанного с белком-носителем, может иметь определенную степень ацетилирования в положении 2 сахара L-Rha. Степень этого О-ацетилирования антигенного полисахарида *E. coli* O25B в конъюгате предпочтительно составляет по меньшей мере 30%, предпочтительно по меньшей мере 50%, например по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100%.

В определенных вариантах осуществления антигенный полисахарид O75 (например, в выделенной форме или в составе гликоконъюгата, предпочтительно биоконъюгата) присутствует в (фармацевтической) композиции, как предложено в данном документе (например, в композиции, содержащей биоконъюгат *E. coli* O18, полученный способом, описанным в настоящем документе). Антигенный полисахарид

O75 может содержать структуру формулы (O75), как показано в таблице 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, например 3–50, предпочтительно 5–40, например 7–25, например 10–20. Предпочтительно, антигенный полисахарид O75 является частью конъюгата, более предпочтительно биоконъюгата, и ковалентно связан с белком-носителем, например ЕРА.

В определенных вариантах осуществления композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит биоконъюгат, содержащий белок-носитель, ковалентно связанный с антигенным полисахаридом *E. coli* O18 в соответствии с изобретением и дополнительно содержит один или более дополнительных конъюгатов, содержащих белок-носитель, ковалентно связанный с О-антигенным полисахаридом *E. coli*, предпочтительно от 4 до 25 таких дополнительных конъюгатов. Предпочтительно дополнительные конъюгаты содержат один или более из О-антигенных полисахаридов *E. coli*, как описано выше, наиболее предпочтительно по меньшей мере O25B, O1A, O2 и O6. Особенно предпочтительными являются композиции, которые содержат по меньшей мере 7, предпочтительно по меньшей мере 8 дополнительных конъюгатов, а предпочтительно некоторые и наиболее предпочтительно все из этих дополнительных конъюгатов представляют собой биоконъюгаты.

В предпочтительных вариантах осуществления композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит по меньшей мере антигенные полисахариды *E. coli* O1A, O2, O4 (предпочтительно глюкозилированный O4), O6A, O15, O16, O18 (предпочтительно O18A), O25B и O75, предпочтительно конъюгаты антигенных полисахаридов O1A, O2, глюкозилированного O4, O6A, O15, O16, O18A, O25B и O75, каждый из которых независимо ковалентно связан с белком-носителем, например ЕРА (т. е. по меньшей мере 9-валентная композиция). В определенных вариантах осуществления такие композиции дополнительно содержат антигенный полисахарид *E. coli* O8, предпочтительно в форме конъюгата, предпочтительно биоконъюгата. В определенных вариантах осуществления такие композиции (с антигенным полисахаридом O8 или без него) содержат дополнительные О-антигенные полисахариды *E. coli* из других серотипов, предпочтительно конъюгированные с белком-носителем, предпочтительно биоконъюгаты, например из 2–10 дополнительных серотипов. В определенных вариантах осуществления предложены фармацевтические композиции, содержащие по меньшей мере девять биоконъюгатов, причем каждый биоконъюгат содержит белок-носитель, ковалентно связанный с О-антигенным полисахаридом *E. coli* из другого серотипа, причем серотипы включают O18A (и

биоконъюгат O18A представляет собой биоконъюгат в соответствии с настоящим изобретением, который был получен с использованием способа в соответствии с настоящим изобретением), O1A, O2, O4-Glc+, O6A, O15, O16, O25B и O75. В определенных вариантах осуществления белок-носитель представляет собой ЕРА, имеющую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 3.

Композиции в соответствии с изобретением могут необязательно содержать или комбинироваться с дополнительными белками, углеводами и липосахаридами, к которым желателен иммунный ответ.

В другом варианте осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции по изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

В дополнительном аспекте изобретение относится к применению фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, в качестве лекарственного средства для индуцирования иммунного ответа против *E. coli*.

В настоящем документе термины «иммуноген», «иммуногенный» или «антиген» применяются взаимозаменяемо для описания молекулы, к которой может вырабатываться иммунологический ответ при введении реципиенту отдельно, в сочетании с адъювантом или на выделенной несущей среде.

В настоящем документе термин «иммунологический ответ» или «иммунный ответ» на антиген или композицию относится к развитию у субъекта гуморального и/или клеточного иммунного ответа на конкретный антиген или на антиген, присутствующий в композиции.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, предназначена для применения с целью профилактики или лечения заболевания, вызванного инфекцией *E. coli*. В предпочтительном варианте осуществления заболевание, вызванное инфекцией *E. coli*, представляет собой вызванное инвазивной внекишечной патогенной инфекцией *E. coli* (ExPEC) заболевание (IED).

В настоящем документе термин «внекишечная патогенная *E. coli*» или «ExPEC» относится к генетически родственным патогенным штаммам *E. coli*, которые обычно проникают, колонизируют и вызывают заболевание в областях организма за пределами желудочно-кишечного тракта. Бактерии ExPEC включают уропатогенную (UPEC) *E. coli*, *E. coli*, вызывающую менингит новорожденных, *E. coli*, ассоциированную с септициемией (SePEC), адгезивно-инвазивную (AIEC) *E. coli* и птичью патогенную *E. coli* (APEC). Заболевания, связанные с инфекциями ExPEC или ExPEC, включают, но

не ограничиваются ими, инфекцию мочевыводящих путей (ИМП), инфекцию в месте хирургического вмешательства, бактериемию, инфекцию брюшной полости или таза, такую как внутрибрюшная инфекция (ВБИ), пневмонию, нозокомиальную пневмонию, остеомиелит, воспаление подкожной клетчатки, пиелонефрит, раневую инфекцию, менингит, неонатальный менингит, перитонит, холангит, инфекции мягких тканей, пиомиозит, септический артрит и сепсис.

В дополнительном аспекте изобретение относится к способу профилактики или лечения заболевания, вызванного инфекцией *E. coli*, в частности вызванного инвазивной внекишечной патогенной *E. coli* (ExPEC) заболевания (IED), у нуждающегося в этом субъекта, причем способ включает введение эффективного количества фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе.

В настоящем документе термин «эффективное количество» относится к количеству активного ингредиента или компонента, которое вызывает у пациента необходимый биологический или медицинский ответ. «Эффективное количество» может быть определено эмпирически и обычным образом в зависимости от заявленной цели. Например, для определения диапазона оптимальной дозы могут необязательно быть использованы анализы *in vitro*.

В настоящем документе термин «субъект» или «пациент» означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека, которое будет или было подвергнуто вакцинации способом или композицией в соответствии с вариантом осуществления изобретения. В настоящем документе термин «млекопитающее» охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают в себя, без ограничений, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, людей и т. п., наиболее предпочтительно человека. В определенных вариантах осуществления субъект представляет собой взрослого человека. В настоящем документе термин «взрослый человек» относится к человеку в возрасте 18 лет или старше. В определенных вариантах осуществления субъект представляет собой одно или более из следующего: (i) женщина в возрасте от около 16 до около 50 лет, например от около 16 до около 35 лет;

(ii) взрослый человек старше 50 лет, или старше 55 лет, или старше 60 лет, или старше 65 лет;

(iii) человек, страдающий от рецидивов ИМП;

(iv) человек, имеющий или подверженный риску получить бактериемию или сепсис, вызванный *E. coli*;

- (v) человек, находящийся в состоянии, требующем использования катетера;
- (vi) человек, которому проводят запланированное хирургическое вмешательство;
- (vii) женщина в постменопаузе или
- (viii) человек, страдающий диабетом.

В еще одном аспекте изобретение также относится к применению фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, для изготовления вакцины или лекарственного средства для профилактики или лечения заболевания, вызванного инфекцией *E. coli*, в частности вызванного инвазивной внекишечной патогенной *E. coli* (ExPEC) заболевания (IED).

В разделе «Предпосылки создания изобретения» и в тексте настоящей заявки приведены цитаты или описания различных публикаций, статей и патентов; каждая из этих ссылок полностью включена в настоящее описание путем ссылки. Описание документов, актов, материалов, устройств, изделий и т. п., которые были включены в настоящее описание, приведено в качестве контекста для изобретения. Такое описание не является допущением того, что любой из таких источников или все такие источники являются частью предшествующего уровня техники в отношении каких-либо описываемых или заявленных изобретений.

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Таблица 2. Последовательности

Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO:
Полимераза Wzy O18 (аминокислотная последовательность)	MIYILTLTLLLVIAIMFSLGTSRITSPLPLHFLPWLLTLIVGISNYDQFY EFNERSFYSLLIWFTVIFIFYFIGELVNYKRENINVYGLSHIKYECKKYW IIVIPISLYTIFEIYMVGMMGGADGFFLNRLANTLEGYTGKKFILMPAVYP LMMAMFAIVCLTKTSKLNKYSIYFWMFLY CIGTMGKFSILTPILTYLIY DFKHRLKVKKTIKFTLLIILALTLHFTRMAENDHSTFLSILGLYIYSPIAL GQLNEVNSSHGEYTRFIYAITNKIGLIKELPVNTILDYSYVPVPTNVYT ALQPFYQDFGYTGIFGAVLYGLIYVSLYTAGVRGNNTQALLIYALFSVS SATAFFAETLVNLAGNVMLVLCTILLWRFTVICKPVQ	1
Полимераза Wzy O18 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGATATATATATTAACCTTTAACTCTTCTTAGTTATAGCCATAATG TTTTCTCTTCTCGGCACAAAAAGTAGGATCACATCTCCATTACCTTTG CATTTTTTACCATGGTTACTAACTTTAATTGTCTGGGATAAGTAATTAC GATCAATTTTACGAGTTTAATGAAAGAAGCTTTTACTCTTTGTTGATT TGGTTTACAGTTATTTTATATTTTATTTTCATAGGGGAAGCTGTTAAT TATAAACGTGAAAATATAAATGTTTATTATGGTCTTTACATATTA ATATGAATGTAAAAAATATTGGATCATTGTCTATCCCAATTTTATTAT ATACCATTTTCGAAATATATATGGTTGGTATGGGGGAGCAGATGGA TTCTTTCTCAATTTACGTCTTGCAATACATTGGAGGGCTATACGGGT AAAAAATTTATCTTAATGCCTGCTGTATATCCTCTAATGATGGCTAT GTTTCGCAATTGTTTGTCTAACAAAACTTCCAAATTAATAAATACT CCATTTATTTCTGGATGTTTTGTATTGTATTGGCACAATGGGAAAAT TTTCAATATTAACGCCAATATTGACATATTTAATTATTTATGACTCA AACATAGATTAAAAAGTAAAAAACAATAAAGTTTACATTGTTGAT AATTATATTAGCTTTAACTTTGCATTTTACACGTATGGCTGAGAATG ACCACTCAACATTTTTATCTATTTAGGGCTCTATATTATTCACCAA TAATTGCTTTAGGCCAGTTGAATGAAGTAAATAGTAGTCATTTTGGT	2

Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO:
	GAGTATACGTTTATAGATTCATATATGCTATAACTAATAAAAATTGGCCT TATTAAGAATTGCCAGTAAATACTATTCTTGACTATTTCATACGTTCC TGACCAACAAATGTATATACTGCACTTCAACCATTTTACCAGGATT TTGGTTATACTGGCATCATATTTGGAGCAGTATTATACGGACTAATA TATGTGAGTTTATACACGGCCGGTGTTCGTGGAAATAATACACAGGC ATTACTGATTTACGCATTGTTTTCAGTTAGCAGTGCAACGGCTTTCTT CGCTGAAACGCTAGTAACGAATTTAGCTGGAAATGTGATGTTAGTAT TATGTACCATCTTACTATGGCGATTTACAGTAATATGCAAAACCAGTA CAGTAA	
Детоксифицированный белок ЕРА, содержащий 4 оптимизированные последовательности N- гликозилирования	GSGGGDQDATGSGGGKLAEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRRSRMS VDPADTNGQGVLYHYSMVLEGGNDALKLAIDNALSITSDGLTIRLEGG VEPNKPVRYSTRQARGSWSLNWLVPIGHEKPSNIKVFIHELNAGNQLS HMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAISHAGVSVV MAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLDPLDGVYNYLAQQRCLDDTWE GKIYRVLAGNPAKHDLIDKNNNSTPTVISHRLHFPEGGSLAALTAHQ CHLPLEAFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQV IRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLALTLAAESERFVRQGTGND GAASADVSLTCPVAKDQNRKGEACGADSGDALLERNYPTGAFL GDGGDVFSSTRGTQNWTVRLLQAHRLQLEERGYVFGYHGTFLAAQ SIVFGGVRARSQDLDAIWGRFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGIRNG ALLRVYVPRWSLPGFYRTGLTLAAPEAAEVERLIGHPLPLRLDAITGPE EEGGRVTILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALP DYASQPGKPPREDLKLGSGGDQDAT	3
Оптимизированная консенсусная последовательность N- гликозилирования	Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты, за исключением Pro	4
Генный кластер O18A	ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTTGGGATGCA TATGTTGCCTGCCACTAAGGCGATTCCCAAAGAGATGCTACCGATCG TCGACAAGCCAATGATTCAGTACATCGTTGACGAGATTGTGGCTGCA GGGATCAAAGAAATCCTCTGCTGTAACCTCACGCGTCCAAGAACGCG TCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAATTAGAATCTCTCCTTGAA CAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATTGCG CGCCGGGCGTGACAATTATGAACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGG TTTGGGCCACTCCATTTTATGTGCACGACCTGCCATTGGTGACAATC CATTGTCTGCTGGTGCTGCCAGACGTTGTGATCGACGACGCCAGCGCC GACCCGCTGCGCTACAACCTTGCTGCCATGATTGCGCGCTTTAACGA AACTGGCCGCGAGCCAGGTTCTGGCAAAACGCATGCCGGGCGATCTC TCTGAATACTCCGTCATCCAGACTAAAGAACCGCTTGATCGCGAAGG TAAAGTCAGCCGCAATTGTTGAATTTATCGAAAACCGGATCAGCCGC AGACCCTGGACTCAGACATCATGGCTGTAGGGCGTTATGTGCTTTCT GCCGATATTTGGCCTGAACTGGAGCGTACTCAACCTGGAGCATGGG GACGTATTCAGTTGACTGATGCCATTGCTGAGTTGGCAAAAAAACAA GCAGTTGACGCAATGCTGATGACTGGGGACAGTTACGACTGCGGAA AGAAAATGGGTTATATGCAAGCGTTTGTGAAGTATGGGCTGCGTAA CCTAAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAGGGATTGAGAAGCTGTTA AGCGAATAATGAAAATCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAAT TATAACGGCAGTGAAGATTAGCGGCGAAAGTAATTTGTTGCGAATTT TCCTGCCGTTGTTTTATATAAACAATCAGAATAACAACGAGTTAGCA ACAGGATTATCGTCAAAGTTTTCCAGGATTTTCCTTGTTTCCAGAGC GGATTGGTAAGACAATTAGCTTCTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAG TGGGTAACACTCGTCACATCGTAGGCATGCATGCAGTGCTCTGGTAG CTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCAATTAACCTCTATTAATCAA ACTGAGAGCCGCTTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATA AATTAAGTGAATACTTGTACTGGTGGCGCAGGATTTATTGGTTC TGCTGTAGTTCGTCACATTATAAATGATACGCAGGATAGTGTGTTA ATGTCGATAAATTAACGTACGCCGGAACCTGGAATCACTTGAGAT GTTTCTGATTCTGAACGCTATTTCTTTGAACATGCGGATATTTGTGAT GCAGCTGCAATGGCACGGATTTTTGCTCAGCATCAGCCGGATGCAGT GATGCACCTGGCAGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTCAATTACAGGCC CTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTTGGTACTTATGTCCTTTTAG AAGCGGCTCGGAATTACTGGTCTGCACTTGATGGCGACAAGAAAAA CAGCTTCCGTTTTTCATCATATTTCTACTGACGAAGTCTATGGTGATT GCCTCATCTGACGAGGTAAATAATAAAGAAGGATTACCTTATTTA CTGAGACGACAGCCTACGCACCAAGCAGCCCTTATTCTGCATCAAA	5

Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO:
	AGCGTCCAGCGATCATTTAGTCCGTGCGTGGAACGTACCTATGGTT TACCGACCATTGTGACTAATTGCTCTAACAATTATGGTCCTTATCATT TCCCGGAAAAATTGATTCCATTGGTTATTCTGAATGCTCTGGAAGGT AAAGGATTACCTATTTATGAAAAAGGCGATCAAATTCGCGACTGGCT GTATGTTGAAGATCATGCGCGTGCGTTATATACCGTCGTAACCGAAG GTAAAGCGGGTGAAACTTATAACATTGGTGGACACAACGAAAAGAA AAACATCGATGTAGTGCTCACTATTTGTGATTTGTTGGATGAGATTG TCCCGAAAGAGAAATCTTACCGCGAGCAAATTACTTATGTTGCCGAT CGTCCGGGACACGATCGACGTTATGCGATTGATGCTGAGAAGATTG GTCCGAATTGGGATGGAACCACAGGAAACGTTTGAGAGCGGGAT TCGTAAAACTGTGGAATGGTATCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATA ATGTGAAAAGTGGTGCCTATCAATCGTGGATTGAACAGAACTATGA GGGCCGCCACTAATGAATATCCTCCTTTTTGGCAAAACAGGGCAGGT TGGTTGGGAACACAGCGTGCTCTGGCACCTCTGGGTAATTTGATTG CTCTTGATGTTCACTCCACTGATTACTGTGGTGATTTTAGTAACCTG AAGGTGTGGCTGAAACCGTTAGAAGCATTCCGGCCTGATATTATTGTC AACGCAGCCGCTCACACCGCAGTAGACAAAGCAGAATCAGAAACCGG AGTTTGCACAATTACTGAACGCGACGAGTGTGAAGCGATCGCGAA AGCAGCCAATGAAGTCGGCGCTTGGGTTATTCACTACTCTACTGACT ACGTATTTCCGGGGACCGGTGAAATACCATGGCAGGAGGAGGATGC AACCGCACCGCTAAATGTTTACGGTGAAACCAAGTTAGCAGGAGAA AAAGCATTACAAGAGCATTGTGCGAAGCACCTATTTTCCGGACCAG CTGGGTCTATGCAGGTAAAGGAAATAACTTCGCCAAAACGATGTTG CGTCTGGCAAAAGAGCGTGAAAGAATTAGCCGTTATTAATGATCAGTT TGGTGCGCCAACTGGCGCAGAGTTGCTGGCTGATTGTACGGCACATG CCATTCTGTGTGGCACTGAATAAACCGGAAGTCGCAGGTTTGTACCAT CTGGTAGCCAGTGGTACCACAACCTGGCACGATTATGCTGCGCTGGT TTTTGAAGAGGCGCGCAAGCAGGCATTCCCCTTGCACTCAACAAG CTCAACGCAGTACCAACAACAGTCTATCCTACACCAGCTCGTCGTCC ACATAACTCTCGCCTTAATACAGAAAAATTTAGCAGAACTTTGCGC TTGTCTTGCTGACTGGCAGGTTGGTGTGAAACGCATGCTCAACGAA TTATTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCTGAT GGTGGAACAAGATGAATTAAGGAATGATGGAATGAAAACGCGTA AAGGTATTATTTTAGCGGGTGGTTCTGGTACACGTCTTTATCCTGTGA CTATGGCTGTCAGTAAACAGCTGTTACCGATTATGATAAACCGATG ATCTATTACCCGCTCTCTACACTGATGTTGGCGGGTATTCGCGATATT TTGATTATCAGCACGCCACAGGATACTCCTCGTTTTCAACAACCTGCT GGGTGATGGGAGCCAGTGGGGGCTAAATCTTCACTACAAAGTGCAA CCGAGTCCGGATGGTCTTTCGCGAGGCATTATCATCGGTGAAGATT TATCGGTGGTGATGATTGTGCTTTGGTACTTGGTGATAATATCTTCTA CGGTCACGACCTGCCTAAGTTAATGGATGCCGCTGTTAACAAGAA AGTGGTGCAACGGTATTTGCCTATCACGTTAATGATCCTGAACGCTA TGGTGTGCTTGAGTTTGATAAAAACGGTACGGCAATTAGCCTCGAAG AAAAACCGCTACAACCAAAAAGTAATTATGCAGTAACCGGGCTTTA TTTCTATGATAACTACGTTGTGGAATGGCGAAAAATCTTAAGCCTT CTGCCGCGGTGAACTGGAAATTACCGATTAATACCGTATTATATG GAACAGGGGCATTTATCTGTTGCCATGATGGGACGTGGTTATGCATG GCTGGACACGGGGACACATCAGAGTCTTATTGAAGCAAGCAACTTC ATTGCCACCATTGAAGAGCGCCAGGGACTAAAGGTTTCCTGCCAG AAGAAATTGCTTATCGTAAAGGATTTATTGACGCAGAGCAGGTTAA GGTATTAGCCGAACCGCTGAAGAAAAACGCTTATGGTCAGTATTTGC TGAAAATGATTAAGGTTAGTAATAAAATGAATGTTATTAACACAG AAATTCCAGACGTACTGATTTTTGAACCGAAAGTTTTTGGTGACGAG CGCGGTTTTCTTTTTGAAAGCTATAACCAGAGGGTTTTTGAGGAAGC TGTAGGTCGCAAGTTGAGTTTGTTTCAGGATAACCATTCTAAATCGA GAAAAGGAGTATTGCGGGGATTGCATTATCAATTAGAGCCGTATGC GCAAGCAAACTTGTGCGTTGCATTGAGGGTGAAGTATTTGATATTG CTGTAGATATACGGAAGTCATCTCCATTTTTTGGTAAATGGGTTGGT GTAACATTATCCGCTGAAAATAAACGTCAATTATGGATCCCTGAAGG GTTTGCTCATGGTTTTGTGGTGATTAGTGATACTGCGGAATTTGTCTA TAAAACGAACAATTATTACAGTCAACAAGCAGAGCGAAGCATAATT TTTGATGATAAAGACTTAGGGATTGCTTGGCCATTGAATACTCATT TATTCTTTCAGAAAAAGATTTAAATGCGCCAACATTTAAGAAAATAT CGAGTAATGAGTATTTTAAATGAGTTTAAATCAAAAACAGTTTTTGG ACCTTTGCGGGTATGTACTTCCAGCTATTGTGACACTACCAGCTTTG	

Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO:
	GGTATTATGGGGCGAAAATTAGGCCCGAGAATTATTTGGTGTATTAC TTTGGCATTAGCTGTTGTGGGTTATGCAAGCATTTTTGATGCAGGCCT TACTCGCGCAGTGATACGAGAAGTCGCAATTGAAAAAGATAATGAA GAAAATAAGTTGAAAATTATTTCTTCAGCGACAGTTGTAATTATTTA TTTGAGTTTGGCCGCCTCACTCTTATTATTTTTTTTTAGTGGTCATATC GCATTGCTACTGAACATTAGTGAGACTTTTTTTCATAATGTAAGTGTC TCGCTTAAAATTCTCGCAGCATCCATACCATTATTTTTGATTACTCAA ATATGGTTGTCAATTTAGAAAGGTGAAGAAAAGATTGGTTTACTTAA TATCTACAAATCAATTACGGGAGTGATATTAGCAATCTCACCGGCAT TATTTATACTTATTAACCCCTCTTTGATGTATGCGATAATAGGCTTAG TTCTAGCAAGGTTTTATGTTTTATTTTGGCTTTTATAATTTGTCACG ATAAAGTGCTTAAAGCTAACTAACAATCGATATACCAACAATTAA AAGATTGTTTATGTTCCGGTGGTGGATTACAGTAAGTAATATCATCA GCCCTGTGCTATCATATTTTGATAGGTTTATTGTTTCAAATCAACTTG GGGCTGCTAATGTTGCTTTTTATACTGCACCATCAGAAATTATTTCTC GGCTTAGTATAAATCCAGGTGCGTTTTCAAGAGCCTTATTTCCAAGA TAGCTAATGCAAATAATTCGCTGAAAGATATAAAACGAAAAGAT TAATTACAATTTCACTTTTAATAATCATCACCCCTATTTTTTGATTG GCGTGTTATTTTCAGAGAAGATAATGGTTTTATGGATGGGGGCATCA TTTTTTGGTGAGCCTGGTTTGGTATTATCAATATTACTGATTGGCTTT ATTTTAAATGGATTGGCACAAGTACCATTTGCCAGTATTCAATCCCG AGGTCATGCTAAGATAACTGCATTTGTTTCATCTCTTAGAGTTGTTTC TTATTTATTACTTTTATTTTACCTCATAAAAAGCATGGGGTTGTTGG CGCGGGTATTGCGTGGTCAGTGAGGATGATAGTAGATTATATAGCAT TAAGTCTTTTGACGGTAAGTATATTAATAAATAAAATTCAAAATGC AAGTTAATAACTCATGGCTTTATTTGGGTAGGTGACAATTTATAATG ATATATATATTAACTTTAACTCTTCTCTAGTTATAGCCATAATGTTT TCTCTTCTCGGCACAAAAAGTAGGATCACATCTCCATTACCTTTGCA TTTTTTACCATGGTTACTAACTTTAATTGTCGGGATAAGTAATTACGA TCAATTTTACGAGTTTAAATGAAAGAAGCTTTTACTCTTTGTTGATTG GTTTACAGTTATTTTATATTTTATTTTCATAGGGGAACGGTTAATTA TAAACGTGAAAATATAAATGTTTATTATGGTCTTTTCACATATTAAAT ATGAATGTAAAAAATATTGGATCATTGTTCATCCCAATTTCAATTAT ACCATTTTCGAAATATATATGGTTGGTATGGGGGGAGCAGATGGATT CTTCTCAATTTACGTCTTGCAAATACATTGGAGGGCTATACGGGTA AAAAATTTATCTTAATGCCTGCTGTATATCCTCTAATGATGGCTATGT TCGCAATTGTTTGTCTAACAAAAACTTCCAAATTAATAAAATACTCC ATTTATTTCTGGATGTTTTTGTATTGTATTGGCACAATGGGAAAAAT TCAATATTAACGCCAATATTGACATATTTAATTATTTATGACATTTCAA CATAGATTAAAAAGTAAAAAAAACAATAAAGTTTACATTGTTGATAA TTATATTAGCTTTAACTTTGCATTTTACACGTATGGCTGAGAATGACC ACTCAACATTTTATCTATTTTAGGGCTCTATATTTATTCACCAATAA TTGCTTTAGGCCAGTTGAATGAAGTAAATAGTAGTCATTTTGGTGAG TATACGTTTAGATTATATATGCTATAACTAATAAAATTTGGCCTTATT AAAGAATTGCCAGTAAATACTATTCTTGACTATTACACGTTCTCTGT ACCAACAAATGTATATACTGCACCTCAACCATTTTACCAGATTATTG GTTATACTGGCATCATATTTGGAGCAGTATTATACGGACTAATATAT GTGAGTTTATACACGGCCGGTGTTCTGTGGAAATAATACACAGGCATT ACTGATTTACGCATTGTTTTCAGTTAGCAGTGCAACGGCTTTCTTCGC TGAAACGCTAGTAACGAATTTAGCTGGAAATGTGATGTTAGTATTAT GTACCATCTTACTATGGCGATTTACAGTAATATGCAAACAGTACAG TAACCATTCTAATGGCCACCTACAATGGCGAGGCCTTCATCAAAAAT CAGATTTTGTCACTACAACAACAACATTTTCTAACTGGCGGTTATT TATTCAGGATGATGGGTCTACAGACAATACTATATCTATAATAAAAA ACTTCCAAAAATCTGACTCCAGAATTCGGCTAGTTGATGATAATTTG AAAGGTCAAGGTGCAGGAAAAAATTTTTATCGCTGATAAAGTACA GCGAGACAGATTATACAATTTATTGTGACCAAGATGATATTTGGTTA GAAAACAAAAATATTTGAATTAGTAAAGTATGCAAATGAAATTAAT TGAATGTATCAGATGCGCCTTCGCTAGTTTATGCTGATGGCTATGCTT ATATGGATGGTGAGGGTACAATCGATTTTCTGGGATATCAACAAT CATGCTGATCAATTAAGGATTTTCTTTTTTTAATGGTGGATACCAA GGATGTTCTATTATGTTCAATCGTGCAATGACCAAATTTCTTCTGAAT TATCGAGGATTTGTATATCTACATGACGATATCACAACATTAGCTGC ATACGCTCTTGGTAAAGTTTATTTCTCCCGAAATACCTTATGTTATA TAGACAGCACACGAATGCGGTAACCTGGTATCAAAACATTCCGCAAT	

Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO:
	GGATTGACTTCTAAATTTAAATCACCAGTAAACTATCTTTTATCACG AAAAATTATCAGGTAAGAAAAATCTTTTTTGAATGTAACAGCTCTA TCTTATCAGAGACGAATAAAAAAGTTTTTTGGATTTTATTTCATTTT GTGAATCAAATAATAAATTTACAGATTTTTTTAAGTTATGGCGAGGT GGGTTTAGATTAAATAACAGTAGAACTAAATTATTATTAATAATCTT AATACGGAGAAAAATTTAGCGAATGATTTCAATACTTACACCTACTTT TAATCGGCAACATACTTTATCAAGGCTATTCAATTCTCTTATATTACA AACTGATAAAGATTTTGAGTGGATAATAATTGATGATGGTAGTATAG ATGCAACAGCGGTAAGTTGTAGAAAGATTTAGAAAAAATGTGATTTT GACTTGATTTATTGCTATCAGGAAAAATAATGGTAAGCCCATGGCTTT AAACGCTGGTGTTAAAGCTTGAGAGGCGATTATATCTTTATTGTTG ACAGTGATGATGCTAACTCCCGATGCCATAAAATTAATTAAAGA ATCAATACATGATTGCTTATCTGAGAAGGAAAGTTTCAGCGGAGTCG GTTTTAGAAAAGCATATATAAAAGGGGGGATTATTGGTAATGATTTA AATAATTCTTCAGAACATATATACTATTTAAATGCGACTGAGATTAG CAATTTAATAAAATGGTGATGTTGCATATTGTTTTAAAAAAGAAAGTT TGTTAAAAAATCCATTCCCGGTATAGAAGATGAAAAATTTGTTCCA GAATTATATATTTGGAATAAAATAACTGACAAGGCGAAGATTCGATT TAACATAAGCAAAGTTATATATCTTTGTGAGTATCTTGATGATGGTC TTTCTAAAAATTTCCATAACCAGCTTAAAAAATACCCAAAGGGGTTT AAGATTTATTACAAAGATCAAAAGAAAACGAGAGAAAACCTTATATAA AAAAAACAAAGATGCTAATTAGATATTTGCAATGTTGTTATTATGAG AAAATAAAATGAAAACTATTTGTCATTACAGGTTTAGGCCTTGGA GGTGCTGAGAAGCAGGTTTGCTTTTAGCTGATAAATTAAGTTTAAAG CGGGCACCATGTAAAGATTATTTCACTTGGACATATGTCTAATAATA AAGTCTTTCCTAGCGAAAATAATGTTAATGTCATTAATGTAAATATG TCAAAAAACATTTCTGGAGTTATAAAAGGTTGTGTCAGAATTAGAGA TGTATAGCTAATTTCAAACCAGACATTGTACACAGTCATATGTTTC ATGCAAACATTATCACTAGATTGTCTGTAATTGGAATCAAAAAACAGA CCTGGTATTATATCAACTGCACATAATAAAAAATGAAGGTGGGTATTT CAGAATGCTCACATATAGAATAACCGATTGTTTAAAGTGATTGTTGTA CAAATGTTAGCAAAGAACGAGTGGATGAGTTTTTACGGGATAAAAGC CTTTAATCCCGCTAAAGCAATTACTATGTATAATGGGATAGATACCA ATAAATTTAAATTTGATTTATTGGCAAGGAGGGAAATTCGAGACGGT ATTAATATAAAAAATGATGATATATTATTACTTGCTGCAGGTCGTTT AACGTTAGCTAAAGATTATCCTAATTTATTGAATGCAATGACTCTGC TTCCTGAACACTTTAACTTATTATTATTGGTGATGGTGAATTGCGTG ACGAAATTAATATGCTTATAAAAAAATTGCAATTATCTAATAGGGTG TCCTTGTTGGGAGTTAAAAAAATATTGCTCCCTATTTTCTGCATGT GATATTTTGTCTCTCTCTCGTTGGGAAGGATTGGATTAGTCGTG GCAGAAGCTATGTCATGTGAGCGAATTGTTGTTGGCACGGATTACAGG GGGAGTAAGAGAAGTTATTGGTGACGATGATTTTCTTGTACCCATAT CTGATTCAACACAACCTTGCAAGCAAAATTGAAAAATTGTCTTTGAGC CAGATACGTGATCACATTGGTTTTCGGAATCGTGAGCGTATTTTAAA AAATTTCTCAATAGATACTATTATTATGCAGTGGCAAGAACTCTATG GAACATAATTTGCTCAAAACATGAAAGGTAGATTTATATTGGAAC GTGTCTTTGTTGAATTTAATTCAATCTCAATTGAGATTTTGTATTT CAAAAAATACCATCATAGCTAACGATGATTGGTATTTATTTTAAAGTG CTTTCTATAAATATATTGACGTTTTTAATGCGCCGAAACGATTGGGC TGGGAACAGAGAAGTAAAACTGTTTGAGAATGAAGAGTTTTTGAG ATGTTTATGGATATTAATAAATTGATCCAGTGAATTAATTATTTATAA TAAATCAAGATTTAATGTTAATAAATGATAATCTTTCTGACACTCA TATTAATTATGAGTGGTACGTTTGGTAAACGGTAAACTATTATATGA CAGCTAGAACAACATAAAGTTTTGCACTTACAATTACTCCCACTCTTA AGTGGCGTTCAAAGGGTAACATTAAACGAAATTAGTGCATTATATAC TGATTATGATTATACACTAGTTTGCTCAAAAAAAGGTCCACTAACAA AAGCATTGCTGGAATATGATGTCGATTGTCATTGTATCCCCGAACCT ACGAGAGAAATTACCGTAAAGAATGATTTTAAAGCATTGTTCAAGCT TTATAAGTTCATAAAAAAAGAAAAATTTGACATTGTGCATACACATT CTTCAAAAACAGGTATTTTGGGGCGAGTTGCTGCCAAATTAGCACGT GTTGGAAAGGTGATCCACACTGTACATGGTTTTTTCTTTTCCAGCCGC ATCTAGTAAAAAAGTTATTACCTTTATTTTTTTCATGGAATGGATAG CAAAGTTCTTTACGGATAAGTTAATCGTCTTGAATGTAGATGATGAA TATATAGCAATAAACAAATTAATTTCAAGCGGGATAAAGTTTTTTT AATTCCTAATGGAGTAGACACTGATAAGTTTTCTCCTTTAGAAAAATA	

Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO:
	AAATTTATAGTAGCACCTTGAATCTAGTAATGGTTGGTAGATTATCC AAGCAAAAAGATCCTGAGACATTATTGCTTGCTGTTGAAAACTGCT GAATGAAAATGTTAATGTTAAGCTGACACTTGTAGGAGATGGTGAA CTAAAAGAACAGTTAGAAAAGCAGGTTCAAACGGCAAGATGGACGTA TAATTTTTCATGGATGGTCAGATAACATTGTTAATATTTTAAAAGTTA ATGATCTTTTATATTACCTTCTCTTTGGGAGGGTATGCCATTAGCAA TTTTAGAAAGCATTGAGCTGTGGACTTCCATGTATAGTCACTAATATT CCAGGTAATAATAGCTTAATAGAAGATGGCTATAATGGTTGTTTGT TGAAATTAGAGATTGTCAGTTATTATCTCAAAAAATCATGTCATATG TTGGTAAGCCAGAACTGATTGCACAGCAATCTACCAATGCACGATCA TTTATTCTGAAAAATTATGGATTAGTTAAAAGAAAATAATAAGGTCAG ACAGCTATATGATAATTAATGAAACCGAAAAGTTAAAAAAGAACA GGTTTTTCAAAGTGAAAATAAAATTACAGTTTTTTTATTGCAATGATT AACGTAACATCTGCATTACATTCAAGCCGCACAACCCCGCGGTGACC ACCCCTGACAGGAGTAAACAATGTCAAAGCAACAGATCGGCGTCGT CGGTATGGCAGTGTATGGGACGCAACCTCGCGCTCAACATCGAAAGC CGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAAAAGACGGA AGAAGTTATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAACTGGTTCCTTACTATA CGGTGAAAGAGTTCGTTGAATCTCTTGAAACGCCTCGTCGCATCCTG TTAATGGTTAAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCCT GAAACCATATCTCGATAAAGGCGATATCATCATTGATGGTGGTAATA CCTTCTTCCAGGACACCATTCGTCGTAACCGCGAGCTTTCTGCACAA GGCTTTAACTTCATCGGTACGGGTGTTTCCGGTGGTGAAGAGGGCGC GCTGAAAGGACCTTCTATCATGCCTGGTGGGCAGAAAGAGGCCTAT GAACTGGTTGCTCCTATCCTGACCAAAAATCGCCGCCGTGGTGAAGA TGGTGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGCCGATGGCGCAGGTCACT ATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTGAATACGGTGATATGCAACTG ATTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTGAAAGGTGGTCTGAATCTCTCTAA CGAAGAAGTGGCACAACCTTTACCGAGTGGAATAACGGTGAACTG AGCAGTTACCTGATCGACATCACTAAAGACATCTTACCAAAAAAG ATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCAGC AAACAAAAGGTACGGGTAAATGGACCAGTCAGAGCGCGTGGATCTC GGTGAGCCACTGTCGCTGATTACTGAGTCTGTGTTGCACGCTACAT CTCTTCACTAAAAGATCAGCGCGTGGCTGCGTCTAAAGTACTGTCGG GTCCACAAGCGCAGCCAGCAGGCGACAAAGCAGAGTTCATTGAAAA AGTTCGCCGTGCGCTTATCTGGGTAAGATTGTTTCTTACGCGCAGG GCTTCTCTCAGCTGCGTGCTGCGTCTGAAGAGTACAAGTGGGATCTG AACTACGGTGAAATCGCGAAGATTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCG TGCGCAGTTCCTGCAGAAAATCACCGATGCTTATGCCGAAAATCCGC AGATCGCTAACCTGCTGCTGGCTCCGTAAGCAAAATTGCCGAT GACTACCAGCAGGCTCTGCGTGATGTCGTTGCTTATGCAGTACAGAA CGGTATCCCGGTTCCGACCTTCGCCGCTGCGGTTGCCTATTACGATA GCTACCGTGCCGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGT GACTATTTCCGGTGACATACTTATAAGCGCATTGATAAAGAAGGTGT GTTCCATACTGAATGGCTGGATTGA	
Олигосахарил трансфераза PglB	MLKKEYLKNPYL VLFAMIILAYVFSVFCRFYWVWWASEFNEYFFNNQL MIISNDGYAFAEGARDMIAGFHQPNDLSYYGSSLSALTYWLYKITPFSF ESIILYMSTFLSSLVVIPTILLANEYKRPLMGFVAALLASIANSYYNRTMS GYDIDMLVIVLPMFILFMMVRMILKKDFFSLIALPLFIGIYLWWYPSSY TLNVALIGLFLIYTLIFHRKEKIFYIAVILSSLTLSNIAWFYQSAIIVILFALF ALEQKRLNFMIIIGLSATLIFLILSGGVDPILYQLKFYIFRSDSANLTQG FMYFNVNQTIQEVENVDLSEFMRRISGSEIVFLFSLFGFVWLLRKHKSMI MALPILVLGFLALKGGLRFTIYSVPVMALGFGFLSEFKAIMVKKYSQ TSNVCIVFATILTLAPVFIHIYNYKAPTVFVSQNEASLLNQLKNIANREDY VVTWWDYGYPVRYSDVKTLVDGGKHLGKDNFFPSFALSDEQAAA NMARLSVEYTEKSFYAPQNDILKTDILQAMMKDYNQSNVDLFLASLSK PDFKIDTPKTRDIYLYMPARMSLIFSTVASFSFINLDTGVLDKPFTFSTAY PLDVKNGEIYLSNGVVLSDDFRSFKIGDNVSVNSIVEINSIKQGEYKITP IDDKAQFYIFYLKDSAIPYAQFILMDKTMFNSAYVQMFFLGNYDKNLFD LVINSRDAKVFKLKI	6

Примеры

Для дополнительной иллюстрации характера изобретения предложены следующие примеры изобретения. Следует понимать, что следующие примеры не ограничивают изобретение и что объем изобретения определен прилагаемыми пунктами формулы изобретения.

Недавно была разработана система биоконъюгации в *E. coli*, в которой антигенный полисахарид и белок-носитель синтезируются *in vivo* и затем конъюгируются *in vivo* под действием олигосахарилтрансферазы PglB, фермента *Campylobacter jejuni*, экспрессированного в *E. coli* (Wacker et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (2006) v. 103, pp. 7088-93). Эта система N-связанного гликозилирования белков способна переносить различные полисахариды на белок-носитель, что позволяет применять методы очистки биоконъюгата от бактерий, в которых он экспрессируется. Биоконъюгация успешно используется для получения конъюгированного полисахарида для потенциальной четырехвалентной вакцины *E. coli* с О-антигеном (Poolman and Wacker, J. Infect. Dis. (2016) v.213(1), pp. 6-13; WO 2015/124769; WO 2017/035181). Композиция, содержащая 10 биоконъюгатов (O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75, композиция обозначается как ExPEC10V), уже описана и находится в стадии клинических испытаний (например, WO2020/191082A1). Каждый из биоконъюгатов продуцируется отдельным штаммом-продуцентом, который демонстрирует вариабельность выхода в зависимости от О-серотипа. Для продуцирующих О-антиген штаммов нескольких О-серотипов можно повысить выход путем экспрессии вариантов гликозилтрансферазы PglB *C. jejuni* с модифицированной субстратоспецифичностью (см., например, WO 2016/107818, WO 2016/107819). Однако для О-серотипа O18, показавшего самый низкий выход биоконъюгатов среди десяти серотипов, из которых были получены биоконъюгаты для состава ExPEC10V, применение вариантов белка PglB *C. jejuni* и использование альтернативных гомологов PglB не привело к улучшению выхода. Кроме того, дальнейшие модификации платформы, направленные на увеличение выхода биоконъюгата O18, не привели к успеху. Среди этих модификаций — сверхэкспрессия WecA, белка, который инициирует биосинтез О-субъединицы, катализируя перенос *N*-ацетилглюкозамин (GlcNAc)-1-фосфата на ундекапренилфосфат (Und-P) с образованием Und-P-P-GlcNAc. Кроме того, замена нативного регулятора длины О-антигенной цепи Wzz, присутствующего в штамме-платформе для биоконъюгации *E. coli* K-12, на регулятор длины О-антигенной цепи других видов грамотрицательных бактерий, приводящая к

увеличению длины О-антигенной цепи O18A, не привела к значительному увеличению выхода продукта.

Пример 1. Штамм-продуцент биоконъюгата O18 с улучшенным выходом

Однако авторы настоящего изобретения получили штаммы с повышенным выходом биоконъюгата O18 и обнаружили, что О-антиген-полимераза Wzy в этих штаммах имеет аминокислотные мутации по сравнению с Wzy в существующем штамме-продуценте для биоконъюгата O18 (который имел О-антиген-полимеразу Wzy, имеющую SEQ ID NO: 1). Исходя из этого, авторы изобретения создали новый штамм-продуцент для биоконъюгатов O18, который в остальном идентичен, за исключением трех мутаций аминокислот в своей О-антиген-полимеразе Wzy по сравнению с ранее описанным (см. WO2020/191082) штаммом-продуцентом для биоконъюгата O18. В частности, О-антиген-полимераза Wzy ранее описанного штамма имела аминокислоты треонин (Т), метионин (М) и валин (V) в положениях 199, 377 и 395 соответственно (т. е. О-антиген-полимераза Wzy этого ранее описанного штамма приведена в SEQ ID NO: 1), в то время как новый штамм-продуцент имел аминокислоты изолейцин (I), лизин (К) и аланин (А) в этих соответствующих положениях.

Выход биоконъюгата O18 в отфильтрованной периплазматической фракции из 200-литрового биореактора после осмотического шока (т. е. на ранней стадии процесса, когда возможна разумная количественная оценка выхода) был примерно в 2,4 раза выше для нового штамма по сравнению с ранее описанным штаммом.

Заполненность сайтов гликозилирования белка-носителя ЕРА, имеющего четыре N-гликозилирующие консенсусные последовательности, у нового штамма была выше, чем у ранее описанного, т. е. новый штамм индуцировал больше ди-, три- и тетрагликозилированных белков-носителей ЕРА (например, Фиг. 1).

Пример 2. Конструирование модифицированных О-антиген-полимераз Wzy

Далее авторы изобретения провели исследование мутагенеза аминокислотной последовательности О-антиген-полимеразы Wzy и определили конкретные комбинации аминокислотных замен в этих трех позициях в последовательности О-антиген-полимеразы Wzy с SEQ ID NO: 1, которые влияют на выход и характер гликозилирования биоконъюгатов O18.

Различные комбинации аминокислотных замен в одном или более положениях 199, 377 и 395 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 О-антиген-

полимеразы Wzy были получены методом сайт-направленного мутагенеза с использованием стандартных процедур. Различные комбинации, которые были получены, приведены в таблице 3.

5 **Пример 3.** *Получение О-антигенного полисахарида с использованием модифицированной О-антиген-полимеразы Wzy*

Ген *wzy*, присутствующий в кластере *rfb* из серотипа *E. coli* O18A (пример представлен в виде SEQ ID NO: 5), который был вставлен в хромосому штамма W3110, продуцирующего биоконъюгаты *E. coli* K-12, был заменен на варианты генов, кодирующих модифицированные О-антиген-полимеразы Wzy, имеющие SEQ ID NO: 1 с мутациями, указанными в таблице 3, с помощью методов генетической модификации на основе гомологичной рекомбинации. Помимо кластера *rfb* из серотипа *E. coli* O18A, в состав штамма W3110 для производства биоконъюгатов *E. coli* входили нуклеиновая кислота, кодирующая белок-переносчик EPA (SEQ ID NO: 3) и нуклеиновая кислота, кодирующая олигосахарилтрансферазу PglB (имеющую SEQ ID NO: 6). Биоконъюгаты полисахарида O18A были получены в культурах во встряхиваемых колбах и выделены с помощью осмотического шока, как описано ранее, например, в WO 2020/191082.

Пример 4. *Определение характеристик биоконъюгатов O18*

20 Периплазматические экстракты из культур во встряхиваемых колбах штамма-продуцента биоконъюгата K-12 *E. coli* W3110, содержащего варианты Wzy (с мутациями, указанными в таблице 3), в которых была индуцирована экспрессия биоконъюгата полисахарида O18A, подвергали иммуноанализу методом капиллярного электрофореза с использованием моноклональных антител, специфичных к O18A, для иммунодетекции биоконъюгатов. Относительную количественную оценку проводили для каждого образца на основании интенсивности сигнала пиков, соответствующих sEPA, моноликозилированной EPA и более высоких форм гликозилированной EPA (ди-/три-/тетра-гликозилированной EPA), как определено с помощью ММ относительно общего сигнала продукта (таблица 3).

30

Таблица 3. Дикий тип и вариант О-антиген-полимераз Wzy с аминокислотными заменами в одном или более положениях 199, 377 и 395 SEQ ID NO: 1, как указано, и их влияние на характер гликозилирования биоконъюгатов O18. Варианты, приводящие к улучшенному характеру гликозилирования, выделены жирным шрифтом.

Идентификатор конструкта	Аминокислотное положение Wzy			Процент каждой субформы в общем продукте		
	199	377	395	sEPA	Моно	Ди/три/тетра
Ранее описанный штамм-продуцент (Wzy с SEQ ID NO:1)	T	M	V	31%	45%	24%
Новый штамм-продуцент	I	K	A	10%	34%	57%
Вариант 1	I	M	V	26%	45%	29%
Вариант 2	T	K	V	6%	24%	71%
Вариант 3	T	M	A	21%	41%	38%
Вариант 4	T	K	A	8%	27%	65%
Вариант 5	I	K	V	10%	30%	61%
Вариант 6	I	M	A	6%	34%	60%

Пример 5. Получение биоконъюгата O18 с использованием нового штамма-продуцента, а также поливалентных продуктов ExPEC9V и ExPEC10V, обладающих иммуногенной активностью

- 5 Новый штамм для получения биоконъюгатов O18A использовали для получения биоконъюгата O18A, биоконъюгат O18A выделяли из периплазмы после осмотического шока, подвергали хроматографии для удаления белков клетки-хозяина, а выделенный биоконъюгат использовали для приготовления фармацевтической композиции, содержащей этот биоконъюгат O18A в качестве лекарственного вещества,
- 10 по существу, как описано в WO 2020/191082 (пример 8 в нем).
- Новое лекарственное вещество O18A также смешивали с лекарственными веществами других биоконъюгатов O-антигенов *E. coli* O1A, O2, O4(glc+), O6A, O15, O16, O25B и O75, а в некоторых случаях и O8, для получения поливалентных (9-валентных, соответственно 10-валентных) лекарственных препаратов. Эти лекарственные
- 15 препараты при введении кроликам индуцировали антитела против серотипов *E. coli*, O-антигены которых присутствовали в композициях. Таким образом, было продемонстрировано, что биоконъюгаты и композиции согласно изобретению (полученные согласно способам изобретения) оказались пригодными для индуцирования иммунных реакций против *E. coli*.

ПЕРВОНАЧАЛЬНАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Грамотрицательные бактериальные клетки-хозяева, содержащие:

(a) белок-носитель, содержащий по меньшей мере одну консенсусную последовательность гликозилирования;

(b) локус *rfb* O18 *E. coli*; и

(c) олигосахарилтрансферазу;

причем клетка содержит полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy, при этом полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1, причем аминокислотная последовательность содержит:

i) изолейцин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и аланин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1;

ii) треонин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и валин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1;

iii) треонин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и аланин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1;

iv) изолейцин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и валин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1; или

v) изолейцин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, метионин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и аланин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1.

2. Клетка-хозяин по п. 1, в которой полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy, содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1, с той разницей, что аминокислотная последовательность содержит:

- i) изолейцин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и аланин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1;
- 5 ii) треонин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и валин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1;
- 10 iii) треонин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и аланин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1;
- iv) изолейцин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и валин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1; или
- 15 v) изолейцин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, метионин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и аланин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1.
- 20 3. Клетка-хозяин по п. 1 или 2, в которой полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy, содержит изолейцин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и аланин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1.
- 25 4. Клетка-хозяин по любому из пп. 1–3, в которой полинуклеотид или вектор, кодирующий полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy, интегрирован в геном клетки-хозяина.
- 30 5. Клетка-хозяин по любому из пп. 1–4, которая представляет собой *Escherichia coli*.
6. Клетка-хозяин по п. 5, которая представляет собой штамм K-12 *E. coli*, предпочтительно штамм W3110.

7. Клетка-хозяин по любому из пп. 1–6, в которой присутствует по меньшей мере одно из следующего:
 - а) олигосахарилтрансфераза содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности с SEQ ID NO: 6;
 - б) белок-носитель содержит SEQ ID NO: 3 и
 - в) локус *rfb* O18 *E. coli* представляет собой локус *rfb* штамма *E. coli* с серотипом O18A.
8. Клетка-хозяин по любому из пп. 1–7, в которой олигосахарилтрансфераза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.
9. Клетка-хозяин по любому из пп. 1–8, которая содержит локус *rfb* O18 *E. coli* с нуклеотидной последовательностью, кодирующей О-антиген-полимеразу Wzy, который кодирует полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy и имеющий последовательность, определенную в любом из пп. 1–3.
10. Способ получения биоконъюгата антигенного полисахарида *E. coli* O18, конъюгированного с белком-носителем, включающий культивирование клетки-хозяина по любому из пп. 1–9 для получения биоконъюгата.
11. Способ по п. 10, дополнительно включающий восстановление биоконъюгата.
12. Способ по п. 11, дополнительно включающий включение восстановленного биоконъюгата в фармацевтическую композицию.
13. Способ по п. 12, дополнительно включающий добавление одного или более дополнительных биоконъюгатов полисахаридов О-антигена *E. coli*, конъюгированных с белком-носителем, в фармацевтическую композицию с получением поливалентной композиции биоконъюгата.
14. Способ по п. 13, в котором один или более дополнительных биоконъюгатов содержат по меньшей мере один О-антигенный полисахарид, выбранный из группы, состоящей из серотипов *E. coli* O1, O2, O4, O6, O8, O15, O16, O25 и O75.

15. Способ по п. 14, в котором поливалентная композиция биоконъюгата содержит:

(i) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O18A, конъюгированного с белком-носителем;

5 (ii) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O1A, конъюгированного с белком-носителем;

(iii) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O2, конъюгированного с белком-носителем;

10 (iv) биоконъюгат гликозилированного антигенного полисахарида *E. coli* O4, конъюгированного с белком-носителем;

(v) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O6A, конъюгированного с белком-носителем;

(vi) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O15, конъюгированного с белком-носителем;

15 (vii) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O16, конъюгированного с белком-носителем;

(viii) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O25B, конъюгированного с белком-носителем; и

20 (ix) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O75, конъюгированного с белком-носителем,

причем предпочтительно указанный белок-носитель в каждом биоконъюгате содержит SEQ ID NO: 3.

16. Способ по п. 15, в котором поливалентная композиция биоконъюгата содержит:

25 (x) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O8, конъюгированного с белком-носителем,

при этом предпочтительно указанный белок-носитель содержит SEQ ID NO: 3.

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Грамотрицательные бактериальные клетки-хозяева, содержащие:

(a) белок-носитель, содержащий по меньшей мере одну консенсусную последовательность гликозилирования;

(b) локус *rfb* O18 *E. coli*; и

(c) олигосахарилтрансферазу для переноса олигосахаридов в участки N-гликозилирования на белке-носителе;

причем клетка содержит полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy, при этом полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1, причем аминокислотная последовательность содержит:

i) изолейцин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и аланин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1;

ii) треонин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и валин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1;

iii) треонин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и аланин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1;

iv) изолейцин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и валин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1; или

v) изолейцин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, метионин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и аланин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1.

2. Клетка-хозяин по п. 1, в которой полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy, содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1, с той разницей, что аминокислотная последовательность содержит:

- i) изолейцин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и аланин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1;
- 5 ii) треонин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и валин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1;
- 10 iii) треонин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и аланин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1;
- iv) изолейцин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и валин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1; или
- 15 v) изолейцин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, метионин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и аланин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1.
- 20 3. Клетка-хозяин по п. 1 или 2, в которой полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy, содержит изолейцин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и аланин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1.
- 25 4. Клетка-хозяин по любому из пп. 1–3, в которой полинуклеотид или вектор, кодирующий полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy, интегрирован в геном клетки-хозяина.
- 30 5. Клетка-хозяин по любому из пп. 1–4, которая представляет собой *Escherichia coli*.
6. Клетка-хозяин по п. 5, которая представляет собой штамм K-12 *E. coli*, предпочтительно штамм W3110.

7. Клетка-хозяин по любому из пп. 1–6, в которой присутствует по меньшей мере одно из следующего:
 - а) олигосахарилтрансфераза содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности с SEQ ID NO: 6;
 - б) белок-носитель содержит SEQ ID NO: 3 и
 - в) локус *rfb* O18 *E. coli* представляет собой локус *rfb* штамма *E. coli* с серотипом O18A.
8. Клетка-хозяин по любому из пп. 1–7, в которой олигосахарилтрансфераза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.
9. Клетка-хозяин по любому из пп. 1–8, которая содержит локус *rfb* O18 *E. coli* с нуклеотидной последовательностью, кодирующей О-антиген-полимеразу Wzy, который кодирует полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy и имеющий последовательность, определенную в любом из пп. 1–3.
10. Способ получения биоконъюгата антигенного полисахарида *E. coli* O18, конъюгированного с белком-носителем, включающий культивирование клетки-хозяина по любому из пп. 1–9 для получения биоконъюгата.
11. Способ по п. 10, дополнительно включающий восстановление биоконъюгата.
12. Способ по п. 11, дополнительно включающий включение восстановленного биоконъюгата в фармацевтическую композицию.
13. Способ по п. 12, дополнительно включающий добавление одного или более дополнительных биоконъюгатов полисахаридов О-антигена *E. coli*, конъюгированных с белком-носителем, в фармацевтическую композицию с получением поливалентной композиции биоконъюгата.
14. Способ по п. 13, в котором один или более дополнительных биоконъюгатов содержат по меньшей мере один О-антигенный полисахарид, выбранный из группы, состоящей из серотипов *E. coli* O1, O2, O4, O6, O8, O15, O16, O25 и O75.

15. Способ по п. 14, в котором поливалентная композиция биоконъюгата содержит:

(i) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O18A, конъюгированного с белком-носителем;

5 (ii) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O1A, конъюгированного с белком-носителем;

(iii) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O2, конъюгированного с белком-носителем;

10 (iv) биоконъюгат гликозилированного антигенного полисахарида *E. coli* O4, конъюгированного с белком-носителем;

(v) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O6A, конъюгированного с белком-носителем;

(vi) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O15, конъюгированного с белком-носителем;

15 (vii) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O16, конъюгированного с белком-носителем;

(viii) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O25B, конъюгированного с белком-носителем; и

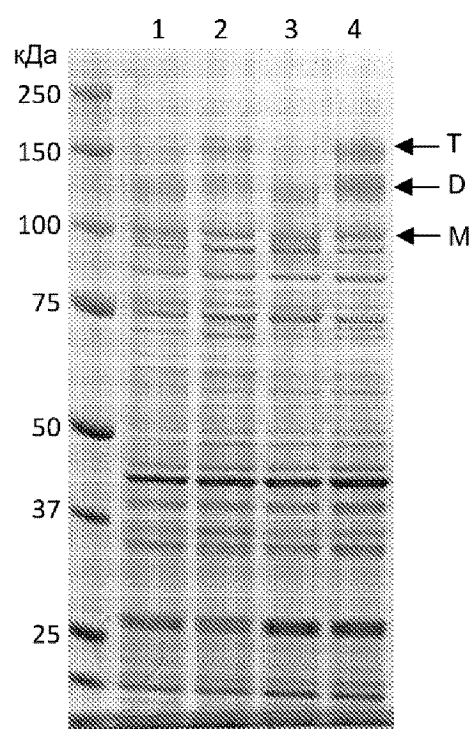
20 (ix) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O75, конъюгированного с белком-носителем,

причем предпочтительно указанный белок-носитель в каждом биоконъюгате содержит SEQ ID NO: 3.

16. Способ по п. 15, в котором поливалентная композиция биоконъюгата содержит:

25 (x) биоконъюгат антигенного полисахарида *E. coli* O8, конъюгированного с белком-носителем,

при этом предпочтительно указанный белок-носитель содержит SEQ ID NO: 3.



Фиг. 1