

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391975** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2023.09.07

(51) Int. Cl. *C07K 14/245* (2006.01)  
*A61P 13/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.01.11

---

(54) **МУТАНТЫ FimH, КОМПОЗИЦИИ С НИМИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

(31) 21151126.6

(32) 2021.01.12

(33) EP

(86) PCT/IB2022/050166

(87) WO 2022/153166 2022.07.21

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

(72) Изобретатель:

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

(74) Представитель:

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

---

(57) Описаны полипептиды, содержащие лектиновый домен FimH, содержащий по меньшей мере одну аминокислотную мутацию, которая переводит лектиновый домен FimH в конформацию с низкой аффинностью к маннозе. Также описаны фармацевтические композиции, которые содержат такие полипептиды, и способы стимулирования иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, посредством введения полипептида.

**A1**

**202391975**

**202391975**

**A1**

## МУТАНТЫ FimH, КОМПОЗИЦИИ С НИМИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

### 5 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к областям медицинской микробиологии и вакцин. В частности, изобретение относится к полипептидам, содержащим лектиновый домен FimH, содержащий по меньшей мере одну аминокислотную мутацию, которая приводит к тому, что лектиновый домен FimH находится в конформации с низкой аффинностью к маннозе, и обеспечивающий высокие уровни опосредованного антителами ингибирования адгезии *E. coli* к эпителиальным клеткам мочевого пузыря при введении субъекту. Более того, изобретение дополнительно относится к композициям, которые содержат такие полипептиды, и к способам стимулирования иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, посредством введения иммуногенного полипептида.

### ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Штаммы *E. coli*, вызывающие внекишечные инфекции, были названы внекишечными патогенными *E. coli* (ExPEC). ExPEC являются самыми распространенными кишечными грамотрицательными микроорганизмами, вызывающими внекишечные инфекции в амбулаторных условиях, в условиях учреждений длительного ухода и больниц. Типичные внекишечные инфекции, вызванные *E. coli*, включают в себя инфекцию мочевыводящих путей (ИМП), бактериемию и сепсис. *E. coli* является основной причиной тяжелого сепсиса и обуславливает высокие показатели заболеваемости и смертности.

ExPEC, как и другие представители семейства Enterobacteriaceae, продуцирует фимбрии типа I, которые помогают прикрепляться к поверхностям эпителия слизистой оболочки. Эти фимбрии типа I представляют собой волосовидные структуры, исходящие из поверхности клеток представителей семейства Enterobacteriaceae. Основным компонентом фимбрий типа I являются повторяющиеся субъединицы FimA, расположенные в виде правозакрученной спирали с образованием филамента приблизительно 1 мкм длиной и 7 нм диаметром с центральным осевым отверстием. Наряду с FimA в качестве основной субъединицы фимбриальный филамент также содержит FimF, FimG и FimH в качестве минорных белковых субъединиц. Минорная

белковая субъединица FimH представляет собой маннансвязывающий адгезин, который способствует прикреплению имеющих фимбрии типа I бактерий к маннозосодержащим гликопротеинам на поверхностях эукариотических клеток и является представителем семейства белков, которые связываются с различными мишенями, включая маннан и фибронектин. Исследования методом иммунной электронной микроскопии показали, что FimH стратегически расположен на дистальных кончиках фимбрий типа I, где он, по-видимому, образует комплекс с FimG, образуя гибкую структуру фибрилл, а также располагается продольно с различными интервалами вдоль филамента.

Было показано, что адгезивный белок FimH индуцирует защиту при его применении в качестве вакцины в различных доклинических моделях против ИМП (Langermann S, et al., 1997, Science, 276: 607–611; Langermann S, et al., 2000, J Infect Dis, 181: 774–778; O'Brien VP et al., 2016, Nat Microbiol, 2:16196).

Было показано, что во время инфекции *E. coli* лектиновый домен адгезина FimH, который связывается с маннозилированными рецепторами, может принимать две отличные конформации: низкоаффинную к маннозе (напряженную) и высокоаффинную к маннозе (удлиненную/расслабленную) (Kalas et al, 2017, Sci Adv 10;3(2)). Низкоаффинная конформация способствует подвижности бактерий и заселению новых тканей. Высокоаффинная конформация обеспечивает плотную адгезию бактерий под действием механических сил экскреции мочи. Также было показано, что антитела против низкоаффинного варианта блокируют связывание бактерий с уроэпителиальными клетками и снижают количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в мочевом пузыре (Tchesnokova, 2011 Infect Immun. 79(10):3895–904; Kisiela, 2013 Proc Natl Acad Sci, 19;110(47):19089–94).

В WO02102974 описан ряд мутантов FimH, все из которых содержат аминокислотную модификацию в каньонной области молекулы. В частности, в WO02102974 описаны варианты, в которых взаимодействующие с маннозой остатки в связывающем кармане мутированы. Это место мутации выбрано потому, что оно будет поддерживать мутант FimH в более открытой конформации и, таким образом, откроет эпитопы, которые плохо доступны в белке дикого типа. Однако на сегодняшний день, насколько известно авторам настоящего документа, ни один из этих мутантов не рассматривался в дальнейшем как кандидат на вакцину. В клинических исследованиях использовали только FimH дикого типа.

Таким образом, в данной области сохраняется потребность в вакцинах, которые могут индуцировать высокоингибирующие антитела против бактериальных инфекций, вызванных *E. coli*.

## 5 ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте в изобретении предложен полипептид, содержащий лектиновый домен FimH, содержащий аминокислоту, отличную от фенилаланина (F), в положении, соответствующем положению 71 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

10 Во втором аспекте в изобретении предложен полипептид, содержащий лектиновый домен FimH в соответствии с первым аспектом, причем полипептид дополнительно содержит аминокислоту, отличную от фенилаланина (F), в положении, соответствующем положению 144 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

15 В третьем аспекте в изобретении предложен полинуклеотид, кодирующий полипептид в соответствии с изобретением.

В четвертом аспекте в изобретении предложен вектор, содержащий полинуклеотид в соответствии с изобретением.

В пятом аспекте в изобретении предложена клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид или вектор в соответствии с изобретением.

20 В шестом аспекте в изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая полипептид, полинуклеотид или вектор в соответствии с изобретением.

25 В седьмом аспекте в изобретении предложен полипептид в соответствии с изобретением, полинуклеотид в соответствии с изобретением, вектор в соответствии с изобретением или фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением для применения в индукции иммунного ответа против бактерии семейства *Enterobacteriaceae*. Изобретение дополнительно относится к способу лечения или профилактики связанного с энтеробактериями состояния у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает в себя введение эффективного количества полипептида в соответствии с изобретением, полинуклеотида в соответствии с изобретением, вектора в соответствии с изобретением или фармацевтической композиции в соответствии с изобретением.

30 В восьмом аспекте в изобретении дополнительно предложен способ получения полипептида, включающий в себя экспрессию полипептида из рекомбинантной клетки, содержащей полинуклеотид в соответствии с изобретением и/или вектор

в соответствии с изобретением, причем необязательно способ дополнительно включает в себя извлечение полипептида, за которым необязательно следует включение полипептида в состав фармацевтической композиции.

## 5 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1. Функциональность антител, индуцированных разными вариантами FimH. Крысам Wistar проводили 4 внутримышечные иммунизации в день 0, 7, 10 и 18 с использованием 60 мкг/доза разных вариантов FimH в комбинации с адъювантом, отличным от адъюванта Фрейнда (модель для крыс Speedy, Eurogentec). Образцы сыворотки получали в день 0 (до иммунизации) и в день 28 (после иммунизации).

10 А) Исходный эксперимент с разными вариантами FimH (указаны под графиком). Титры ингибирующих антител (IC<sub>50</sub>) рассчитывали на основе 4-параметрической модели логистической регрессии, сопоставленной с 12-ступенчатой кривой разведения. Данные представляют собой среднее значение для двух повторностей образцов сыворотки от 2  
15 животных/группа.

Б) Отдельный эксперимент с мутантами FimH F144V, F71Y и двойным мутантом F144V/F71Y. Титры ингибирующих антител (IC<sub>50</sub>) рассчитывали на основе 4-параметрической модели логистической регрессии, сопоставленной с 6-ступенчатой кривой разведения. На графике показаны индивидуальные титры IC<sub>50</sub> до и после  
20 иммунизации образцов сыворотки, измеренные в двух повторностях, и GMT (средний геометрический титр) ± 95%-й ДИ (доверительный интервал). LOD: предел обнаружения.

Фиг. 2. Конформационное состояние разных вариантов лектинового домена FimH в присутствии и в отсутствие маннозидного лиганда, определенное с помощью ЯМР-  
25 спектроскопии. На левой панели представлены спектры <sup>15</sup>N ЯМР с гетероядерной одноквантовой корреляцией (HSQC) для однородно <sup>15</sup>N-меченых вариантов FimH<sub>LD</sub> в низкоаффинном состоянии (L) при отсутствии связывания с маннозидным лигандом (например, апо-состояние), а на правой панели представлены спектры для  
30 высокоаффинного состояния (H) при наличии связывания с маннозидным лигандом (например, лигандное состояние). Ключевые аминокислотные остатки, которые претерпевают химический сдвиг при связывании маннозидного лиганда, указаны в прямоугольниках. Указанные остатки были идентифицированы по публично доступным ЯМР-спектрам для *E coli* K12 (Rabbani S et al, J Biol. Chem., 2018,

293(5):1835–1849) за исключением остатков номер 1 и 2, которые были специфичны для *E. coli* 23-10, и это показывает, что белок дикого типа FimH<sub>LD</sub> 23-10 имеет немного другую конформацию в апо-состоянии по сравнению с FimH<sub>LD</sub> *E. coli* K12.

## 5 ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В изобретении предложен новый полипептид, содержащий лектиновый домен FimH, где лектиновый домен FimH «заперт» в конформации с низкой аффинностью к маннозе, также называемой в настоящем документе «низкоаффинной конформацией». Настоящее изобретение частично основано на наблюдении, что антиген FimH в конформации с низкой аффинностью к маннозе способен индуцировать антитела, которые могут ингибировать опосредованную маннозидом адгезию. Эти антитела являются сильно ингибирующими и имеют усиленный эффект в профилактике или лечении бактериальных инфекций. В настоящем документе было обнаружено, что лектиновый домен FimH с мутацией F71Y обладает неожиданно хорошей комбинацией требуемых свойств, что, например, делает его очень подходящим для применения в вакцинах против ИМП, например для профилактики или уменьшения рецидивов ИМП.

Соответственно, в первом аспекте в изобретении предложен полипептид, предпочтительно иммуногенный полипептид, содержащий лектиновый домен FimH, содержащий аминокислоту, отличную от фенилаланина (F), в положении, соответствующем положению 71 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

Во втором аспекте в изобретении дополнительно предложен полипептид, предпочтительно иммуногенный полипептид, содержащий лектиновый домен FimH, содержащий аминокислоту, отличную от фенилаланина (F), в обоих положениях, соответствующих положениям 71 и 144 соответственно, в эталонной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1. Этот «двойной мутант» остается заблокированным в низкоаффинной конформации и, таким образом, в равной степени способен индуцировать антитела, которые могут ингибировать опосредованную маннозидом адгезию. В дополнение к индукции этих ингибирующих антител в настоящем документе было обнаружено, что двойной мутант лектинового домена FimH F71Y и F144V не способен обратно переключаться в высокоаффинную конформацию, которая придает двойному мутанту неожиданно высокую стабильность. Такая неспособность переключаться обратно в высокоаффинную конформацию является очень желательным свойством, которое делает двойной мутант очень подходящим, например для применения в вакцинах против ИМП, например для профилактики или уменьшения

рецидивов ИМП, так как это, помимо прочего, гарантирует отсутствие необходимости в дополнительных проверках качества или стабильности для оценки того, стабильна ли конформация во время хранения или в других условиях хранения или применения.

5 Положения аминокислот 71 и 144, используемые в настоящем документе, относятся к положениям 71 и 144 соответственно в эталонной аминокислотной последовательности лектинового домена FimH SEQ ID NO: 1. В аминокислотных последовательностях изобретения, отличных от SEQ ID NO: 1, предпочтительно положения аминокислот 71 и 144 присутствуют в положениях той другой аминокислотной последовательности, которые соответствуют положениям 71 и 144  
10 соответственно в SEQ ID NO: 1 при выравнивании последовательностей, предпочтительно при выравнивании последовательностей в ClustalW (1.83) с использованием настроек по умолчанию. Специалисту в данной области известно, как идентифицировать соответствующие положения аминокислот в аминокислотных последовательностях лектинового домена FimH, отличных от SEQ ID NO: 1, с  
15 использованием алгоритмов выравнивания аминокислотных последовательностей, определенных выше.

В тексте заявки полипептид изобретения, содержащий лектиновый домен FimH, который содержит аминокислоту, отличную от фенилаланина (F), в положении, соответствующем положению 71 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1,  
20 будет обозначен в настоящем документе как FimH(F71mut). Аналогичным образом полипептид изобретения, содержащий лектиновый домен FimH, который содержит аминокислоту, отличную от фенилаланина (F), в обоих положениях, соответствующих положениям 71 и 144 соответственно в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, будет обозначен в настоящем документе как FimH(F71mut/F144mut).

25 В определенных вариантах осуществления FimH(F71mut) содержит аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из тирозина (Y) и триптофана (W), в положении, которое соответствует положению 71 в SEQ ID NO: 1.

В определенных вариантах осуществления FimH(F71mut) содержит тирозин (Y) в положении, которое соответствует положению 71 в SEQ ID NO: 1.

30 В определенных вариантах осуществления FimH(F71mut/F144mut) содержит аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из валина (V), изолейцина (I), лейцина (L), глицина (G), метионина (M) и аланина (A) в положении, которое соответствует положению 144 в SEQ ID NO: 1.

В определенных вариантах осуществления FimH(F71mut/F144mut) содержит валин (V) в положении, которое соответствует положению 144 в SEQ ID NO: 1.

В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один из лектиновых доменов FimH(F71mut) и FimH(F71mut/F144mut) имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut) содержит по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к тому, что лектиновый домен FimH имеет конформацию с низкой аффинностью к маннозе. В одном варианте осуществления FimH(F71mut) мутирован в положении, которое соответствует положению 71 в SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления FimH(F71mut/F144mut) мутирован в положениях, соответствующих положениям 71 и 144 в SEQ ID NO: 1.

Лектиновый домен FimH с низкой аффинностью к маннозе в данном контексте определен в настоящем документе как лектиновый домен FimH, связывающийся с маннозидным лигандом с константой диссоциации ( $K_D$ ) по меньшей мере 1000 нМ или выше, определенной с применением поверхностного плазмонного резонанса, например в условиях, указанных в примере 2. Лектиновый домен FimH с высокой аффинностью к маннозе определен в настоящем документе как лектиновый домен FimH, связывающийся с маннозидным лигандом с  $K_D$ , составляющей 100 нМ или ниже, при тех же условиях; обычно в эту категорию попадает FimH дикого типа. Лектиновые домены FimH с  $K_D$  от 100 нМ до 1000 нМ в этих условиях обозначены в настоящем документе как имеющие промежуточную аффинность к маннозе.

Термины «мутант», «мутация», «мутированный» или «замена», «замещенный» в данном контексте означают, что в указанном положении присутствует аминокислота, отличная от аминокислоты в соответствующей исходной молекуле, которая в настоящем документе представляет собой полипептид, содержащий лектиновый домен FimH с F в положениях 71 и 144. Такая исходная молекула может существовать физически в виде полипептида или в форме нуклеиновой кислоты, кодирующей такой полипептид, но может также просто существовать *in silico* или на бумаге в виде аминокислотной последовательности или соответствующей последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность. Таким образом, мутация или замена в этом контексте также считается присутствующей, например, если белок экспрессирован из нуклеиновой кислоты, которая была

синтезирована таким образом, что кодирует мутацию или замену, даже если нуклеиновая кислота, кодирующая соответствующую исходную молекулу, исходно фактически не была получена в процессе, например, когда молекула нуклеиновой кислоты была полностью получена посредством химического синтеза.

5 Предпочтительно мутация представляет собой замену одного аминокислотного остатка. Мутация предпочтительно представляет собой замену аминокислотного остатка, который соответствует по меньшей мере одному из положений 71 и 144 в SEQ ID NO: 1 соответственно. Предпочтительно мутация представляет собой замену фенилаланина (F) другой аминокислотой в положении, соответствующем положению 10 71 в SEQ ID NO: 1. Предпочтительно полипептид изобретения дополнительно содержит замену фенилаланина (F) другой аминокислотой в положении, соответствующем положению 144 в SEQ ID NO: 1. В FimH(F71mut) положение, которое соответствует положению 71 в SEQ ID NO: 1, предпочтительно заменяет аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из тирозина (Y) и триптофана (W). В 15 одном предпочтительном варианте осуществления FimH(F71mut) содержит замену фенилаланина (F) на тирозин (Y) в положении 71. В определенных вариантах осуществления FimH(F71mut) представляет собой не встречающийся в природе полипептид, который содержит тирозин в положении 71. В определенных вариантах осуществления FimH(F71mut) содержит тирозин в положении 71 вместо 20 встречающегося в природе фенилаланина (обозначаемого как FimH(F71Y)). В определенных вариантах осуществления FimH(F71mut) имеет тирозин в положении 71 вместо встречающейся в природе аминокислоты, отличной от фенилаланина (FimH(x71Y), где x может представлять собой аминокислоту, отличную от фенилаланина или тирозина в исходной молекуле).

25 В одном варианте осуществления FimH(F71mut/F144mut) содержит мутацию в положениях, соответствующих положениям 71 и 144 в SEQ ID NO: 1. Мутация в положении 71 предпочтительно представляет собой замену, как описано в настоящем документе. Мутация в положении 144 предпочтительно представляет собой замену аминокислотного остатка, который соответствует положению 144 в SEQ ID NO: 1. 30 Предпочтительно мутация представляет собой замену аминокислотного остатка фенилаланина (F) в положении, соответствующем положению 144 в SEQ ID NO: 1. Предпочтительно аминокислота в положении 144 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из валина (V), изолейцина (I), лейцина (L), глицина (G), метионина (M) и аланина (A). В одном предпочтительном варианте осуществления

FimH(F71mut/F144mut) включает в себя замену фенилаланина (F) на валин (V) в положении 144.

В определенных вариантах осуществления FimH(F71mut/F144mut) представляет собой не встречающийся в природе полипептид, который содержит тирозин в  
5 положении 71 и валин в положении 144. В определенных вариантах осуществления FimH(F71mut/F144mut) содержит тирозин в положении 71 вместо встречающегося в природе фенилаланина и валин в положении 144 вместо встречающегося в природе фенилаланина. В определенных вариантах осуществления FimH(F71mut/F144mut) имеет тирозин в положении 71 вместо встречающейся в природе аминокислоты,  
10 отличной от фенилаланина, а также валин в положении 144 вместо встречающейся в природе аминокислоты, отличной от фенилаланина.

Полноразмерный FimH (FimH<sub>FL</sub>) состоит из двух доменов: N-концевого лектинового домена (FimH<sub>LD</sub>), соединенного с С-концевым пилиновым доменом (FimH<sub>PD</sub>) с помощью линкера с короткой тетрапептидной петлей.  
15 В определенных вариантах осуществления изобретения полипептид, содержащий лектиновый домен FimH в соответствии с изобретением, не содержит пилинового домена FimH. В другом варианте осуществления изобретения полипептид, содержащий лектиновый домен FimH в соответствии с изобретением, дополнительно содержит пилиновый домен FimH. В одном варианте осуществления FimH(F71mut) или  
20 FimH(F71mut/F144mut) представляет собой полноразмерный полипептид FimH, в котором лектиновый домен FimH содержит аминокислотную последовательность, определенную в настоящем документе выше для FimH(F71mut) и FimH(F71mut/F144mut) соответственно. В определенных вариантах осуществления изобретения полипептид, содержащий лектиновый домен FimH в соответствии  
25 с изобретением, представляет собой слитый полипептид лектинового домена FimH, слитый с другим полипептидом, причем другой полипептид может представлять собой любой интересующий полипептид, и он не должен обязательно быть связан с FimH или быть ассоциирован с FimH в природе. В определенных вариантах осуществления полипептид, содержащий лектиновый домен FimH изобретения, представляет собой  
30 слитый полипептид, который дополнительно содержит пилиновый домен FimH и дополнительно содержит другой полипептид, причем другой полипептид может представлять собой любой интересующий полипептид, и он не обязательно должен быть связан с FimH или быть ассоциирован с FimH в природе. Слитые полипептиды

изобретения можно, например, также использовать в качестве иммуногенов для целей вакцинации.

В одном варианте осуществления полипептид FimH<sub>FL</sub> содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, посредством чего предпочтительно положения 71 или 71 и 144 содержат аминокислотные остатки, определенные выше для FimH(F71mut) и FimH(F71mut/F144mut) соответственно. В определенных вариантах осуществления полипептид FimH<sub>FL</sub> может содержать последовательность с SEQ ID NO: 2, за исключением F71Y и необязательно замены F144V, как описано в настоящем документе. В другом варианте осуществления полипептид представляет собой FimH<sub>FL</sub>, имеющий по меньшей мере около 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4 или предпочтительно по меньшей мере с ее аминокислотами 22–300, посредством чего положения 71 или 71 и 144 содержат аминокислотные остатки, определенные выше для FimH(F71mut) и FimH(F71mut/F144mut) соответственно. В определенных вариантах осуществления полипептид FimH<sub>FL</sub> может содержать последовательность с SEQ ID NO: 4 или по меньшей мере ее аминокислоты 22–300, за исключением замены F71Y и/или F144V, как описано в настоящем документе.

В определенных вариантах осуществления полипептид FimH<sub>FL</sub> содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 23–45 и 55, как описано в документе US 6,737,063, который полностью включен в настоящий документ, посредством чего положения 71 или 71 и 144 содержат аминокислотные остатки, определенные выше для FimH(F71mut) и FimH(F71mut/F144mut) соответственно.

Полипептиды FimH высоко консервативны между различными штаммами *E. coli*, а также высоко консервативны среди широкого диапазона грамотрицательных бактерий. Более того, аминокислотные изменения, происходящие между штаммами, по существу происходят в аналогичных аминокислотных положениях. Вследствие высокой консервативности FimH между штаммами *E. coli* полипептиды FimH из одного штамма способны индуцировать ответы антител, которые ингибируют или предотвращают связывание других штаммов *E. coli* с клетками посредством лектина FimH и/или обеспечивают защиту и/или лечение от инфекции, вызванной другими

штаммами *E. coli*. Соответственно, в одном варианте осуществления полипептид FimH<sub>FL</sub> содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере около 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5 или предпочтительно по меньшей мере ее аминокислоты 22–300, посредством чего положения 71 или 71 и 144 содержат аминокислотные остатки, определенные выше для FimH(F71mut) и FimH(F71mut/F144mut) соответственно. В определенных вариантах осуществления полипептид FimH<sub>FL</sub> может содержать последовательность с SEQ ID NO: 5 или по меньшей мере ее аминокислоты 22–300, за исключением замены F71Y и необязательно замены F144 V, как описано в настоящем документе. В другом варианте осуществления полипептид FimH<sub>FL</sub> содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере около 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6, посредством чего положения 71 или 71 и 144 содержат аминокислотные остатки, определенные выше для FimH(F71mut) и FimH(F71mut/F144mut) соответственно. В определенных вариантах осуществления полипептид FimH<sub>FL</sub> может содержать последовательность с SEQ ID NO: 6, за исключением замены F71Y и необязательно замены F144V, как описано в настоящем документе.

В определенных вариантах осуществления FimH предпочтительно представляет собой FimH *E. coli*.

В настоящем документе термин «периплазматический шаперон» определяется как белок, локализованный в периплазме бактерий, который способен образовывать комплексы с множеством шаперонсвязывающих белков посредством распознавания общего связывающего эпитопа (или эпитопов). Шапероны служат матрицами, на которых белки, экспортированные из бактериальной клетки в периплазму, складываются в свои нативные конформации. Связь шаперонсвязывающего белка с шапероном также служит для защиты связывающих белков от разложения протеазами, локализованными внутри периплазмы, повышает их растворимость в водном растворе и приводит к их последовательному правильному встраиванию в сборку пилей. Белки-шапероны представляют собой класс белков в грамотрицательных бактериях, которые участвуют в сборке пилей путем опосредования такого узла, но не включены в структуру. FimC представляет собой периплазматический белок-шаперон FimH. Полипептид FimC для применения в настоящем изобретении имеет аминокислотную последовательность, имеющую

по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или около 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. В определенных вариантах осуществления полипептид FimC имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или  
5 около 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 29, описанной в документе US6,737,063, который полностью включен в настоящий документ. Нековалентный комплекс FimC и FimH называется FimCH.

Соответственно, в дополнительном аспекте в изобретении предложен комплекс, содержащий полипептид, который содержит FimH(F71mut) или  
10 FimH(F71mut/F144mut), определенные в настоящем документе, и дополнительно содержит пилиновый домен FimH или полноразмерный FimH, определенные в настоящем документе, и полипептид FimC, определенный в настоящем документе.

В одном варианте осуществления изобретения лектиновые домены FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut) являются частью полипептида, дополнительно  
15 содержащего пилиновый домен FimH, причем полипептид связан в комплекс с FimC с образованием комплекса FimCH.

Авторы настоящей заявки создали несколько вариантов лектинового домена FimH с разными аминокислотными изменениями и протестировали их на эффективность в различных анализах (см. примеры).

20 Оба из описанных в настоящем документе FimH(F71mut) и FimH(F71mut/F144mut) были способны образовывать комплекс FimCH.

В одном варианте осуществления лектиновые домены FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut) являются частью полипептида FimH<sub>FL</sub>, имеющего по меньшей мере около 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности  
25 последовательности с SEQ ID NO: 2, который необязательно связан в комплекс с полипептидом FimC с образованием комплекса FimCH. Полипептид FimH<sub>FL</sub> в своей конечной форме, т. е. зрелый полипептид FimH<sub>FL</sub>, как правило, не включает в себя сигнальный пептид, который, например, показан как аминокислоты 1–21 SEQ ID NO: 4 и 5, т. е. следует понимать, что зрелый полипептид FimH<sub>FL</sub> SEQ ID NO: 4 или  
30 SEQ ID NO: 5 включает в себя аминокислоты 22–300 этих последовательностей и в то же время, как правило, не содержит их аминокислот 1–21. Для рекомбинантного получения полипептида FimH<sub>FL</sub> используют кодирование зрелого полипептида FimH<sub>FL</sub>, который включает в себя сигнальный пептид в рекомбинантной клетке-хозяине, для передачи через внутреннюю (цитоплазматическую) мембрану посредством общего

секреторного пути, обеспечивающего периплазматическое расположение полипептида (иногда называемого «периплазматической экспрессией»), но в конечном зрелом полипептиде FimH<sub>FL</sub>, выделенном и, например, используемом в фармацевтических композициях, сигнальный пептид, как правило, больше не присутствует в результате процессинга рекомбинантной клеткой, которая экспрессирует полипептид.

В одном варианте осуществления комплекс FimCH содержит или состоит из белка FimC, имеющего по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3, и белка FimH, содержащего лектиновый домен FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut), определенный в настоящем документе выше. В определенных вариантах осуществления комплекс FimCH содержит или состоит из белка FimC, имеющего по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3, и белка FimH или белка FimH<sub>FL</sub>, который содержит лектиновый домен FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut), определенные выше; таким образом, белок FimH<sub>FL</sub> предпочтительно содержит замену F92 (например, в SEQ ID NO: 4 или 5, которые все еще включают в себя сигнальный пептид). Необязательно комплекс FimCH содержит или состоит из белка FimC, имеющего по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3, и белка FimH, который содержит замену F71(Y) и F144(V) в лектиновом домене, или полноразмерного белка FimH, который содержит F92(Y) и замену F165(V) (например, в SEQ ID NO: 4 или 5, которые все еще включают в себя сигнальный пептид).

В полноразмерном FimH, который все еще будет включать в себя сигнальный пептид, аминокислотное положение 92 соответствует аминокислотному положению 71, а положение 165 соответствует аминокислотному положению 144 в лектиновом домене FimH. Специалисту в данной области будет понятно, как идентифицировать соответствующие аминокислотные положения в полноразмерных аминокислотных последовательностях FimH и в аминокислотных последовательностях лектинового домена FimH с использованием алгоритмов выравнивания аминокислот, определенных в настоящем документе выше.

В одном варианте осуществления комплексы, содержащие шаперон FimC *E. coli*, и полипептиды, содержащие FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut), могут быть образованы посредством совместной экспрессии FimH(F71mut)- или

FimH(F71mut/F144mut)-содержащих полипептидов вместе с FimC из рекомбинантной клетки.

В одном варианте осуществления комплекс FimCH содержит FimC, происходящий из одного бактериального штамма, тогда как FimH происходит из  
5 другого бактериального штамма. В другом варианте осуществления комплекс FimCH содержит FimC и FimH, оба из которых происходят из одного и того же бактериального штамма. В определенных вариантах осуществления FimH или FimC или оба FimH и FimC могут представлять собой искусственные последовательности не из фактических бактериальных изолятов, которые существуют в природе, например, они также могут  
10 быть основаны на консенсусных последовательностях или комбинациях природных изолятов.

В одном варианте осуществления комплекс FimCH содержит по меньшей мере один полипептид, который содержит His-метку. В одном варианте осуществления полноразмерный FimH, описанный в настоящем документе, содержит His-метку, или  
15 FimC, описанный в настоящем документе, содержит His-метку. Предпочтительно в комплексе FimCH FimC содержит His-метку. His-метка, используемая в настоящем документе, представляет собой вытягивание остатков гистидина (His), например шести остатков His, которые могут быть добавлены внутри или предпочтительно на N- или C-конец белка. Такая метка имеет хорошо известное применение для простоты очистки.

В дополнительном аспекте изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид, содержащий лектиновый домен FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut), определенный выше в настоящем документе. Полинуклеотиду может предшествовать промотор, функционально связанный с ним. В определенных вариантах осуществления промотор является эндогенным к кодирующей  
20 последовательности FimH. В определенных вариантах осуществления промотор представляет собой эндогенный промотор, приводящий к экспрессии FimH в бактериях семейства Enterobacteriaceae. В других вариантах осуществления промотор гетерологичен кодирующей последовательности FimH, например, известно, что в рекомбинантных системах экспрессии применяют сильный промотор, известный специалисту в данной области. Например, вектор pET-DUET, содержащий индуцибельный промотор Lac, можно применять для экспрессии полипептида FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut) изобретения и/или для экспрессии полипептида FimC. В случае индуцибельного промотора, такого как промотор Lac или промотор Tac, IPTG можно применять для индукции экспрессии. Предпочтительно  
30

полинуклеотид выделяют из его естественной среды. В определенных вариантах осуществления в изобретении предложен выделенный полинуклеотид в соответствии с изобретением. Полипептид может представлять собой рекомбинантный, синтетический или искусственный полинуклеотид. Полинуклеотид может быть представлен в любой

5 форме нуклеиновой кислоты, например ДНК или РНК, предпочтительно ДНК. Полинуклеотид может содержать один или более нуклеотидов, которые не присутствуют во встречающемся в природе полинуклеотиде FimH. Предпочтительно полинуклеотид имеет один или более нуклеотидов, которые не присутствуют во встречающемся в природе полинуклеотиде, кодирующем FimH, на его 5'-конце и/или

10 3'-конце. Последовательностям кодируемого зрелого FimC и/или FimH может предпочтительно предшествовать сигнальный пептид в полипептидах, кодируемых соответствующими полинуклеотидами, и сигнальные пептиды могут представлять собой эндогенные сигнальные пептиды для полипептидов FimC и/или FimH (т. е. сигнальные пептиды, встречающиеся в природе для этих белков) соответственно, или

15 они могут представлять собой гетерологичные сигнальные пептиды, т. е. сигнальные пептиды из других белков или синтетические сигнальные пептиды. Сигнальные пептиды можно использовать для периплазматической экспрессии, но они обычно расщепляются и не присутствуют в конечном полученном и очищенном FimC и/или FimH соответственно.

20 В дополнительном аспекте изобретение относится к вектору, содержащему полинуклеотид, кодирующий полипептид FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut) изобретения. В определенных вариантах осуществления вектор представляет собой плазмиду или вирусный вектор, предпочтительно плазмиду. Вектор предпочтительно находится в форме ДНК, например ДНК-плазмиды. В определенных вариантах

25 осуществления вектор содержит полинуклеотид изобретения, функционально связанный с промотором, что означает, что полинуклеотид находится под контролем промотора. Промотор может быть расположен выше по потоку от полинуклеотида, который кодирует полипептид изобретения, например в экспрессионной кассете в плазмиде.

30 В еще одном дополнительном аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей полинуклеотид, кодирующий полипептид FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut) изобретения, или вектор, описанный в настоящем документе. Полинуклеотид, кодирующий полипептид FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut) изобретения, может быть введен в клетку обычными способами молекулярной

биологии. Такая нуклеиновая кислота может быть экстрахромосомной, например на плазмиде или другом векторе, или она может быть встроена в геном клетки-хозяина. Предпочтительно нуклеиновая кислота, кодирующая белок, функционально связана с последовательностью, приводящей к экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине, такой как 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.

Клетка-хозяин может представлять собой выделенную клетку. Клетка-хозяин может быть культивирована в культуральной среде, например в культуральном сосуде, таком как биореактор. Клетка может представлять собой любую микробную, прокариотическую или эукариотическую клетку, которая приемлема для экспрессии полинуклеотида, кодирующего полипептид FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut) изобретения. Предпочтительно клетка-хозяин представляет собой бактериальную клетку-хозяина. Предпочтительно бактериальная клетка-хозяин представляет собой грамотрицательную бактериальную клетку. Предпочтительно клетка-хозяин выбрана из *E. coli* и *Klebsiella*. Предпочтительно клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

При необходимости и/или если требуется, полипептид FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut) изобретения или полинуклеотид, кодирующий полипептид FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut) изобретения, может быть включен в фармацевтически активную смесь посредством добавления фармацевтически приемлемого носителя.

Соответственно, в дополнительном аспекте в изобретении также предложена композиция, предпочтительно фармацевтическая композиция, содержащая полипептид FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut) изобретения, или полинуклеотид, кодирующий полипептид FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut) изобретения.

(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, глицеринмоноостеарат, тальк, хлорид натрия, сухое снятое молоко, глицерин, пропилен-гликоль, вода, этанол и т. д. Примеры приемлемых фармацевтических носителей известны и, например, описаны в справочниках и руководствах.

5 В определенных вариантах осуществления композиции изобретения дополнительно содержат один или более буферов, например солевой раствор с трис-буфером, фосфатный буфер, HEPES или буфер с глутамат-фосфатом сахарозы.

10 В определенных вариантах осуществления композиции изобретения дополнительно содержат одну или более солей, например трис-гидрохлорид, хлорид натрия, хлорид кальция, хлорид калия, фосфат натрия, глутамат мононатрия и соли алюминия (например, гидроксид алюминия, фосфат алюминия, сульфат алюминия или смесь таких алюминиевых солей).

Композиции изобретения можно применять для выявления иммунного ответа у хозяина, которому вводят композицию, т. е. являются иммуногенными. Таким образом,  
15 композиции изобретения можно применять в качестве вакцин против инфекции, вызванной бактерией семейства *Enterobacteriaceae*, предпочтительно против инфекции, вызванной *Klebsiella* или *E. coli*, более предпочтительно *E. coli*, и, таким образом, они могут необязательно содержать любые дополнительные компоненты, подходящие для применения в вакцине. Например, дополнительный необязательный компонент  
20 композиции вакцины представляет собой адъювант, описанный в настоящем документе.

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

В определенных вариантах осуществления композиции изобретения составляют таким образом, чтобы они подходили для предполагаемого способа введения субъекту.  
30 Например, композиции изобретения могут быть составлены так, чтобы они подходили для подкожного, парентерального, перорального, внутрикожного, трансдермального, колоректального, внутрибрюшинного, интравагинального или ректального введения. В конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция может быть составлена для внутривенного, перорального, буккального, внутрибрюшинного,

интраназального, интратрахеального, подкожного, внутримышечного, местного, внутрикожного, трансдермального или легочного введения, предпочтительно внутримышечного введения.

5 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  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  или около  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ); хранить в условиях холодильника (например, при температуре около  $2\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ , например около  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) или хранить при комнатной температуре.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция изобретения, описанная в настоящем документе, дополнительно содержит адъювант. В настоящем документе термин «адъювант» относится к соединению, которое при введении вместе или в составе композиции изобретения усиливает и/или ускоряет иммунный ответ на  $\text{FimH}$ , но когда адъювантное соединение вводят отдельно, оно не вызывает иммунного ответа на конъюгат и/или  $\text{FimH}$ . Адъюванты могут усиливать иммунный ответ по нескольким механизмам, включая, например, рекрутирование лимфоцитов, стимуляцию В и/или Т-клеток и стимуляцию антигенпрезентирующих клеток.

В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции изобретения содержат адъювант или вводятся в комбинации с ним. Адъювант для введения в комбинации с композицией изобретения можно вводить до, одновременно с или после введения иммуногенных композиций. В определенных вариантах осуществления  $\text{FimH}(\text{F71mut})$  или  $\text{FimH}(\text{F71mut}/\text{F144mut})$  и адъювант вводят в форме одной композиции.

25 В других вариантах осуществления фармацевтические композиции изобретения не содержат адъювант и не вводятся в комбинации с ним.

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 с алюмом и наноалюмовые составы), фосфат кальция (например, Masson JD et al, 2017, Expert Rev Vaccines 16: 289–299), монофосфориллипид А (MPL) или 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А (3D-MPL) (см., например, патент Великобритании GB2220211, EP0971739, EP1194166, US6491919), AS01, AS02, AS03 и AS04 (все GlaxoSmithKline; см., например, EP1126876, US7357936 в отношении AS04, EP0671948, EP0761231,

US5750110 в отношении AS02), имидазопиридиновые соединения (см. WO2007/109812), имидазохиноксалиновые соединения (см. WO2007/109813), дельта-инулин (например, Petrovsky N and PD Cooper, 2015, *Vaccine* 33: 5920–5926), STING-активирующие синтетические циклические динуклеотиды (например, US20150056224), комбинации лецитина и гомополимеров карбомеров (например, US6676958) и сапонины, такие как Quil A и QS21 (см., например, Zhu D and W Tuo, 2016, *Nat Prod Chem Res* 3: e113 (doi:10.4172/2329–6836.1000e113), необязательно в комбинации с QS7 (см. Kensil et al., *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell&Newman, Plenum Press, NY, 1995); 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 антителом, так и опосредованные клетками иммунные ответы на широкий диапазон антигенов из разных источников. В определенных вариантах осуществления адъювант представляет собой AS01, предпочтительно AS01B. S01 представляет собой адъювантную систему, содержащую MPL (3-О-дезацил-4'-монофосфориллипид А), 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, 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 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 содержит сапонины, предпочтительно экстрагируемую водой фракцию сапонинов, полученную из *Quillaja 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, 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) наночастицы, виросомы, адсорбированные квасцы, водные составы (AF) и т. п., представляющие собой различные системы доставки для иммуномодулирующих молекул в адъюванте и/или для иммуногенов (см., например, Reed et al., 2013, выше; Alving CR et al, 2012, Curr Opin Immunol 24: 310–315).

Имуностимулирующий агонист TLR4 можно необязательно комбинировать с другими иммуномодулирующими компонентами, такими как сапонины (например, QuilA, QS7, QS21, Matrix M, Iscoms, Iscomatrix и т. д.), соли алюминия, активаторы

других TLR (например, имидазохинолины, флагеллин, CpG, аналоги дцРНК 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-  
5 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  
10 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 X; дисахаридный липид А; гептаацильный липид А; гексаацильный липид А; пентаацильный липид А; тетраацильный липид А, например тетраацильный предшественник липида А,  
15 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  
20 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 один C12 и один C14, присоединенный 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 аминокислотного сахара, например остатками  
30 галактозамина, с обеспечением содержания 2-дезокси-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

5 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

10 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

15 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

20 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

25 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,

30 2013, см. выше, эта структура обозначена как MPL®, но на самом деле изображает структуру 3D-MPL). Примеры липида А (аналоги, производные) в соответствии с изобретением 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)), 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, 5 [avantilipids.com/divisions/adjuvants](http://avantilipids.com/divisions/adjuvants), где также представлены структуры этих молекул), E6020 (номер CAS 287180-63-6), ONO4007, OM-174 и т. п. Примеры химических структур 3D-MPL, RC529, PET-липиды А, 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 10 определенных предпочтительных вариантах осуществления адъювант агониста TLR4 содержит аналог или производное липида А, выбранное из 3D-MPL, GLA или SLA.

Примеры адъювантов, содержащих аналог или производное липида А, 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, 25 US 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, Johnson et al., 1999, *J Med Chem*, 42:4640-4649 и Ulrich and Myers, 1995, *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*; Powell and Newman, Eds.; Plenum: New York, 495–524.

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

В другом аспекте изобретение относится к полипептиду FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut) изобретения, полинуклеотиду, кодирующему полипептид

FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut) изобретения, или к фармацевтической композиции изобретения для применения в качестве лекарственного средства.

В другом аспекте изобретение относится к применению полипептида FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut) изобретения, полинуклеотида, кодирующего полипептид FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut) изобретения, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, в качестве лекарственного средства для индукции иммунного ответа против грамотрицательных бактерий семейства *Enterobacteriaceae*.

В настоящем документе термины «иммуноген», «иммуногенный» или «антиген» применяются взаимозаменяемо для описания молекулы, способной индуцировать иммунологический ответ против самой себя при введении реципиенту либо отдельно, в сочетании с адъювантом, либо представленной 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 другом аспекте изобретение относится к полипептиду FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut) изобретения, полинуклеотиду, кодирующему полипептид FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut) изобретения, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, для применения в индукции иммунного ответа против бактериальной инфекции, вызванной грамотрицательной бактерией семейства *Enterobacteriaceae*. В определенных вариантах осуществления бактериальная инфекция вызвана *Klebsiella* spp. или *E. coli*. В предпочтительном варианте осуществления бактериальная инфекция вызвана *E. coli*. Таким образом, в одном варианте осуществления изобретение относится к применению полипептида FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut) изобретения, полипептида FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut) изобретения или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, в качестве лекарственного средства для индукции иммунного ответа против *E. coli* или *Klebsiella*, предпочтительно *E. coli*.

В предпочтительных вариантах осуществления бактериальная инфекция, вызванная грамотрицательной бактерией семейства *Enterobacteriaceae*, представляет собой инфекцию *E. coli*, например ExPEC, например, инфекция может представлять собой инфекцию мочевыводящих путей (ИМП). В одном варианте осуществления изобретение относится к полипептиду, содержащему лектиновый домен FimH,

описанному в настоящем документе, полинуклеотиду, описанному в настоящем документе, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, для применения в лечении, профилактике или подавлении у субъекта симптомов и/или последствий, связанных с ИМП. В определенных вариантах осуществления указанная ИМП представляет собой рецидивирующую ИМП (рИМП). *E. coli* является одним из основных возбудителей ИМП и рИМП, которые представляют собой важную проблему для здоровья молодых женщин и пожилых людей. Таким образом, в предпочтительных вариантах осуществления бактериальная инфекция представляет собой ИМП или рИМП, вызванные *E. coli*.

10 В одном варианте осуществления изобретение относится к способу лечения, профилактики или подавления симптомов и/или последствий, ассоциированных с состоянием, связанным с энтеробактериями, у субъекта, нуждающегося в этом. Способ включает в себя введение субъекту эффективного количества полипептида FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut) изобретения, полинуклеотида, кодирующего полипептид FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut) изобретения, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе. Предпочтительно введение индуцирует иммунный ответ, который эффективен при лечении или профилактике состояния, связанного с энтеробактериями. Предпочтительно состояние, связанное с энтеробактериями, представляет собой инфекцию мочеполовых путей, более конкретно ИМП или рИМП.

20 Изобретение также относится к применению полипептида FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut) изобретения, полинуклеотида, кодирующего полипептид FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut) изобретения, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, для получения лекарственного средства для лечения, профилактики или подавления бактериальной инфекции, вызванной грамотрицательными бактериями семейства *Enterobacteriaceae*, предпочтительно бактериальной инфекции, вызванной *E. coli*. Более предпочтительно бактериальная инфекция представляет собой ИМП или рецидивирующую ИМП (рИМП), вызванные *E. coli*.

30 Изобретение также относится к способу получения полипептида изобретения, включающему в себя культивирование рекомбинантной клетки, содержащей полинуклеотид, кодирующий полипептид FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut) изобретения, и/или вектор, описанный в настоящем документе, причем культивирование проводят в условиях, способствующих получению полипептида.

В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя извлечение полипептида, который необязательно вводят в состав фармацевтической композиции.

5 Предпочтительно клетку *E. coli*, например производное *E. coli* BL21, применяют в способе получения полипептида FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut) изобретения.

10 Извлечение полипептида предпочтительно включает в себя стадию очистки и/или выделения, которую можно проводить с применением обычных способов очистки белка, хорошо известных в данной области. Такие способы могут, например, включать в себя осаждение сульфатом аммония или этанолом, кислотную экстракцию, анионообменную и/или катионообменную хроматографию, хроматографию на фосфоцеллюлозе, гидрофобную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию на гидроксипатите и/или хроматографию на лектине.

15 В типичных примерах такой очистки и/или выделения может использоваться антитело к белку или к His-метке или отщепляемый лидер или хвост, который экспрессируется в составе структуры белка. В определенных вариантах осуществления полипептид, описанный в настоящем документе, содержит His-метку, и его очищают такими способами, как аффинная очистка ИАС (аффинная хроматография на иммобилизованном ионе металла). В определенных вариантах осуществления 20 полипептиды, описанные в настоящем документе, не содержат His-метку, и в таких случаях очистку можно проводить посредством хроматографии, например ионообменной хроматографии (ИЕХ), гидрофобной хроматографии (НГХ) и/или эксклюзионной хроматографии.

## 25 Определения

В разделе «Предпосылки создания изобретения» и в тексте настоящей заявки приведены цитаты или описания различных публикаций, статей и патентов; причем каждая из этих ссылок полностью включена в настоящее описание путем ссылки. Описание документов, актов, материалов, устройств, изделий и т. п., которые были 30 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.

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.

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».

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 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 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 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».

В настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» 5 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. Термин «фармацевтически приемлемый носитель» может относиться к любому 10 эксципиенту, разбавителю, наполнителю, соли, буферу, стабилизатору, солубилизатору, 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 фармацевтически приемлемого носителя будут зависеть от способа введения для 15 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, например альбумин сыворотки человека (HSA) или другие приемлемые белки и 20 восстанавливающие сахара.

В настоящем документе термин «эффективное количество» относится к количеству активного ингредиента или компонента, которое вызывает необходимый биологический или медицинский ответ у пациента. «Эффективное количество» может 25 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 30 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 субъекту меньше 18 лет, например 0–18 лет, например 9–18 лет или 12–18 лет. В определенных вариантах осуществления субъект представляет собой человеческого индивида от около 18 до около 50 лет. В определенных вариантах осуществления субъект представляет собой человека от около 50 до около 100 лет, например 50–85 лет, 60–80 лет, 50 лет или старше, 55 лет или старше, 60 лет или старше, 65 лет или старше, 70 лет или старше, 75 лет или старше, 80 лет или старше, 85 лет или старше. В некоторых вариантах осуществления субъект не старше 85 лет, не старше 80 лет, не старше 75 лет. В определенных вариантах осуществления человеческий индивид относится к мужскому полу. В определенных вариантах осуществления человеческий индивид относится к женскому полу.

В настоящем документе термин «ИМП» означает инфекцию почек, мочевого пузыря, мочеточника или уретры. Симптомы ИМП могут включать в себя одно или более из ощущения жжения при мочеиспускании, частых или интенсивных позывов к мочеиспусканию, неполного опорожнения мочевого пузыря, ненормального вида и/или запаха мочи, повышенного содержания лейкоцитов в моче, чувства усталости или дрожи, чувства дезориентации, лихорадки или озноба, недомогания, боли или ощущения давления в спине, нижней части живота, тазе или мочевом пузыре. Однако у некоторых пациентов симптомы могут отсутствовать или быть неспецифическими. Последствия ИМП могут включать в себя системные осложнения, такие как инвазивное заболевание и сепсис. В определенных вариантах осуществления ИМП документируется клинически и/или микробиологически, например подтверждается бактериальным посевом мочи и/или молекулярными или другими способами. В определенных вариантах осуществления субъект представляет собой человека, у которого ранее была или в настоящее время имеется ИМП. В определенных вариантах осуществления у субъекта была ИМП в течение последних двух лет, последнего года или последних 6 месяцев. В определенных вариантах осуществления у субъекта была или в настоящее время имеется рецидивирующая инфекция мочевыводящих путей (рИМП). В настоящем документе термин «рИМП» означает по меньшей мере две инфекции в течение шести месяцев или по меньшей мере три инфекции в течение одного года. В определенных вариантах осуществления субъект, которому вводят FimH(F71mut) или FimH(F71mut/F144mut), комплекс FimCH изобретения, слитый полипептид изобретения или композицию изобретения, страдал

по меньшей мере двумя ИМП в течение последних двух лет, в течение последнего года или в течение последних шести месяцев. В определенных вариантах осуществления субъект страдал осложненной формой ИМП. В настоящем документе термин «осложненная форма ИМП» означает ИМП, связанную с таким состоянием, как структурные или функциональные аномалии мочеполового тракта или наличие основного заболевания. В определенных вариантах осуществления ИМП является причиной повышенного количества лейкоцитов в моче или других аномалий мочи. В определенных вариантах осуществления у субъекта с ИМП имеется некоторое количество бактерий в моче, т. е. моча не стерильна, например, количество бактериальных клеток составляет по меньшей мере около 10 клеток/мл, по меньшей мере около 100 клеток/мл, по меньшей мере около  $10^3$  клеток/мл, например, по меньшей мере около  $10^4$  клеток/мл, например, по меньшей мере около  $10^5$  клеток/мл.

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.

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

Слово «около» или «приблизительно» при использовании в связи с числовым значением (например, около 10) предпочтительно означает, что значение может составлять данное значение (10) и значения, больше или меньше на 10%, предпочтительно больше или меньше на 5% от значения.

Термины «гомология», «идентичность последовательностей» и т. п. применяются в настоящем документе взаимозаменяемо. Идентичность последовательности в настоящем документе определена как соотношение между двумя или более аминокислотными (полипептидными или белковыми) последовательностями или двумя или более последовательностями нуклеиновых кислот (полинуклеотидов), определяемое посредством сравнения последовательностей. В данной области «идентичность» также означает степень родства последовательностей между последовательностями аминокислот или нуклеиновых кислот, в зависимости от ситуации, которая определяется соответствием между цепочками таких 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 разной 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). GAP использует алгоритм глобального выравнивания Нидлмана и Вунша для выравнивания двух последовательностей по всей их длине (полной длине), обеспечивая максимальное количество совпадений и сводя к минимуму количество пробелов. Глобальное выравнивание удобно использовать для определения идентичности последовательностей, когда две последовательности имеют одинаковую длину. Как правило, используются параметры GAP по умолчанию со штрафом за создание гэпа = 50 (нуклеотиды)/8 (белки) и штрафом за удлинение гэпа = 3 (нуклеотиды)/2 (белки). Для нуклеотидов применяемой по умолчанию матрицей оценок является nwsgapdna, а для белков матрицей оценок по умолчанию является Blosum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 915–919). Выравнивание последовательностей и баллы процентной идентичности последовательностей можно определить с помощью компьютерных программ, таких как пакет GCG Wisconsin, версия 10.3, доступный от Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752, США, или с применением программного обеспечения с открытым исходным кодом, например, программа «игла» (применяется глобальный алгоритм Нидлмана — Вунша) или «вода» (применяется локальный алгоритм Смита — Уотермана) в EmbossWIN версии 2.10.0, применяя те же параметры, что и для GAP выше, или применяя настройки по умолчанию (как для «иглы», так и для «воды»), а также для выравнивания белков и ДНК штраф за открытие гэпа по умолчанию составляет 10,0, а штраф за удлинение гэпа по умолчанию

составляет 0,5; матрицами оценок по умолчанию являются Blosum62 для белков и DNAFull для ДНК). Когда последовательности имеют существенно различающиеся общие длины, предпочтительными являются локальные выравнивания, например, с применением алгоритма Смита — Уотермана.

5           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 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/>.

## 25   ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

**Таблица 1.** Последовательности

Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO:
Последовательность FimH <sub>LD</sub> (FimH <sub>LD</sub> 23–10)	FACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLST QIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGS SYFPFTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAI KAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTG	1
Последовательность FimH <sub>t</sub>	FACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLST QIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGS SYFPFTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAI KAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG CDVSARDVTVTLDPYPGSVPIPLTVYCAKSNLGYLST TADAGNSIFTNTASFSQAQGVGVQLTRNGTIIIPANNTVSL GAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQ	2

Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO:
Полноразмерный FimC	GVALGATRVIIYPAGQKQVQLAVTNNDENSTYLIQSWVENA DGVKDGFRFIVTPPLFAMKGGKENTLRILDATNNQLPQDRE SLFWMNVKAI PSMKSKLTENTLQLAII SRIKLYYRPAKL ALPPDQAAEKLRFRRSANSLLINPTPYLTVTELNAGAR VLENALVPPMGESTVKLPSDAGSNITYRTINDYGALTPKM TGVME	3
Пример последовательности FimH <sub>23-10</sub> (полноразмерного)	MKRVITLFAVLLMGWSVNAWSFACTANGTAIPIGGGSAN VYVNLAPAVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQ RGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRT DKPWPVALYLTVPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNS DDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLDPYRGSV PIPLTVYCAKSQNLGYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQ GVGVQLTRNGTII PANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYART GGQVTAGNVQSIIGVTFVYQ	4
SEQ ID NO: 2 из US 6,500,434 (пример последовательности полноразмерного FimH)	MKRVITLFAVLLMGWSVNAWSFACTANGTAIPIGGGSAN VYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQ RGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRT DKPWPVALYLTVPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNS DDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLDPYRGSV PIPLTVYCAKSQNLGYLSGTHADAGNSIFTNTASFSPAQ GVGVQLTRNGTII PANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYART GGQVTAGNVQSIIGVTFVTQ	5
SEQ ID NO: 29 из US 6,737,063 (пример последовательности FimH с усечением на N-конце)	FACTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLST QIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGS SYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTVPVSSAGGLVI KAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG CDVSARDVTVTLDPYRGSVPIPLTVYCAKSQNLGYLSGT HADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPTNNTVSL GAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQ	6
Пример последовательности FimH <sub>LD</sub>	FACTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLST QIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGS SYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTVPVSSAGGLVI KAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGG	7

Другие примеры последовательностей полипептидов FimH описаны в US6,737,063, например, любая из SEQ ID NO: 23–45 или 55, приведенная в указанном документе, и все они включены в настоящий документ путем ссылки.

5

## 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.

10

Чтобы понять влияние конформационных изменений FimH на эффективность вакцины, были разработаны несколько вариантов FimH, содержащих разные мутации, которые потенциально могут заблокировать белок в низкоаффинном состоянии, с целью выявления улучшенных вариантов FimH, которые индуцируют функциональные

15

антитела, способные снижать бактериальную адгезию и заселение мочевого пузыря. Чтобы оптимизировать шансы нахождения приемлемого варианта лектинового домена FimH, были выбраны варианты с другим спрогнозированным механизмом действия. Ранее описанные мутанты FimH\_Q133K и FimH\_R60P, а также FimH дикого типа (WT) 5 были взяты в качестве контроля.

### **Пример 1. Способность индуцировать ингибирующие антитела**

Было показано, что антитела, создаваемые против FimH в низкоаффинной конформации, способны блокировать бактериальную клетку и снижать образование 10 колоний в мочевом пузыре. Поэтому в качестве первой стадии авторы настоящего изобретения оценивали функциональность антител, индуцированных разными вариантами FimH, заблокированными в низкоаффинной конформации, с помощью анализа ингибирования адгезии (AIA).

### 15 Материалы и методы

#### *Разработка и экспрессия FimH*

FimC и FimH экспрессировали в векторе pET-DUET или pET-22b с применением гетерологичных сигнальных последовательностей для экспрессии в периплазме и С-концевой His-метки на FimC для аффинной очистки с помощью аффинной 20 хроматографии на иммобилизованном ионе металла (ИМАС). Экспрессию индуцировали с применением IPTG и белок экстрагировали и очищали с помощью очистки ИМАС (Talon).

#### *Иммунизация*

25 Крысам Wistar проводили 4 внутримышечные иммунизации в дни 0, 7, 10 и 18 с использованием разных вариантов FimH (60 мкг каждого варианта/доза) в комбинации с адьювантом, отличным от адьюванта Фрейнда (28-дневная модель для крыс Speedy, Eurogentec). Функциональность сывороточных антител исследовали в день 0 (до иммунизации) и день 28 (после иммунизации) с помощью анализа 30 ингибирования адгезии (AIA), как описано ниже.

#### *Анализ ингибирования адгезии (AIA)*

Бактерии (штамм *E. coli* J96) помечали флуоресцеина изотиоцианатом (FITC). Меченые бактерии инкубировали с уротелиальными клетками мочевого пузыря (клеточная линия

5637) в течение 1 ч при 37 °С. % прикрепившихся бактерий измеряли посредством проточной цитометрии. Для оценки ингибирования сыворотки бактерии предварительно инкубировали с образцами сыворотки в течение 30 минут при 37 °С, а затем смешивали с клетками 5637.

5

#### *Твердофазный ИФА*

96-луночные планшеты покрывали в течение ночи 1 мкг/мл FimH. После промывки покрытые лунки инкубировали с блокирующим буфером [фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) + 2% бычий сывороточный альбумин (BSA)] в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывки PBS + 0,05% Tween 20 в планшеты добавляли сыворотку, которую затем инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывки в каждую лунку добавляли козье антикрысиное антитело, конъюгированное с пероксидазой хрена, разведенное в PBS с 2% BSA, на 1 час при комнатной температуре. После окончательной промывки реакцию развивали с тетраметилбензидиновым субстратом. Реакцию останавливали 1 М фосфорной кислотой и измеряли поглощение при 450 нм.

10

15

#### Результаты

Ингибирующие титры сывороточных антител рассчитывали как концентрацию полумаксимального ингибирования (IC50) на основе 4-параметрической логистической (4PL) регрессионной модели. Кроме того, посредством твердофазного ИФА оценивали уровни сывороточных антител, индуцированных разными вариантами FimH (общий IgG). Титры IC50, определяемые как полумаксимальная эффективная концентрация, рассчитывали на основе дублирующих кривых 6-этапного титрования, которые анализировали с помощью модели нелинейной регрессии 4PL.

20

25

В предварительном эксперименте несколько разных вариантов FimH тестировали на их способность индуцировать ингибирующие антитела. Как показано на Фиг. 1А, варианты FimH(F71Y), FimH(F144V) индуцировали самые высокие уровни функциональных антител. Вариант FimH(F144V) ранее был описан в заявке на патент EP № 20152217, поданной от Janssen Pharmaceuticals, Inc. 16 января 2020 г., которая включена в настоящий документ путем ссылки. Однако до настоящего изобретения было неожиданно и совершенно непредсказуемо, что FimH(F71Y) будет индуцировать аналогичные высокие уровни ингибирующих антител.

30

Для подтверждения предварительных результатов анализ АІА повторяли с большим количеством животных; в этом эксперименте было подтверждено, что как FimH(F71Y), так и FimH(F144V) надежно способны индуцировать высокие уровни ингибирующих антител (Фиг. 1Б).

5

Варианты FimH(F71Y) и FimH(F144V), по-видимому, заблокированы в низкоаффинной конформации посредством разных механизмов, которые индуцируют конформационные изменения связывающего кармана. Замена в варианте FimH(F71Y) предотвращает свертывание остатка в гидрофобный карман (расслабленное состояние), что делает напряженное состояние более благоприятным, тогда как в варианте FimH(F144V) замена расположена относительно близко к связывающему маннозу карману, который стабилизирует низкоаффинную конформацию. Поскольку конформационные изменения до низкоаффинных состояний вызваны этими двумя разными механизмами, мы предположили, что лектиновый домен, содержащий замену как F71Y, так и F144V, может быть еще более стабильно заблокирован в низкоаффинной конформации, что обеспечит дополнительное преимущество для варианта FimH такого рода. Чтобы проверить эту гипотезу, авторы настоящего изобретения создали двойной мутант FimH, который включает в себя замену как F71Y, так и F144V в его лектиновом домене (FimH(F71Y/F144V)). Как показано на Фиг. 1Б, FimH(F71Y/F144V) в равной степени был способен индуцировать высокие уровни ингибирующих антител.

На основании этих результатов FimH(F71Y) и FimH(F71Y/F144V) были выбраны в качестве ведущих кандидатов. Их характеристики были дополнительно проанализированы, как описано ниже.

25

### **Пример 2. Разработка новых вариантов — данные SPR**

#### *SPR*

Чтобы получить подробное представление об аффинности связывания и кинетике взаимодействия вариантов лектинового домена FimH с н-гептил- $\alpha$ -D-маннопиранозидным лигандом, были проведены измерения поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Вкратце, варианты FimH титровали в поверхность маннозидного лиганда 5 (Rabbani S et al., J Biol. Chem., 2018, 293(5):1835–1849) с максимальными концентрациями 3 или 10 мкМ в HBS-N (0,01 М HEPES, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05% поверхностно-активного вещества P20). Белки

30

вводили в количестве от 0,12 до 10 мкМ или от 0,036 до 3,0 мкМ с применением кинетической инъекции за один цикл.

### *Результаты*

5 Ранее описанные мутанты FimH\_Q133K и FimH\_R60P имеют мутацию во взаимодействующих с маннозой остатках в кармане связывания. Было спрогнозировано, что эти мутации непосредственно влияют на взаимодействие по связыванию с маннозой. Эти мутанты были взяты в качестве положительных контролей. Двойной мутант R60P\_Q133K был взят для проверки потенциально  
10 усиленных эффектов. Дополнительно в качестве отрицательного контроля использовали лектиновый домен FimH дикого типа (WT).

Сродство вариантов к связыванию с маннозой оценивали с помощью SPR. Полученные результаты представлены в таблице 2. Как и ожидалось, варианты лектинового домена, имеющие мутации в связывающем маннозид кармане FimH (Q133K и R60P\_Q133K),  
15 вообще не связывались с маннозидом. Мутант R60P, как и ожидалось, показал низкую аффинность к маннозиду.

Несмотря на способность индуцировать высокие уровни ингибирующих антител, вариант, содержащий замену F71Y, по-прежнему демонстрировал некоторую  
20 аффинность к маннозиду, что указывает на то, что эта мутация не полностью устраняла связывание с маннозидом. В вариантах лектинового домена FimH, содержащих замену F144V, связывание с маннозидом было полностью устранено (как ранее было раскрыто для единственного мутанта F144V в заявке на патент EP № 20152217, поданной от  
25 Janssen Pharmaceuticals, Inc. 16 января 2020 г., включенной в настоящий документ путем ссылки). У мутанта, включающего в себя как F71Y, так и F144V, связывание с маннозидом также было полностью устранено.

**Таблица 2.** Измерения аффинности к маннозиду вариантов FimH<sub>LD</sub>

<b>Вариант</b>	<b>Аффинность*</b>
F144V	Нет связывания
F71Y	Низкая аффинность
F144V/F71Y	Нет связывания
R60P	Низкая аффинность
R60P-Q133K	Нет связывания
Q133K	Нет связывания
FimH_LD wt	Высокая аффинность

\* Низкая аффинность  $K_D \geq 1000$  нМ; средняя аффинность  $K_D$  от 100 до 1000 нМ; высокая аффинность  $K_D \leq 100$  нМ

5 **Пример 3.** *Способность к связыванию характеристических ингибирующих мАт 475 и 926*

Мутации в лектиновом домене FimH могут вызывать потерю эпитопов, которые имеют решающее значение для индукции сильного и функционального иммунного ответа, таких как эпитопы, присутствующие в связывающем кармане FimH. Чтобы убедиться в том, что целостность связывающего кармана не была нарушена описанными в настоящем документе мутациями, оценивали связывание моноклональных антител (мАт) mAb475 и mAb926 с мутантными лектиновыми доменами FimH. mAb475 и mAb926 распознают перекрывающиеся, но разные эпитопы в лектиновом домене FimH внутри маннозо-связывающего кармана FimH (Kisiela et al. 2013 & 2015).

15 *Результаты*

Мутированные лектиновые домены FimH ранее были описаны в WO02102974. В WO02102974 описан обширный перечень возможных мутаций, в основном неуказанных мутаций (предполагается 65 возможных сайтов мутаций в лектиновом домене FimH, который имеет длину приблизительно 159 аминокислот). Однако в WO 02102974 указано, что лектиновые домены FimH, имеющие аминокислотную замену в положениях 54, 133 или 135, являются наиболее многообещающими кандидатами, при этом FimH\_Q133K явно упоминается как наиболее предпочтительный вариант. Поэтому было достаточно неожиданно, что FimH-23-10\_Q133K не распознавался функциональным mAb475, что указывает на проблемы с целостностью связывающего кармана (таблица 3). В отличие от этого, оба из FimH(F71Y) и FimH(F144V) распознавались как mAb475, так и mAb926, что указывает на то, что связывающий карман оставался полностью интактным (таблица 3). Дополнительно двойной мутант FimH(F71Y/F144V) все еще распознавался обоими антителами, что указывает на то, что связывающий карман также оставался интактным в этом двойном мутанте (таблица 3).

**Таблица 3.** Способность к связыванию характеристических ингибирующих mAb 475 и 926

Вариант	Целостность связывающего кармана	
	mAb 475	mAb 926
F144V	Связывание	Связывание
F71Y	Связывание	Связывание
F71Y/F144V	Связывание	Связывание
R60P	Связывание	Связывание
R60P-Q133K	Нет связывания	Связывание
Q133K	Нет связывания	Связывание
FimH_LD wt	Связывание	Связывание

**Пример 4.** Анализ конформационного состояния вариантов лектинового домена *FimH* методом ЯМР

Спектры  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  ядерного магнитного резонанса с гетероядерной одноквантовой корреляцией (HSQC ЯМР) для однородно  $^{15}\text{N}$ -меченых вариантов *FimH*<sub>LD</sub>, полученных так, как описано в разделе «Метод», с добавлением  $^{15}\text{N}$  к среде для выращивания, снимали в отсутствие и в присутствии н-гептил- $\alpha$ -D-маннопиранозидного лиганда для оценки структурных различий на уровне остатков. Белок концентрировали до 150 мкМ и проводили определение в 20 мМ фосфатном буфере, pH 7,4, с 7%–10% D<sub>2</sub>O. н-Гептил- $\alpha$ -D-маннопиранозидный лиганд растворяли в D<sub>2</sub>O и поэтапно добавляли к белку до достижения 10-кратного молярного избытка. Спектры каждого образца сравнивали с общедоступными эталонными спектрами (Rabbani S et al., J Biol. Chem., 2018, 293(5):1835–1849).

*Результаты*

Варианты *FimH* *FimH*(F71Y), *FimH*(F144V) и *FimH*(F71Y/F144V) анализировали на их способность оставаться в низкоаффинной конформации в присутствии маннозидного лиганда. В отсутствие лиганда все три варианта находятся в низкоаффинной конформации при сравнении химических сдвигов остатков, которые, как известно, указывают на высокоаффинное состояние (Rabbani S et al., J Biol. Chem., 2018, 293(5):1835–1849). Напротив, *FimH*<sub>LD</sub> 23-10 дикого типа заблокирован в высокоаффинной конформации в отсутствие маннозидного лиганда. Однако в присутствии лиганда *FimH*(F71Y) и *FimH*(F144V) переключаются обратно в высокоаффинную конформацию, в то время как *FimH*(F71Y/F144V) остается

в низкоаффинной конформации, например после добавления лиганда к FimH(F71Y/F144V) химического сдвига не наблюдается (Фиг. 2 и таблица 4).

**Таблица 4.** Табличное представление химических сдвигов выбранных аминокислотных остатков, измеренных с помощью ЯМР.

Остаток	23-10		R60P		F144V		F71Y		F144V/F71Y	
	Апо	Лиганд	Апо	Лиганд	Апо	Лиганд	Апо	Лиганд	Апо	Лиганд
1. Неизвестен (специфичен к FimH <sub>LD</sub> 23-10)	L	H	L	H	L	H	L	H	L	L
2. Неизвестен (специфичен к FimH <sub>LD</sub> 23-10)	L	H	L	H	L	H	L	H	L	L
Остаток 2 Ala (A)	H	H	L	H	L	H	L	H	L	L
Положение 4 Ala (K)	H	H	L	H	L	H	L	H	L	L
Остаток 54 Asp (D)	H	H	L	H	L	H	L	H	L	L
Остаток 133 Gln (Q)	H	H	L	H	L	H	L	H	L	L
Остаток 141 Asp (D)	H	H	L	H	L	H	L	H	L	L

За исключением двух неизвестных остатков, которые отличаются от K12 дикого типа, FimH<sub>LD</sub> 23-10 дикого типа считается уже имеющим высокоаффинную (H) конформацию без лиганда. Варианты с одной мутацией F71Y и F144V находятся в низкоаффинной (L) конформации без лиганда, но переключаются в H-конформацию в присутствии лиганда, тогда как вариант с двойной мутацией F71Y/F144V оставался в L-конформации даже в присутствии лиганда. Такая неспособность переключаться обратно в высокоаффинную конформацию делает FimH(F71Y/F144V) особенно привлекательным для применения в фармацевтических композициях вакцин, так как это, например, обеспечивает отсутствие необходимости в дополнительных проверках качества или стабильности, необходимых для оценки того, стабильна ли конформация во время хранения или в других условиях хранения. Кроме того, невозможность обратного переключения в высокоаффинную конформацию позволяет применять FimH(F71Y/F144V) в качестве исследовательского инструмента для изучения механизма действия или получения сведений о конформации, а также позволяет применять FimH(F71Y/F144V) для создания специфических антител для полезного исследовательского, диагностического и, возможно, фармацевтического применения.

Таким образом, в заключение, из всех протестированных вариантов FimH, FimH(F71Y), FimH(F144V) и FimH(F71Y/F144V) способны индуцировать самые высокие уровни функциональных ингибирующих антител при сохранении связывающего кармана FimH интактным. FimH(F71Y/F144V) имеет дополнительные преимущества, заключающиеся

в том, что он полностью устраняет связывание с маннозидом и остается заблокированным в низкоаффинной конформации даже в присутствии лиганда.

## ПЕРВОНАЧАЛЬНАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, содержащий лектиновый домен FimH, который содержит тирозин (Y) или триптофан (W) в положении, которое соответствует положению 71 в SEQ ID NO: 1.  
5
2. Полипептид по п. 1, в котором лектиновый домен FimH содержит тирозин (Y) в положении, которое соответствует положению 71 в SEQ ID NO: 1.
3. Полипептид по п. 1 или 2, дополнительно содержащий аминокислоту, отличную от фенилаланина (F), в положении, соответствующем положению 144 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.  
10
4. Полипептид по п. 3, содержащий аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из валина (V), изолейцина (I), лейцина (L), глицина (G), метионина (M) и аланина (A) в положении, которое соответствует положению 144 в SEQ ID NO: 1.  
15
5. Полипептид по п. 3 или 4, в котором лектиновый домен FimH содержит валин (V) в положении, которое соответствует положению 144 в SEQ ID NO: 1.
6. Полипептид по любому из пп. 1–5, в котором лектиновый домен FimH имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, причем предпочтительно лектиновый домен FimH содержит SEQ ID NO: 1, при этом остаток фенилаланина в положении 71 замещен тирозином.  
20
7. Полипептид по п. 6, в котором лектиновый домен FimH содержит SEQ ID NO: 1, причем остаток фенилаланина в положении 71 замещен тирозином и при этом остаток фенилаланина в положении 144 замещен валином.
8. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащий пилиновый домен FimH.  
25
9. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, представляющий собой полноразмерный FimH, который имеет по меньшей мере 90% идентичности  
30

последовательности с SEQ ID NO: 2, причем предпочтительно лектиновый домен FimH содержит SEQ ID NO: 2, при этом остаток фенилаланина в положении 71 замещен тирозином, и при этом более предпочтительно лектиновый домен FimH содержит SEQ ID NO: 2, при этом остаток фенилаланина в положении 71 замещен тирозином и при этом остаток фенилаланина в положении 144 замещен валином.

10. Полинуклеотид, кодирующий полипептид по любому из пп. 1–9.

11. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 10.

12. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п. 10 или вектор по п. 11.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид по любому из пп. 1–9, полинуклеотид по п. 10 или вектор по п. 11.

14. Полипептид по любому из пп. 1–9, полинуклеотид по п. 10, вектор по п. 11 или фармацевтическая композиция по п. 12 для применения в индукции иммунного ответа против бактерии семейства Enterobacteriaceae, причем предпочтительно бактерия представляет собой *E. coli* или *Klebsiella*, предпочтительно *E. coli*.

15. Полипептид по любому из пп. 1–9, полинуклеотид по п. 10, вектор по п. 11 или фармацевтическая композиция по п. 12 для применения в профилактике или лечении у субъекта инфекции мочевыводящих путей, вызванной *E. coli*.

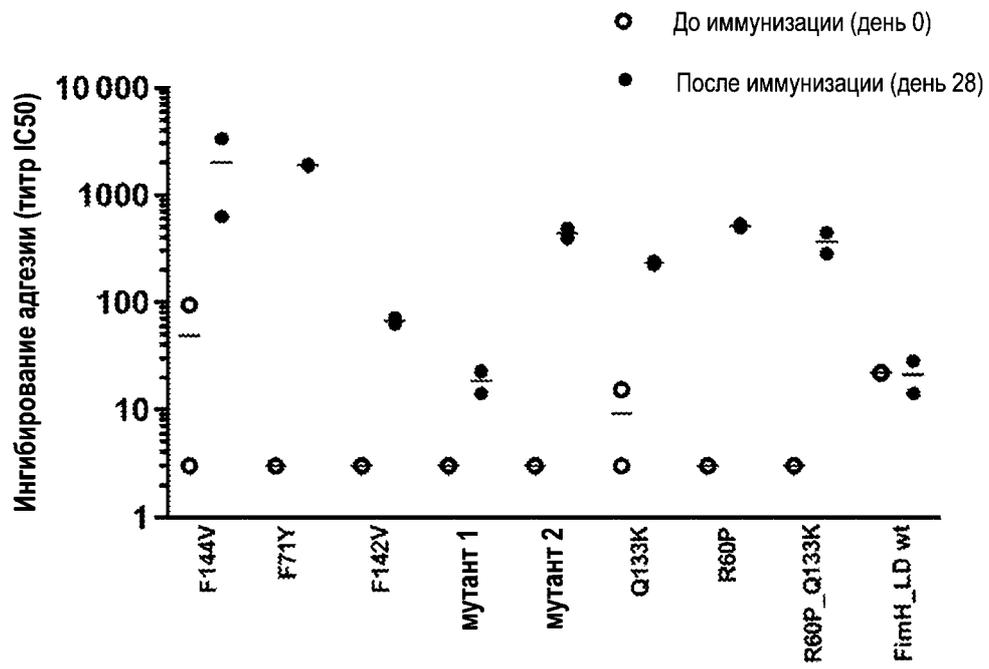
16. Способ получения полипептида, содержащего лектиновый домен FimH, включающий в себя экспрессию полипептида из рекомбинантной клетки, содержащей полинуклеотид по п. 10 и/или вектор по п. 11, причем необязательно способ дополнительно включает в себя извлечение и очистку полипептида с последующим необязательным включением полипептида в состав фармацевтической композиции.

## ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

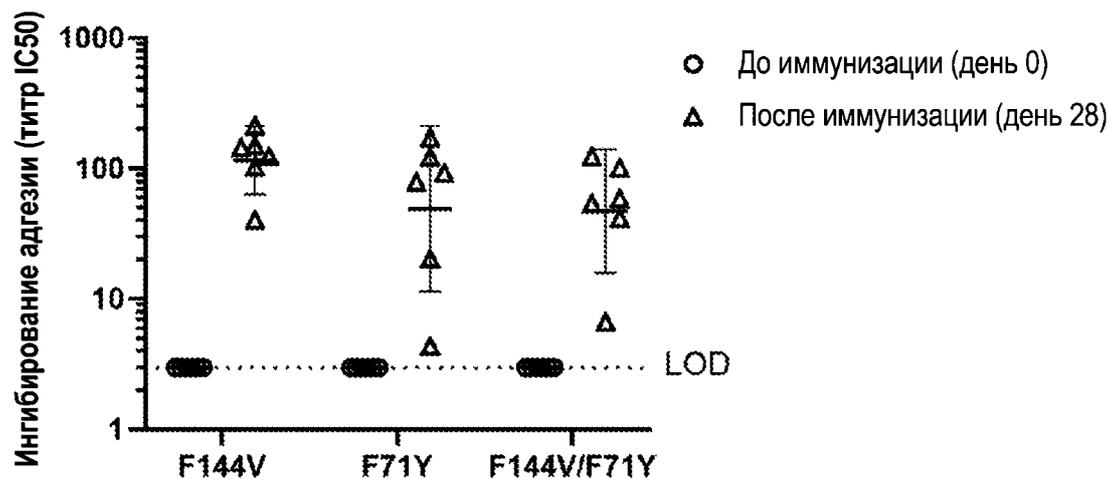
1. Полипептид, содержащий лектиновый домен FimH, который имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, причем лектиновый домен FimH содержит тирозин (Y) в положении, которое соответствует положению 71 в SEQ ID NO: 1, и при этом лектиновый домен FimH имеет константу диссоциации ( $K_D$ ) связывания с маннозным лигандом по меньшей мере 1000 нМ или выше, определенную с помощью поверхностного плазмонного резонанса.
2. Полипептид по п. 1, дополнительно содержащий аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из валина (V), изолейцина (I), лейцина (L), глицина (G), метионина (M) и аланина (A) в положении, которое соответствует положению 144 в SEQ ID NO: 1.
3. Полипептид по п. 1 или 2, в котором лектиновый домен FimH содержит валин (V) в положении, которое соответствует положению 144 в SEQ ID NO: 1.
4. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащий пилиновый домен FimH.
5. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, представляющий собой полноразмерный FimH, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2.
6. Полипептид, содержащий лектиновый домен FimH, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, причем лектиновый домен FimH содержит тирозин (Y) в положении, которое соответствует положению 71 в SEQ ID NO: 1.
7. Полипептид FimH, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере одной из SEQ ID NO: 2, 4, 5 и 6 или аминокислотную последовательность по меньшей мере одной из SEQ ID NO: 23–45 и 55, описанных в US6,737,063, причем

полипептид FimH содержит тирозин (Y) в положении, которое соответствует положению 71 в SEQ ID NO: 1.

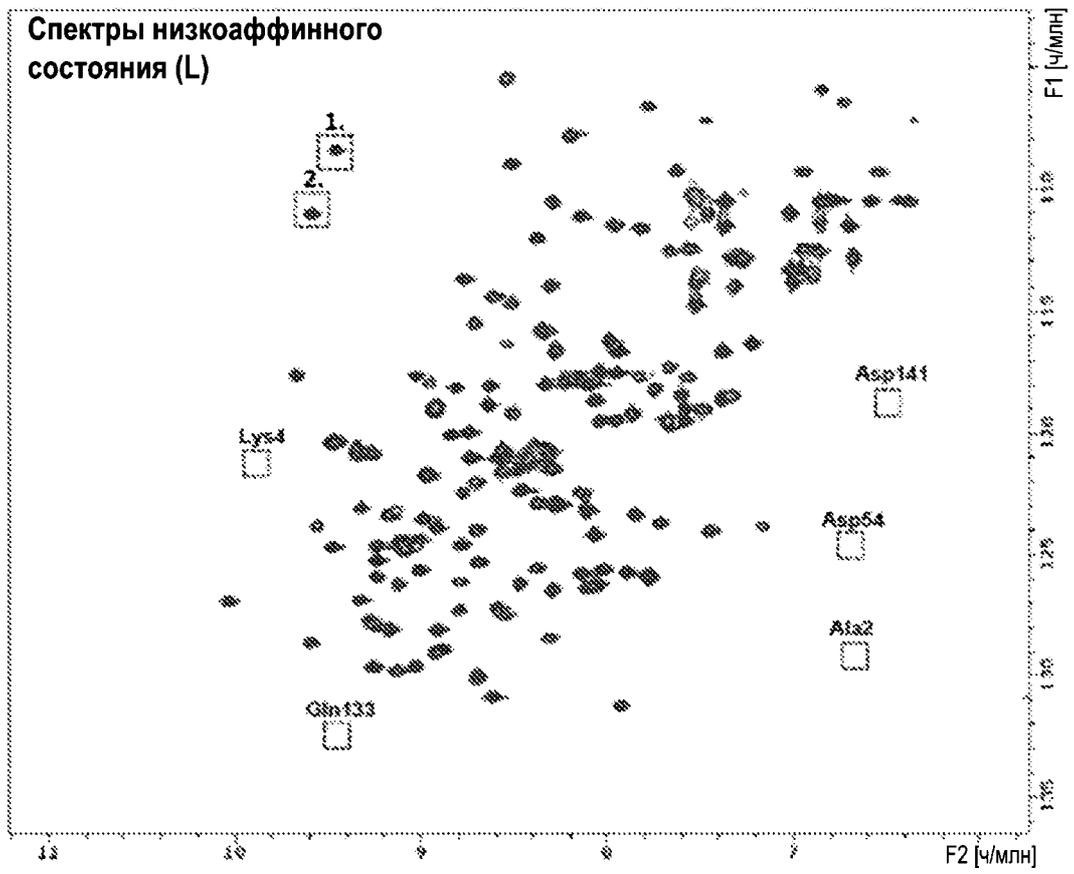
8. Полипептид по п. 6 или 7, дополнительно содержащий аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из валина (V), изолейцина (I), лейцина (L), глицина (G), метионина (M) и аланина (A) в положении, которое соответствует положению 144 в SEQ ID NO: 1, причем предпочтительно полипептид содержит валин (V) в положении, которое соответствует положению 144 в SEQ ID NO: 1.
9. Полинуклеотид, кодирующий полипептид по любому из пп. 1–8.
10. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 9.
11. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п. 9 или вектор по п. 10.
12. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид по любому из пп. 1–8, полинуклеотид по п. 9 или вектор по п. 10.
13. Полипептид по любому из пп. 1–8, полинуклеотид по п. 9, вектор по п. 10 или фармацевтическая композиция по п. 12 для применения в индукции иммунного ответа против бактерии семейства Enterobacteriaceae, причем предпочтительно бактерия представляет собой *E. coli* или *Klebsiella*, предпочтительно *E. coli*.
14. Полипептид по любому из пп. 1–8, полинуклеотид по п. 9, вектор по п. 10 или фармацевтическая композиция по п. 12 для применения в профилактике или лечении у субъекта инфекции мочевыводящих путей, вызванной *E. coli*.
15. Способ получения полипептида, содержащего лектиновый домен FimH, включающий в себя экспрессию полипептида из рекомбинантной клетки, содержащей полинуклеотид по п. 9 и/или вектор по п. 10, причем необязательно способ дополнительно включает в себя извлечение и очистку полипептида с последующим необязательным включением полипептида в состав фармацевтической композиции.



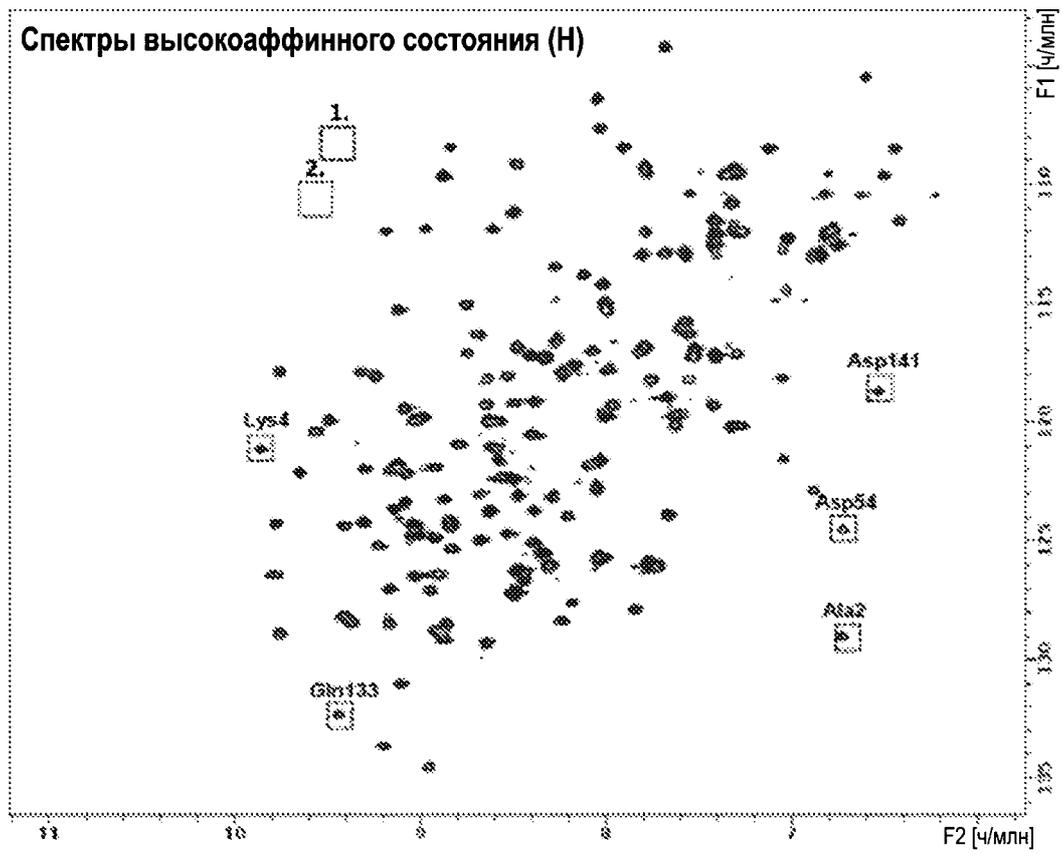
Фиг. 1А



Фиг. 1Б



Фиг. 2А



Фиг. 2Б