

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047805**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.09.12

(51) Int. Cl. **A61K 39/108** (2006.01)
A61P 13/02 (2006.01)

(21) Номер заявки
202392713

(22) Дата подачи заявки
2022.03.31

(54) ПОЛУЧЕНИЕ БИОКОНЬЮГАТОВ E.COLI O18(31) **21166781.1**(32) **2021.04.01**(33) **EP**(43) **2023.11.24**(86) **PCT/IB2022/053013**(87) **WO 2022/208430 2022.10.06**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЯНССЕН ФАРМАСЬЮТИКЛЗ, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
**Верденбург Эвелина Марлен, Гёрстен
Йерун, Бургхаут Питер Ян (NL)**

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

(56) **WO-A1-2020191082****US-A1-2016244489****WO-A2-0166572**

Anonymous: "O18ab/O18ac family 0-antigen polymerase [Escherichia coli] - Protein - NCBI", UniParc -UPI000E210611, 10 July 2019 (2019-07-10), pages 1-1, XP055838858, Retrieved, from the Internet:URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_115766377 [retrieved on 2021-09-07] abstract

FRANCESCA MICOLI ET AL: "Glycoconjugate vaccines: current approaches towards faster vaccine design", EXPERT REVIEW OF VACCINES, vol. 18, no. 9, 31 August 2019 (2019-08-31), pages 881-895, XP055689605, GB ISSN: 1476-0584, DOI: 10.1080/14760584.2019.1657012 Figure 2, Item 4

DEBROY CHITRITA ET AL: "Detection of O antigens in Escherichia coli", ANIMAL HEALTH RESEARCH REVIEWS, CABI PUBLISHING, GB, vol. 12, no. 2, 1 December 2011 (2011-12-01), pages 169-185, XP009178866, ISSN: 1466-2523, DOI: 10.1017/S1466252311000193

AMIRREZA FARIDMOAYER ET AL: "Functional characterization of bacterial oligosaccharyltransferases involved in 0-linked protein glycosylation", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 189, no. 22, 21 September 2007 (2007-09-21), pages 8088-8098, XP008126816, ISSN: 0021-9193, DOI: 10.1128/JB.01318-07 abstract

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

B1**047805****047805 B1**

Область применения изобретения

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

Предпосылки создания изобретения

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

О-антиген содержит иммунодоминантный компонент липополисахарида (ЛПС) клеточной стенки грамотрицательных бактерий, в том числе E.coli. В настоящее время выявлено >180 серологически уникальных О-антигенов E.coli, при этом подавляющее большинство изолятов ExPEC относится менее чем к 20 серотипам О-антигенов. Полноразмерные О-антигены E.coli обычно состоят из примерно 10-25 повторяющихся сахарных единиц, присоединенных к высококонсервативной коровой структуре ЛПС, причем каждый компонент синтезируется отдельно ферментами, кодируемыми преимущественно кластерами генов *gfb* и *gfa* соответственно. После полимеризации О-антигена О-антигенная полисахаридная основа может быть модифицирована, как правило, путем добавления ацетильных или глюкозных остатков. Эти модификации эффективно увеличивают разнообразие серотипов за счет создания антигенно различимых серотипов, имеющих общую полисахаридную основу, но отличающихся боковыми ответвлениями. Гены, кодирующие ферменты, модифицирующие О-антиген, обычно располагаются вне кластера *gfb* на хромосоме, а в некоторых случаях эти гены находятся в составе лизогенных бактериофагов.

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

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

Было замечено, что выход продукта для биоконъюгатов с антигенным полисахаридом O18A был наименьшим по сравнению с другими девятью биоконъюгатами, приготовленными для ExPEC10V (WO2020/191082A1). Кроме того, полученный таким образом биоконъюгат O18A, по-видимому, содержит относительно большое количество гликанов, состоящих из ограниченного числа полисахаридных единиц повторов антигенного полисахарида O18A, называемых "sEPA" (т.е. белок-носитель EPA, имеющий полисахаридные цепи, состоящие всего из 1-3 единиц повторов, что составляло более 20% биоконъюгатов O18A в периплазматической фракции в процессе получения лекарственного вещества биоконъюгата O18A), причем продукт sEPA нелегко отделить от предпочтительного биоконъюгата, состоящего в основном из гликанов, в котором антигенный полисахарид O18A состоит по меньшей мере из пяти единиц повторов. Изоляты ExPEC, принадлежащие к серогруппе O18, часто упоминаются в современных мониторинговых исследованиях изолятов крови в США и ЕС, поэтому конъюгаты O18 считаются важным компонентом вакцины против ExPEC. Поэтому было бы желательно повысить выход конъюгатов антигенного полисахарида O18.

Таким образом, задачей изобретения является создание материалов и способов для увеличения вы-

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

Изложение сущности изобретения

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

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

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

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

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

В одном варианте осуществления в клетке-хозяине присутствует по меньшей мере одно из: а) олигосахарилтрансфераза содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 6; b) белок-носитель содержит SEQ ID NO: 3 и c) локус *gfb* O18 E.coli представляет собой локус *gfb* штамма E.coli с серотипом O18A. Предпочтительно олигосахарилтрансфераза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

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

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

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

В одном варианте осуществления способ дополнительно включает добавление одного или более дополнительных биоконъюгатов полисахаридов O-антигена E.coli, конъюгированных с белком-носителем, в фармацевтическую композицию с получением поливалентной композиции биоконъюгата. Предпочтительно один или более дополнительных биоконъюгатов содержат по меньшей мере один O-антигенный полисахарид, выбранный из группы, состоящей из серотипов E.coli O1, O2, O4, O6, O8, O15, O16, O25 и O75. В предпочтительном варианте осуществления поливалентная композиция биоконъюга-

та, полученная в указанном способе, содержит: (i) биоконъюгат антигенного полисахарида E.coli O18A, конъюгированного с белком-носителем; (i) биоконъюгат антигенного полисахарида E.coli O1A, конъюгированного с белком-носителем; (i) биоконъюгат антигенного полисахарида E.coli O2, конъюгированного с белком-носителем; (i) биоконъюгат гликозилированного антигенного полисахарида E.coli O4, конъюгированного с белком-носителем; (i) биоконъюгат антигенного полисахарида E.coli O6A, конъюгированного с белком-носителем; (vi) биоконъюгат антигенного полисахарида-E.coli O15, конъюгированного с белком-носителем; (vii) биоконъюгат антигенного полисахарида E.coli O16, конъюгированного с белком-носителем; (viii) биоконъюгат антигенного полисахарида E.coli O25B, конъюгированного с белком-носителем; и (ix) биоконъюгат антигенного полисахарида E.coli O75, конъюгированного с белком-носителем, причем предпочтительно белок-носитель в каждом биоконъюгате содержит SEQ ID NO: 3. В более предпочтительном варианте осуществления поливалентная композиция биоконъюгата, полученная в указанном способе, дополнительно содержит: (x) биоконъюгат антигенного полисахарида E.coli O8, конъюгированного с белком-носителем, причем предпочтительно белок-носитель содержит SEQ ID NO: 3.

Описание фигур

На чертеже ДСН-ПААГ, окрашенный кумасси, с внесенными периплазматическими экстрактами культур штамма-продуцента E.coli W3110 во встряхиваемых колбах для выявления биоконъюгатов O18A, содержащих варианты Wzy с SEQ ID NO: 1 (дорожки 1 и 3) или с аминокислотными заменами 199I, 377K, 395A (дорожки 2 и 4), в которых была индуцирована экспрессия полисахаридного биоконъюгата O18A. В образцах, внесенных на дорожки 1 и 2, фермент олигосахарилтрансферазу Pg1B экспрессировали из плазмиды экспрессии уменьшенного размера, тогда как на дорожках 3 и 4 векторная основа плазмиды экспрессии Pg1B содержала дополнительные 4500 п. о. последовательности ДНК, которые включают некодирующую ДНК и ген lac-репрессора lacI, что оказалось оптимальным для экспрессии продукта. Стрелками обозначены полосы, в которых находится материал биоконъюгата полисахарида O18A, указывая примерный размер моногликозилированного EPA (M), дигликозилированного EPA (D) и тригликозилированного EPA (T).

Описание изобретения

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

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 охватывающие 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".

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

Идентичность последовательности в настоящем документе определена как соотношение между

двумя или более аминокислотными (полипептидными или белковыми) последовательностями или двумя или более последовательностями нуклеиновых кислот (полинуклеотидов), определяемое посредством сравнения последовательностей. "Сходство" между двумя аминокислотными последовательностями определяют посредством сравнения аминокислотной последовательности и ее консервативных аминокислотных заменителей первого полипептида с последовательностью второго полипептида. "Идентичность" и "сходство" можно легко вычислить известными способами.

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

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

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

Подробное описание изобретения

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

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

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

В клетке-хозяине полипептид по изобретению, обладающий активностью O-антиген-полимеразы Wzu, представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1, и дополнительно обладающий активностью полимеразы O-антигена. Наличие или отсутствие у полипептида по изобретению активности полимеразы O-антигена можно определить путем экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей O-антиген полимеразу Wzu, в подходящей клетке-хозяине и определения количества образующегося полимеризованного O-антигена методами, известными специалистам в данной области, например, как описано в публикации Woodward et al. (2010, *Nat Chem Biol.* 2010 Jun; 6(6): 418-423), которая полностью включена в данный документ путем ссылки.

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

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

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

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

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

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

Аминокислотное положение, которое соответствует одному из аминокислотных положений 199, 377 или 395 в SEQ ID NO: 1 соответственно, в настоящем документе относится к положению в аминокислотной последовательности, отличной от SEQ ID NO: 1, которое соответствует одному из положений 199, 377 или 395 в SEQ ID NO: 1 соответственно, в выравнивании последовательности SEQ ID NO: 1 с этой последовательностью, отличной от SEQ ID NO: 1, предпочтительно в выравнивании последовательности ClustalW (183) с SEQ ID NO: 1, предпочтительно с использованием настроек по умолчанию. Специалисту в данной области известно, как идентифицировать соответствующие положения аминокислот в аминокислотных последовательностях О-антиген полимеразы Wzy, отличных от SEQ ID NO: 1, с использованием алгоритмов выравнивания аминокислотных последовательностей, как определено выше.

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

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

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

области. Например, промотор представляет собой индуцибельный или конститутивный прокариотический промотор, такой как промотор *ara*, *phoA*, *tac*, *tet*, *trc*, *trp*, *PBAD*, λ PL, T5 или T7.

В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложен выделенный полинуклеотид, который можно использовать при конструировании клетки-хозяина в соответствии с изобретением. Полинуклеотид может представлять собой рекомбинантный, синтетический или искусственный полинуклеотид. Полинуклеотид может быть представлен в любой форме нуклеиновой кислоты, например ДНК или РНК, предпочтительно ДНК. Полинуклеотид может содержать один или более нуклеотидов, которые не присутствуют во встречающемся в природе полинуклеотиде, кодирующем *Wzy*, таком как встречающийся в природе полинуклеотид, кодирующий *Wzy*, с SEQ ID NO: 2. В частности, полинуклеотид для применения в изобретении будет по меньшей мере отличаться от встречающегося в природе полинуклеотида, кодирующего *Wzy*, такого как SEQ ID NO: 2, в одном или более кодонах, соответствующих положениям 199, 377 и 395 в SEQ ID NO: 1. Кроме того, полинуклеотид для применения в изобретении может отличаться от встречающегося в природе нуклеотида, кодирующего *Wzy*, в кодонах, отличных от положений, соответствующих по меньшей мере одному из положений 199, 377 и 395 в SEQ ID NO: 1. Полинуклеотид может иметь один или более нуклеотидов, которые не присутствуют во встречающемся в природе полинуклеотиде, кодирующем *Wzy*, на его 5'-конце и/или 3'-конце. Специалисты в данной области могут, используя стандартные методики, производить замены нуклеотидов, которые не влияют на полипептидную последовательность с кодированием описанными полинуклеотидами, чтобы показать особенности использования кодонов любым конкретным организмом-хозяином, в котором должны экспрессироваться полипептиды. Таким образом, если не указано иное, "нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность", включает все нуклеотидные последовательности, которые являются дегенеративными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность.

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

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

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

определено в данном документе, и iii) (конструкта нуклеиновой кислоты для экспрессии) олигосахарилтрансферазы, как определено в данном документе.

Клетка-хозяин по настоящему изобретению для применения при получении биоконъюгата антигенного полисахарида *E.coli* O18, конъюгированного с белком-носителем, дополнительно предпочтительно содержит олигосахарилтрансферазу (OST) для переноса олигосахаридов в сайты N-гликозилирования на белке-носителе. Поэтому предпочтительно, чтобы клетка-хозяин в соответствии с настоящим документом содержала нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу (OST). Олигосахарилтрансферазы, используемые в данном документе, представляют собой ферменты, которые переносят соединенные с липидом олигосахариды в остатки растущих полипептидных цепей, которые содержат консенсусный мотив гликозилирования, например аспарагиновые (Asn, N) остатки растущих полипептидных цепей, которые содержат консенсусный мотив N-гликозилирования, примерами таких консенсусных мотивов N-гликозилирования являются SEQ ID NO: 4 или Asn-X-Ser(Thr). В рамках данной заявки следует понимать, что для мотива N-гликозилирования Asn-X-Ser(Thr) X может представлять собой любую аминокислоту, за исключением пролина. Предпочтительно такие олигосахарилтрансферазы переносят олигосахариды в аспарагиновые остатки с SEQ ID NO: 4 в полипептидной цепи белка-носителя, как описано в данном документе. Нуклеиновая кислота, кодирующая олигосахарилтрансферазу, может быть нативной для клетки-хозяина или может быть введена в клетку-хозяина с использованием генетических подходов. В предпочтительных вариантах осуществления олигосахарилтрансфераза гетерологична для клетки-хозяина. *E.coli* не содержит олигосахарилтрансферазу, и, следовательно, если *E.coli* используют в качестве клетки-хозяина для получения биоконъюгатов, гетерологичная олигосахарилтрансфераза содержится в такой клетке-хозяине, например, после введения путем генной инженерии. Олигосахарилтрансфераза может быть получена из любого источника, известного в данной области, в контексте настоящего описания.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления олигосахарилтрансфераза представляет собой олигосахарилтрансферазу из *Campylobacter*. Например, в одном варианте осуществления олигосахарилтрансфераза представляет собой олигосахарилтрансферазу из *Campylobacter jejuni* (т.е. Pg1B; см., например, Wacker et al., 2002, Science 298: 1790-1793; см. также, например, идентификационный номер гена NCBI: 3231775 (номер доступа UniProt 086154). В другом варианте осуществления олигосахарилтрансфераза представляет собой олигосахарилтрансферазу из *Campylobacter lari* (см., например, идентификационный номер гена NCBI: 7410986).

В конкретных вариантах осуществления олигосахарилтрансфераза представляет собой Pg1B из *Campylobacter jejuni*, включая натуральный (дикого типа) белок или любой его вариант, такие как описаны в международных патентных публикациях WO2016/107818 и WO2016/107819. Pg1B может переносить соединенные с липидом олигосахариды в аспарагиновые остатки в консенсусных последовательностях с SEQ ID NO: 4 и Asn-X-Ser(Thr). В конкретных вариантах осуществления олигосахарилтрансфераза Pg1B представляет собой полипептид, включающий олигосахарилтрансферазу, как определено в данном документе, причем полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности с SEQ ID NO: 6. В предпочтительном варианте осуществления олигосахарилтрансфераза Pg1B содержит аминокислотную последовательность, которая идентична SEQ ID NO: 6. В определенных вариантах осуществления одна или более эндогенных консенсусных последовательностей гликозилирования в Pg1B дикого типа были мутированы, чтобы избежать аутогликозилирования Pg1B, например SEQ ID NO: 6, содержащая мутацию N534Q. Примеры варианта Pg1B, подходящего для применения в клетке-хозяине, представленные в данном документе, включают Pg1B с SEQ ID NO: 6, содержащую мутацию N311V.

Клетка-хозяин по настоящему изобретению для применения при получении биоконъюгата антигенного полисахарида *E.coli* O18, конъюгированного с белком-носителем, дополнительно предпочтительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий по меньшей мере один сайт гликозилирования, содержащий консенсусную последовательность гликозилирования Asn-X-Ser(Thr), более предпочтительно по меньшей мере один сайт гликозилирования, имеющий SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления белок-носитель выбирают из группы, состоящей из детоксицированного экзотоксина *A. P. aeruginosa* (EPA), флагеллина *E.coli* (FliC), CRM197, белка связывания мальтозы (MBP), дифтерийного анатоксина, столбнячного анатоксина, детоксицированного гемолизина *A. S. Aureus*, фактора агглютинации A, фактора агглютинации B, термолабильного энтеротоксина *E.coli*, детоксицированных вариантов термолабильного энтеротоксина *E.coli*, субъединицы холерного токсина B (CTB), холерного токсина, детоксицированных вариантов холерного токсина, Sat-белка *E.coli*, домена-пассажира Sat-белка *E.coli*, пневмолизина *Streptococcus pneumoniae*, гемоцианина фисуреллы (KLH), PcrV *P. aeruginosa*, наружного мембранного белка *Neisseria meningitidis* (OMP) и белка D из нетипичного *Haemophilus influenzae*.

В определенных вариантах осуществления белок-носитель представляет собой детоксицированный экзотоксин *A. Pseudomonas aeruginosa* (EPA) или CRM197, предпочтительно белок-носитель представляет собой EPA. Для EPA в литературе описаны различные варианты детоксицированных белков,

которые могут быть использованы в качестве белков-носителей. В некоторых вариантах осуществления белки-носители EPA, используемые в конъюгате по настоящему изобретению, модифицированы таким образом, что белок является менее токсичным и/или более чувствительным к гликозилированию. Например, детоксификация может быть достигнута путем мутирования и делеции каталитически важных остатков L552V и AE553 по данным Lukac et al., 1988, *Infect Immun*, 56: 3095-3098, и Ho et al., 2006, *Hum Vaccin*, 2:89-98. В конкретном варианте осуществления белки-носители, используемые при получении конъюгатов по настоящему изобретению, модифицированы таким образом, что количество сайтов гликозилирования в белках-носителях оптимизировано так, чтобы обеспечивать более низкие концентрации белка, подлежащего введению, например, в иммуногенной композиции, в форме биоконъюгата. В конкретном варианте осуществления клетка-хозяин кодирует EPA, содержащую 1-10, предпочтительно 2-4, предпочтительно 4 сайта гликозилирования, включающих консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 4. В одном варианте осуществления белок-носитель содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности с SEQ ID NO: 3, и содержит 1-10, предпочтительно 2-4, предпочтительно 4 сайта гликозилирования, содержащих консенсусную последовательность гликозилирования Asn-X-Ser(Thr), более предпочтительно с SEQ ID NO: 4. В конкретном варианте осуществления белок-носитель содержит EPA, которая содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 3.

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

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

В *E.coli* генные продукты, участвующие в биогенезе O-антигена, кодируются локусом *gfb*. Таким образом, клетка-хозяин, как представлено в настоящем документе, предпочтительно содержит нуклеотидную последовательность локуса *gfb* O18 *E.coli*, предпочтительно локуса *gfb* штамма *E.coli*, имеющего серотип O18A. Используемый в настоящем документе термин "локус *gfb* O18" и "генный кластер *gfb* O18" относится к локусу в грамотрицательном бактериальном геноме, который содержит кластер генов, которые вместе кодирует ферментативный механизм, способный синтезировать структуру O18-антигенного полисахарида. Термин "локус *gfb*" предпочтительно относится к геномному локусу рода *Escherichia*, в частности *E.coli*.

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

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

Таким образом, в определенных предпочтительных вариантах осуществления клетка-хозяин по изобретению содержит генный кластер *gfb* *E.coli*, в котором нуклеотидная последовательность, кодирующая O-антиген-полимеразу *Wzy*, представляет собой нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, обладающий активностью O-антиген-полимеразы *Wzy*, в соответствии с настоящим изобретением, как определено выше. Таким образом, в определенных предпочтительных вариантах осуществления эндогенная кодирующая последовательность O-антиген-полимеразы *Wzy* была заменена нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид, обладающий активностью O-антиген-полимеразы *Wzy*, в соответствии с настоящим изобретением, как определено выше. Удаление эндогенных кодирующих последовательностей *Wzy* и замена их на последовательности, кодирующие *Wzy*-полимеразу по изобретению, могут быть выполнены с помощью методов редактирования генов, широко известных в данной области.

В одном варианте осуществления ген *waal* удаляют из или функционально инактивируют в геноме

клетки-хозяина в соответствии с настоящим изобретением. Термины "waaL" и "ген waaL" относятся к гену лигазы О-антигена, кодирующему связанный с мембраной фермент с активным центром, расположенным в периплазме. Кодируемый геном waaL фермент переносит связанный с ундекапренилфосфатом (UPP) О-антиген на липидное ядро А, образуя липополисахарид. Удаление или нарушение эндогенного гена waaL (например, штаммы A_{waaL}) нарушает перенос О-антигена в липид А и вместо этого может усиливать перенос О-антигена в другую доступную биомолекулу, такую как белок-носитель, экспрессируемый в клетке-хозяине по изобретению.

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

Как будет понятно специалисту в данной области, полипептид по настоящему изобретению, содержащийся в клетке-хозяине по изобретению, такой как белок-носитель, олигосахарилтрансфераза, полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy и другие ферменты генного кластера rfb, удобно вводить в клетку-хозяина в форме нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды по изобретению. Нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды по изобретению, предпочтительно представляют собой конструкторы нуклеиновых кислот, в частности конструкторы экспрессии, содержащие одну или более экспрессионных кассет для экспрессии полипептидов по изобретению, причем нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептиды по изобретению, функционально связаны с последовательностями контроля экспрессии для экспрессии полипептидов в клетке-хозяине по изобретению. Подходящие последовательности контроля экспрессии упоминаются выше и обычно по меньшей мере включают промотор. Промотор может представлять собой конститутивный промотор, или он может представлять собой промотор, который можно регулировать, например репрессировать или индуцировать при определенных условиях, например при изменениях температуры или наличии определенных химических веществ или белков в клетке, все из которых являются такими, как хорошо известно в данной области. Конструкторы нуклеиновой кислоты могут являться экстрахромосомными, например плазмиды или другой вектор, или конструкторы нуклеиновой кислоты могут быть встроены в геном клетки-хозяина по изобретению. Молекулярно-биологические способы конструирования и/или синтеза конструкторов нуклеиновых кислот для экспрессии полипептидов в клетке-хозяине по данному изобретению в целом хорошо известны в данной области. Необязательно, длиной цепи О-антигенов можно манипулировать с помощью нативного механизма регуляции длины цепи О-антигена Wzz, например путем сверхэкспрессии или дополнения регулятора цепи О-антигена Wzz, например путем замены гена wzzB *E.coli* на один из его аналогов из видов *Salmonella* и *Shigella* или из *P. aeruginosa*, например на аналог *Salmonella enterica*, fepE или другой гомолог wzz (см., например, US 2018/0099038, WO 2020/039359), при этом, например, количество единиц повтора О-антигена может быть увеличено с помощью дополнительной сверхэкспрессии белка Wzy или без нее. Влияние wzz-подобных генов описано в литературе для этих видов. Однако для получения биоконъюгатов с хорошей иммуногенностью ничего этого не требуется, и в предпочтительных вариантах осуществления биоконъюгаты по изобретению получают без манипуляций с механизмом регулятора длины цепи Wzz.

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

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

NO: 4. Наиболее предпочтительно в этом варианте осуществления белок-носитель содержит ЕРА, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В определенных вариантах осуществления такие композиции представляют собой периплазматическую фракцию клетки-хозяина, продуцирующей биоконъюгат O18. Предпочтительно такие композиции содержат не более 20%, 15%, 10% биоконъюгатов со средним числом единиц повторов антигена O18 (sЕРА) от 1 до 3.

В дополнительном аспекте изобретение дополнительно относится к способам, в которых клетку-хозяина по изобретению используют для получения биоконъюгата антигенного полисахарида *E.coli* O18, конъюгированного с белком-носителем. Таким образом, один вариант осуществления относится к способу получения биоконъюгата антигенного полисахарида-*E. coli* O18, конъюгированного с белком-носителем, причем предпочтительно способ по меньшей мере включает стадию а) культивирования клетки-хозяина по изобретению для получения биоконъюгата. В одном варианте осуществления на стадии а) клетку-хозяина по изобретению культивируют в условиях, способствующих получению биоконъюгата. В определенных вариантах осуществления способ относится к получению биоконъюгата O18A. Клетку-хозяина по изобретению культивируют в условиях, подходящих для экспрессии биоконъюгата, который содержит белок-носитель, ковалентно связанный с антигенным полисахаридом *E.coli* O18, такие условия известны специалистам в данной области, с использованием методов, описанных, например, ранее в WO 2015/124769 или WO 2020/191082.

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

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

В одном варианте осуществления способ получения биоконъюгата O18 дополнительно включает добавление одного или более дополнительных конъюгатов или биоконъюгатов О-антигенных полисахаридов *E.coli*, конъюгированных с белком-носителем, в фармацевтическую композицию для получения поливалентной композиции, предпочтительно поливалентной композиции биоконъюгата. Таким образом, один или более дополнительных конъюгатов О-антигенных полисахаридов *E.Coli*, конъюгированных с белком-носителем, предпочтительно являются биоконъюгатами О-антигенных полисахаридов *E.coli* серотипов, отличных от O18, или более предпочтительно, отличных от O18A. В предпочтительном варианте осуществления один или более дополнительных конъюгатов или биоконъюгатов содержат по меньшей мере одно, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или все девять О-антигенных полисахаридов, выбранных из группы, состоящей из серотипов *E.coli* O1, O2, O4, O6, O8, O15, O16, O25 и O75. Подробное описание серотипов О-антигенных полисахаридов *E.coli* представлено в настоящем документе ниже (см. также табл. 1). Такие дополнительные конъюгаты или биоконъюгаты могут быть получены, как описано выше, например в WO2020/191082 A1.

Таким образом, в одном предпочтительном варианте осуществления способ получения биоконъюгата O18 дополнительно включает добавление дополнительных биоконъюгатов О-антигенных полисахаридов *E.coli*, конъюгированных с белком-носителем, в фармацевтическую композицию для получения поливалентной композиции, причем поливалентная композиция биоконъюгата содержит: (i) биоконъюгат антигенного полисахарида *E.coli* O18A, конъюгированного с белком-носителем; (i) биоконъюгат антигенного полисахарида *E.coli* O1A, конъюгированного с белком-носителем; (i) биоконъюгат антигенного полисахарида *E.coli* O2, конъюгированного с белком-носителем; (i) биоконъюгат гликозилированного антигенного полисахарида *E.coli* O4, конъюгированного с белком-носителем; (i) биоконъюгат антигенного полисахарида *E.coli* O6A, конъюгированного с белком-носителем; (vi) биоконъюгат антигенного полисахарида *E.coli* O15, конъюгированного с белком-носителем; (vii) биоконъюгат антигенного полисахарида *E.coli* O16, конъюгированного с белком-носителем; (viii) биоконъюгат антигенного полисахарида

E.coli O25B, конъюгированного с белком-носителем; и (ix) биоконъюгат антигенного полисахарида E.coli O75, конъюгированного с белком-носителем. В одном варианте осуществления поливалентная композиция биоконъюгата дополнительно содержит: (x) биоконъюгат антигенного полисахарида E.coli O8, конъюгированного с белком-носителем. Предпочтительно в этих вариантах осуществления белок-носитель в каждом биоконъюгате от (i) до (ix) содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 3.

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

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

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

В еще одном аспекте изобретение относится к композиции, содержащей биоконъюгат антигенного полисахарида E.coli O18, конъюгированного с белком-носителем, который получают или который может быть получен в соответствии со способом получения биоконъюгата по изобретению с использованием клетки-хозяина по настоящему изобретению, как описано выше.

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

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

В настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к нетоксич-

ному 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 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 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 восстанавливающие сахара.

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

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

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

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

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

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

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

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

Конкретные примеры адьювантов включают в себя, без ограничений, алюминиевые соли (алюм) (такие как гидроксид алюминия, фосфат алюминия, сульфат алюминия и оксид алюминия, включая наночастицы, содержащие составы алюма и наноалюма), фосфат кальция, монофосфориллипид A (MPL) или 3-ди-О-ацелированный монофосфорил A (3D-MPL) (см., например, патент Великобритании GB2220211, EP0971739, EP1194166, US6491919), AS01, AS02, AS03 и AS04 (все GlaxoSmithKline; см., например, EP1126876, US7357936 для AS04, EP0671948, EP0761231, US5750110 для AS02), соединения имидазопиридина (см. WO2007/109812), соединения имидазохиноксалина (см. WO2007/109813), дельта-инулин, активирующие STING синтетические циклические динуклеотиды (например, US20150056224), комбинации лецитина и гомополимеров карбомера (например, US6676958) и сапонины, такие как Quil A и QS21, необязательно в комбинации с QS7 (например, US 5,057,540). В некоторых вариантах осуществления адьювант представляет собой адьювант Фрейнда (полный или неполный). В определенных вариантах осуществления адьювант 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 адьювантный 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 адьювант QuilA может активировать как опосредованные антителами, так и опосредованные клетками иммунные ответы на широкий диапазон антигенов из разных источников. В определенных вариантах осуществления адьювант представляет собой AS01, например AS01B. AS01 представляет собой адьювантную систему, содержащую MPL (3-О-дезацил-4'-монофосфориллипид А), QS21 (*Quillaja 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 адьюванты 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 адьюванты 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 адьюванты 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 адьювантов представляют собой липосомы, содержащие иммунные стимуляторы, такие как MPL и QS21, такие как AS01E и AS01B (например, US 2011/0206758). Другими примерами адьювантов 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 адьювант представляет собой адьювант Th1.

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

В определенных вариантах осуществления адьювант 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 адьювант представляет собой агонист TLR4, содержащий липид А, или его аналог или производное.

Адьювант, 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 адьюванте и/или для иммуногенов.

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, аналоги дцРНК, агонисты TLR9, такие как CpG, и т.д.) и т.п. (см., например, Reed et al., 2013 выше).

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

гидроксиацильные цепи, присоединенные к сахарам, и одну C12 и одну C14, присоединенные к 3-гидроксигруппам первичных ацильных цепей в 2'- и 3'-положении соответственно.

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

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

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

Примеры липида А (аналоги, производные) включают в себя MPL, 3D-MPL, RC529 (например, EP1385541), PET-липид А, GLA (гликопиранинозиллипидный адъювант, синтетический дисахаридный гликолипид; например, US20100310602, US8722064), SLA (например, Carter D et al., 2016, Clin Transl Immunology 5: e108 (doi: 10.1038/cti.2016.63), в которой описан структурно-функциональный подход к оптимизации лигандов TLR4 для человеческих вакцин), PHAD (фосфорилированный гексаацилдисахарид; структура которого такая же, как у GLA), 3D-PHAD, 3D-(6-ацил)-PHAD (3D(6A)-PHAD) (PHAD, 3D-PHAD и 3D(6A)PHAD представляют собой варианты синтетических липидов, см., например, avanti-lipids.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-липид А, GLA/PHAD, E6020, ONO4007 и OM-174 см., например, в табл. 1 в Ireton GC and SG Reed, 2013, выше. Структуру SLA см., например, на чертеже в Reed SG et al., 2016, Curr Opin Immunol 41: 85-90. В определенных предпочтительных вариантах осуществления адъювант агониста TLR4 содержит аналог или производное липида А, выбранное из 3D-MPL, GLA или SLA. В определенных вариантах осуществления аналог или производное липида А получают в липосомах.

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 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 [SLA], соль алюминия), GLA-алюм (синтетический MPL [GLA], соль алюминия) и несколько адъювантов серии GSK ASxx, включая AS01 (MPL, QS21, липосомы), AS02 (MPL, QS21, эмульсия масло/вода), AS25 (MPL, эмульсия масло/вода), AS04 (MPL, соль алюминия) и AS15 (MPL, QS21, CpG, липосомы). См., например, WO 2013/119856, WO 2006/116423, US 4,987,237, U.S. 4,436,727, US 4,877,611, US 4,866,034, US 4,912,094, US 4,987,237, US5191072, US5593969, US 6,759,241, US 9,017,698, US 9,149,521, US 9,149,522, US 9,415,097, US 9,415,101, US 9,504,743, Reed G, et al., 2013, выше.

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

В одном варианте осуществления композиция по изобретению, содержащая биоконъюгат антигена E.coli O18, конъюгированного с белком-носителем, дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный конъюгат, содержащий O-антигенный полисахарид E.coli, ковалентно связанный с белком-носителем. Один или более дополнительных биоконъюгатов O-антигенных полисахаридов E.coli, конъюгированных с белком-носителем, предпочтительно являются биоконъюгатами O-антигенных полисахаридов E.coli серотипов, отличных от O18, или более предпочтительно, отличных от O18A. В предпочтительном варианте осуществления один или более дополнительных конъюгатов или биоконъюгатов содержат по меньшей мере одно, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или все девять O-антигенных полисахаридов, выбранных из группы, состоящей из серотипов E.coli O1, O2, O4, O6, O8, O15, O16, O25 и O75.

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

Используемый в настоящем документе термин "O18" относится к антигену E.coli O18 (серотип E.coli O18) и может представлять собой антиген O18A, O18B, O18A1 или O18B1 (каждый из четырех подсеротипов серотипа E.coli O18), а в предпочтительных вариантах осуществления O18 относится к O18A. Антигенный полисахарид O18A может содержать структуру формулы (O18A), как показано в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, например 3-50, предпочтительно 5-40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Термин "O1A" относится к антигену E.coli O1A (субсеротип серотипа E.coli O1). Термин "O2" относится к антигену E.coli O2 (серотип E.coli O2). Термин "O4" относится к антигену E.coli O4 (серотип E.coli O4), который может включать или не включать в себя боковое ответвление глюкозы (называемое гликозилированным антигенным полисахаридом O4 (O4-Glc+) и негликозилированным антигенным полисахаридом O4 (O4-Glc-) соответственно; в предпочтительных вариантах осуществления O4 представляет собой O4-Glc+). Термин "O6A" относится к антигену E.coli O6A (субсеротип серотипа E.coli O6). Термин "O8" относится к антигену E.coli O8 (серотип E.coli O8). Термин "O15" относится к антигену E.coli O15 (серотип E.coli O15). Термин "O16" относится к антигену E.coli O16 (серотип E.coli O16). Термин "O25B" относится к антигену E.coli O25B (субсеротип серотипа E.coli O25). Термин "O75" относится к антигену E.coli O75 (серотип E.coli O75).

Структуры O-антигенных полисахаридов E.coli, упомянутые в настоящем изобретении, показаны ниже в табл. 1. Показана одна единица повтора для каждого O-антигенного полисахарида E.coli.

Структуры O-антигенных полисахаридов *E. coli*

O-антигенный полисахарид <i>E. coli</i>	Структура единицы повтора ¹
Негликозилированный антигенный полисахарид O4 (O4-Glc-)	$[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-FucpNAc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow)]_n$
Гликозилированный антигенный полисахарид O4 (O4-Glc+)	$\begin{array}{c} \alpha\text{-D-Glcp} \\ \\ 1 \\ \downarrow \\ 3 \\ [\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-FucpNAc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow)]_n \end{array}$
Антигенный полисахарид O1A (O1A)	$\begin{array}{c} [\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow)]_n \\ \\ 2 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta\text{-D-ManpNAc} \end{array}$
Антигенный полисахарид O2 (O2)	$\begin{array}{c} [\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow)]_n \\ \\ 2 \\ \uparrow \\ 1 \\ \alpha\text{-D-Fucp3NAc} \end{array}$
Антигенный полисахарид O6A (O6A)	$\begin{array}{c} [\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpNAc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Manp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Manp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow)]_n \\ \\ 2 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta\text{-D-Glcp} \end{array}$
Антигенный полисахарид O8 (O8)	$\alpha\text{-D-Manp3Me-(1}\rightarrow [3)\text{-}\beta\text{-D-Manp-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow)]_n$
Антигенный полисахарид O15 (O15)	$[\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-FucpNAc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow)]_n$
Антигенный полисахарид O16 (O16)	$\begin{array}{c} [\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Galf-(1}\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow)]_n \\ \\ 2 \\ \uparrow \\ \text{Ac} \end{array}$
Антигенный полисахарид O18A (O18A)	$\begin{array}{c} [\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow)]_n \\ \\ 3 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta\text{-D-GlcpNAc} \end{array}$
Антигенный полисахарид O18B (O18B)	$\begin{array}{c} [\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow)]_n \\ \\ 3 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta\text{-D-Glcp} \end{array}$

Антигенный полисахарид O18A1 (O18A1)	$ \begin{array}{c} \alpha\text{-D-GlcP} \\ \downarrow \\ 1 \\ \downarrow \\ 6 \\ \downarrow \\ [\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-GlcP}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcPNAc}\text{-}(1\rightarrow)]_n \\ \uparrow \\ 3 \\ \uparrow \\ 1 \\ \uparrow \\ \beta\text{-D-GlcPNAc} \end{array} $
Антигенный полисахарид O18B1 (O18B1)	$ \begin{array}{c} \alpha\text{-D-GlcP} \\ \downarrow \\ 1 \\ \downarrow \\ 4 \\ \downarrow \\ [\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-GlcP}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcPNAc}\text{-}(1\rightarrow)]_n \\ \uparrow \\ 3 \\ \uparrow \\ 1 \\ \uparrow \\ \beta\text{-D-GlcP} \end{array} $
Антигенный полисахарид O25B (O25B)	$ \begin{array}{c} \beta\text{-D-GlcP} \\ \downarrow \\ 1 \\ \downarrow \\ 6 \\ \downarrow \\ [\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcP}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcPNAc}\text{-}(1\rightarrow)]_n \\ \uparrow \qquad \qquad \qquad \uparrow \\ 3 \qquad \qquad \qquad 2 \\ \uparrow \qquad \qquad \qquad \uparrow \\ 1 \qquad \qquad \qquad \text{Ac} \\ \uparrow \\ \alpha\text{-L-Rhap} \end{array} $
Антигенный полисахарид O75 (O75)	$ \begin{array}{c} \beta\text{-D-Manp} \\ \downarrow \\ 1 \\ \downarrow \\ 4 \\ \downarrow \\ [\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcPNAc}\text{-}(1\rightarrow)]_n \end{array} $

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

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

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

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

В определенных вариантах осуществления антигенный полисахарид O2 (например, в выделенной форме или как часть гликоконъюгата, предпочтительно биоконъюгат) присутствует в (фармацевтиче-

ской) композиции, как описано в настоящем документе (например, композиции, содержащей биоконъюгат E.coli O18, полученный способом, описанным в настоящем документе). Антигенный полисахарид O2 может содержать структуру формулы (O2), как показано в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, например 3-50, предпочтительно 5-40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Предпочтительно, антигенный полисахарид O2 является частью конъюгата, более предпочтительно биоконъюгата, и ковалентно связан с белком-носителем, например EPA.

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

В определенных вариантах осуществления антигенный полисахарид O6A (например, в выделенной форме или как часть гликоконъюгата, предпочтительно биоконъюгат) присутствует в (фармацевтической) композиции, как описано в настоящем документе (например, композиции, содержащей биоконъюгат E.coli O18, полученный способом, описанным в настоящем документе). Антигенный полисахарид O6A может содержать структуру формулы (O6A), как показано в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, например 3-50, предпочтительно 5-40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Предпочтительно, антигенный полисахарид O6A является частью конъюгата, более предпочтительно биоконъюгата, и ковалентно связан с белком-носителем, например EPA.

В определенных вариантах осуществления антигенный полисахарид O8 (например, в выделенной форме или как часть гликоконъюгата, предпочтительно биоконъюгат) присутствует в (фармацевтической) композиции, как описано в настоящем документе (например, композиции, содержащей биоконъюгат E.coli O18, полученный способом, описанным в настоящем документе). Антигенный полисахарид O8 может содержать структуру формулы (O8), как показано в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, например 3-50, предпочтительно 5-40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Предпочтительно, антигенный полисахарид O8 является частью конъюгата, более предпочтительно биоконъюгата, и ковалентно связан с белком-носителем, например EPA.

В определенных вариантах осуществления антигенный полисахарид O15 (например, в выделенной форме или как часть гликоконъюгата, предпочтительно биоконъюгат) присутствует в (фармацевтической) композиции, как описано в настоящем документе (например, композиции, содержащей биоконъюгат E.coli O18, полученный способом, описанным в настоящем документе). Антигенный полисахарид O15 может содержать структуру формулы (O15), как показано в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, например 3-50, предпочтительно 5-40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Предпочтительно, антигенный полисахарид O15 является частью конъюгата, более предпочтительно биоконъюгата, и ковалентно связан с белком-носителем, например EPA.

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

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

В определенных вариантах осуществления антигенный полисахарид O75 (например, в выделенной форме или в составе гликоконъюгата, предпочтительно биоконъюгата) присутствует в (фармацевтической) композиции, как предложено в данном документе (например, в композиции, содержащей биоконъюгат E.coli O18, полученный способом, описанным в настоящем документе). Антигенный полисахарид O75 может содержать структуру формулы (O75), как показано в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, например 3-50, предпочтительно 5-40, например 7-25, например 10-20. Предпочтительно, антигенный полисахарид O75 является частью конъюгата, более предпочтительно биоконъюгата, и ковалентно связан с белком-носителем, например ЕРА.

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

В предпочтительных вариантах осуществления композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит по меньшей мере антигенные полисахариды E.coli O1A, O2, O4 (предпочтительно гликозилированный O4), O6A, O15, O16, O18 (предпочтительно O18A), O25B и O75, предпочтительно конъюгаты антигенных полисахаридов O1A, O2, гликозилированного O4, O6A, O15, O16, O18A, O25B и O75, каждый из которых независимо ковалентно связан с белком-носителем, например ЕРА (т.е. по меньшей мере 9-валентная композиция). В определенных вариантах осуществления такие композиции дополнительно содержат антигенный полисахарид E.coli O8, предпочтительно в форме конъюгата, предпочтительно биоконъюгата. В определенных вариантах осуществления такие композиции (с антигенным полисахаридом O8 или без него) содержат дополнительные O-антигенные полисахариды E.coli из других серотипов, предпочтительно конъюгированные с белком-носителем, предпочтительно биоконъюгаты, например из 2-10 дополнительных серотипов. В определенных вариантах осуществления предложены фармацевтические композиции, содержащие по меньшей мере девять биоконъюгатов, причем каждый биоконъюгат содержит белок-носитель, ковалентно связанный с O-антигенным полисахаридом E.coli из другого серотипа, причем серотипы включают O18A (и биоконъюгат O18A представляет собой биоконъюгат в соответствии с настоящим изобретением, который был получен с использованием способа в соответствии с настоящим изобретением), O1A, O2, O4-Glc+, O6A, O15, O16, O25B и O75. В определенных вариантах осуществления белок-носитель представляет собой ЕРА, имеющую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 3.

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

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

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

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

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

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

В настоящем документе термин "внекишечная патогенная *E.coli*" или "ExPEC" относится к генетически родственным патогенным штаммам *E.coli*, которые обычно проникают, колонизируют и вызывают заболевание в областях организма за пределами желудочно-кишечного тракта. Бактерии ExPEC включают уропатогенную (UPEC) *E.coli*, *E.coli*, вызывающую менингит новорожденных, *E.coli*, ассоциированную с септициемией (SePEC), адгезивно-инвазивную (AIEC) *E.coli* и птичью патогенную *E.coli* (APEC). Заболевания, связанные с инфекциями ExPEC или ExPEC, включают, но не ограничиваются ими, инфекцию мочевыводящих путей (ИМП), инфекцию в месте хирургического вмешательства, бактериемию, инфекцию брюшной полости или таза, такую как внутрибрюшная инфекция (ВБИ), пневмонию, нозокомиальную пневмонию, остеомиелит, воспаление подкожной клетчатки, пиелонефрит, раневую инфекцию, менингит, неонатальный менингит, перитонит, холангит, инфекции мягких тканей, пиомиозит, септический артрит и сепсис.

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

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

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

- (i) женщина в возрасте от около 16 до около 50 лет, например от около 16 до около 35 лет;
- (ii) взрослый человек старше 50 лет, или старше 55 лет, или старше 60 лет, или старше 65 лет;
- (iii) человек, страдающий от рецидивов ИМП;
- (iv) человек, имеющий или подверженный риску получить бактериемию или сепсис, вызванный *E.coli*;
- (v) человек, находящийся в состоянии, требующем использования катетера;
- (vi) человек, которому проводят запланированное хирургическое вмешательство;
- (vii) женщина в постменопаузе или
- (viii) человек, страдающий диабетом.

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

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

Описание последовательностей

Таблица 2

Последовательности

Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO:
Полимераза Wzy O18 (аминокислотная последовательность)	MIYILTLTLLLVIAIMFSLGTSRITSPLPLHFLPWLLTLIVGISNYDQFY EFNERSFYSLLIWFTVIFIFYFIGELVNYKRENINVYYGLSHIKYECKKYW IIVIPISLYTIFEIYMVGMGGADGFFLNRLANTLEGYTGKKFILMPAVYP LMMAMFAIVCLTKTSKLNKYSIYFWMFLY CIGTMGKFSILTPILTYLIY DFKHRLKVKKTIKFTLLIILALTLHFTRMAENDHSTFLSILGLYIYSPIAL GQLNEVNSSHFGHEYTFRFIYAITNKIGLIKELPVNTILDYSYVPVPTNVYT ALQPFYQDFGYTGIFGAVLYGLIYVSLYTAGVVRGNNTQALLIYALFSVS SATAFFAETLVNLAGNVMLVLCITILLWRFTVICKPVQ	1
Полимераза Wzy O18 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGATATATATATTAACCTTAACTCTTCTTCTAGTTATAGCCATAATG TTTTCTCTTCTCGGCACAAAAAGTAGGATCACATCTCCATTACCTTTG CATTTTTTACCATGGTTACTAACTTTAATTGTCGGGATAAGTAATTAC GATCAATTTTACGAGTTTAATGAAAGAAGCTTTTACTCTTTGTTGATT TGGTTTACAGTTATTTTTATATTTTATTTTCATAGGGGAACCTGGTTAAT TATAAACGTGAAAATATAAATGTTTATTATGGTCTTTCACATATTA ATATGAATGTAAAAAATATTGGATCATTGTCATCCCAATTTTCATTAT ATACCATTTTCGAAATATATATGGTTGGTATGGGGGGAGCAGATGGA TTCTTTCTCAATTTACGTCTTGCAAATACATTGGAGGGCTATACGGGT AAAAAATTTATCTTAATGCCTGCTGTATATCCTCTAATGATGGCTAT GTTTCGCAATTGTTTGTCTAACAAAAACTTCCAAATTAATAAATACT CCATTTATTTCTGGATGTTTTGTATTGTATTGGCACAATGGGAAAAAT TTCAATATTAACGCCAATATTGACATATTTAATTATTTATGACTTCA AACATAGATTAAGTAAAAAACAATAAAGTTTACATTGTTGAT AATTATATTAGCTTTAACTTTGCATTTTACACGTATGGCTGAGAATG ACCACTCAACATTTTTATCTATTTTAGGGCTCTATATTTATTCACCAA TAATTGCTTAGGCCAGTTGAATGAAGTAAATAGTAGTCATTTTGGT	2

	GAGTATACGTTTAGATTCATATATGCTATAACTAATAAAAATTGGCCT TATTAAGAATTGCCAGTAAATACTATTCTTGACTATTCATACGTTCC TGTACCAACAAATGTATATACTGCACTTCAACCATTTTACCAGGATT TTGGTTATACTGGCATCATATTTGGAGCAGTATTATACGGACTAATA TATGTGAGTTTATACACGGCCGGTTCGTGGAAATAATACACAGGC ATTACTGATTTACGCATTGTTTTTCAGTTAGCAGTGCAACGGCTTTCTT CGCTGAAACGCTAGTAACGAATTTAGCTGGAAATGTGATGTTAGTAT TATGTACCATCTTACTATGGCGATTTACAGTAATATGCAAACAGTA CAGTAA	
Детоксифицированный белок EPA, содержащий 4 оптимизированные последовательности N- гликозилирования	GSGGGDQNAATGSGGGKLAEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVSSRMS VDPAIADTNQGVLHYSMVLEGGNDALKLAIDNALSITSDGLTIRLEGG VEPNKPVRYSYTRQARGSWSLNWLVPIGHEKPSNIKVFHIELNAGNQLS HMSPITYTIEMGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMOQPLAISHAGVSVV MAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNYLAQQRCNLDDTWE GKIYRVLAGNPAKHDLDIKDNNSPTVISHRLHFPEGGSLAALTAHQ CHLPLEAFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQV IRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLALTLAAESERFVRQGTGNDEA GAASADVSLTCPVAKDQNRKGECAAGPADSGDALLERNYPTGAFL GDGGDVFSSTRGTQNWTVRLLQHRQLEERGYVFGYHGTFLAAQ SIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNG ALLRVYVPRWSLPGFYRTGLTLA APEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPE EEGGRVTLGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALP DYASQPGKPPREDLKLGS GGGDQNAAT	3
Оптимизированная консенсусная последовательность N- гликозилирования	Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты, за исключением Pro	4
Генный кластер O18A	<i>r/b</i> ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCTGTAGCGGGTCTTGGGATGCA TATGTTGCCCTGCCACTAAGGCGATTCCCAAAGAGATGCTACCGATCG TCGACAAGCCAATGATTCAGTACATCGTTGACGAGATTGTGGCTGCA GGGATCAAAGAAATCCTCCTGGTAACTACGCGTCCAAGAACGCGG TCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAATTAGAATCTCTCCTTGAA CAGCGCGTGAAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATTTGCC CGCCGGGCGTGACAATTATGAACGTGCGTCAAGGCGAACCTTTAGG TTTGGGCCACTCCATTTTATGTGCACGACCTGCCATTGGTGACAATC CATTTGTCGTGGTGCTGCCAGACGTTGTGATCGACGACGCGCAGCGC GACCCGCTGCGCTACAACCTTGTGCCATGATTGCGCGCTTAAACGA AACTGGCCGACGCGAGGTTCTGGCAAAACGCATGCCGGGCGATCTC TCTGAATACTCCGTCATCCAGACTAAAGAACCGCTTGATCGCGAAGG TAAAGTCAGCCGATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGATCAGCCGC AGACCCTGGACTCAGACATCATGGCTGTAGGGCGTTATGTGCTTTCT GCCGATATTTGGCCTGAACCTGGAGCGTACTCAACCTGGAGCATGGG GACGTATTCAGTTGACTGATGCCATTGCTGAGTTGGCAAAAAACAA GCAGTTGACGCAATGCTGATGACTGGGACAGTTACGACTGCGGAA AGAAAATGGGTTATATGCAAGCGTTTGTGAAGTATGGGCTGCGTAA CCTAAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAGGGATTGAGAAGCTGTTA AGCGAATAATGAAAATCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAAT TATAACGGCAGTGAAGATTAGCGGCGAAAAGTAATTTGTTGCGAATTT TCCTGCCGTTGTTTTATATAAACAATCAGAATAACAACGAGTTAGCA ACAGGATTATCGTCAAAGTTTTCCAGGATTTTCCCTTGTTCAGAGC GGATTGGTAAGACAATTAGCTTCTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAG TGGGTAACACTCGTCACATCGTAGGCATGCATGCAGTGCTCTGGTAG CTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATACCTCTATTAATCAA ACTGAGAGCCGCTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATA AATTAAGTGAATACTTGTACTGGTGGCGCAGGATTTATTGGTTC TGCTGTAGTTCGTCACATTAATAATGATACGCAGGATAGTGTGTTA ATGTCGATAAATTAACGTACGCCGAAAACCTGGAATCAGTTGCAGAT GTTTCTGATTCTGAACGCTATTTCTTTGAACATGCGGATATTTGTGAT GCAGCTGCAATGGCACGGATTTTTGCTCAGCATCAGCCGGATGCAGT GATGCACCTGGCAGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTCAATTACAGGCC CTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTTGGTACTTATGTCTTTTAG AAGCGGCTCGGAATTAAGTCTGCACTTGTATGGCGACAAGAAAA CAGCTTCGTTTTCATCATATTTCTACTGACGAAGTCTATGGTATTT GCCTCATCCTGACGAGGTAATAATAAAGAAGGATTACCCTTATTTA CTGAGACGACAGCCTACGCACCAAGCAGCCCTTATTCTGCATCAA	5

<p> AGCGTCCAGCGATCATTTAGTCCGTGCGTGGAAACGTACCTATGGTT TACCGACCATTGTGACTAATTGCTCTAACAATTATGGTCCTATCATT TCCCGGAAAAATTGATTCCATTGGTTATTCTGAATGCTCTGGAAGGT AAAGGATTACCTATTTATGGAAAAGGCGATCAAATTCGCGACTGGCT GTATGTTGAAGATCATGCGCGTGCCTTATATACCGTCGTAACCGAAG GTAAAGCGGGTGAACCTTATAACATTGGTGGACACAACGAAAAAGAA AAACATCGATGTAGTGCTCACTATTTGTGATTTGTTGGATGAGATTG TCCCGAAAGAGAAATCTTACCGCGAGCAAATTAATTATGTTGCCGAT CGTCCGGGACACGATCGACGTTATGCGATTGATGCTGAGAAGATTG GTCGCGAATTGGGATGGAAACCACAGGAAACGTTTGAGAGCGGGAT TCGTAACACTGTGGAATGGTATCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATA ATGTGAAAAGTGGTGCTATCAATCGTGGATTGAACAGAATAATGA GGGCCGCCACTAATGAATATCCTCCTTTTTGGCAAAACAGGGCAGGT TGGTTGGAACTACAGCGTGCTCTGGCACCTCTGGGTAATTTGATTG CTCTTGATGTTCACTCCACTGATTACTGTGGTGATTTTAGTAACCCTG AAGGTGTGGCTGAAACCGTTAGAAGCATTGCGCCTGATATTATTGTC AACGCAGCCGCTCACACCGCAGTAGACAAAGCAGAATCAGAACC AGTTTGCACAATTACTGAACGCGACGAGTGTCGAAGCGATCGCGAA AGCAGCCAATGAAGTCGGCGCTTGGGTTATTCACTACTCTACTGACT ACGTATTTCCGGGGACCGGTGAAATACCATGGCAGGAGGAGGATGC AACCGCACCGCTAAATGTTTACGGTGAAACCAAGTTAGCAGGAGAA AAAGCATTACAAGAGCATTGTGCGAAGCACCTATTTTCCGGACCAG CTGGGTCTATGCAGGTAAGGAAATAACTTCGCCAAAACGATGTTG CGTCTGGCAAAAAGAGCGTGAAGAATTAGCCGTTATTAATGATCAGTT TGGTGCGCCAACTGGCGCAGAGTTGCTGGCTGATTGTACGGCACATG CCATTCGTGTGGCACTGAATAAACCGGAAGTCGAGGTTTGTACCAT CTGGTAGCCAGTGGTACCACAACCTGGCACGATTATGCTGCGCTGGT TTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGCATTCCCCTTGCACTCAACAAG CTCAACGCAGTACCAACAACAGTCTATCCTACACCAGCTCGTCGTC ACATAACTCTGCCTTAATACAGAAAAATTTACGAGAATTTTCCGCG TTGTCTTGCTGACTGCGCAGGTTGGTGTGAAACGCATGCTCAACGAA TTATTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTGAT GGTGGAAACAAGATGAATTAAGGAATGATGGAATGAAAACGCGTA AAGGTATTATTTAGCGGGTGGTTCTGGTACACGCTTTATCCTGTGA CTATGGCTGTCAGTAAACAGCTGTTACCGATTTATGATAAACCGATG ATCTATTACCGCTCTCTACTGATGTTGGCGGGTATTTCGCGATATT TTGATTATCAGCAGCCACAGGATACTCCTCGTTTTCAACAACGCT GGGTGATGGGAGCCAGTGGGGGCTAAATCTTCACTACAAAGTGCAA CCGAGTCCGGATGGTCTTGGCGAGGCATTTATCATCGGTGAAGAGTT TATCGGTGGTATGATTGTGCTTTGGTACTTGGTGATAAATATCTTCTA CGGTACAGACCTGCCTAAGTTAATGGATGCCGCTGTTAACAAAGAA AGTGGTGCAACGGTATTTGCCTATCACGTTAATGATCCTGAACGCTA TGGTGTGTTGAGTTTGATAAAAACGGTACGGCAATTAGCCTCGAAG AAAAACCGCTACAACCAAAAAGTAATTATGCAGTAACCGGGCTTTA TTTCTATGATAACTACGTTGTGGAATGGCGAAAAATCTTAAGCCTT CTGCCCGGGTGAACGGAAATTACCGATTAACCGTATTTATATG GAACAGGGGCATTTATCTGTTGCCATGATGGGACGTGGTTATGCATG GCTGGACACGGGGACACATCAGAGTCTTATTGAAGCAAGCAACTTC ATTGCCACCATTGAAGAGCGCCAGGGACTAAAGGTTTCTCGCCAG AAGAAATTGCTTATCGTAAAGGATTTATTGACGCAGAGCAGGTTAA GGTATTAGCCGAACCGCTGAAGAAAAACGCTTATGGTCAGTATTTGC TGAAAATGATTAAGGTTAGTAATAAAATGAATGTTATTAACAG AAATTCAGACGTAAGTATTTTGAACCGAAAGTTTTTGGTGACGAG CGCGGTTTCTTTTTCGAAAGCTATAACCAGAGGGTTTTTGGGAAGC TGAGGTGCGCAAAGTTGAGTTTGTTCAGGATAACCATTCTAAATCGA GAAAAGGAGTATTGCGGGATTGCATTATCAATTAGAGCCGATGCG GCAAGCAAACTTGTGCGTTGCATTGAGGGTGAAGTATTTGATATTG CTGTAGATATACGGAAGTCATCTCCATTTTTTGGTAAATGGGTTGGT GTAACATTATCCGCTGAAAATAAACGTCAATTATGGATCCCTGAAGG GTTTGTCTATGGTTTTGTGGTGATTAGTGATACTGCGGAATTTGTCTA TAAAACGAACAATTATTACAGTCAACAAGCAGAGCGAAGCATAATT TTTGATGATAAAGACTTAGGGATTGCTTGGCCATTGAATACTCATTA TATTCTTTCAGAAAAAGATTTAAATGCGCCAACATTTAAGAAAATAT CGAGTAATGAGTATTTTAAATGAGTTTAAATCAAAAACAGTTTTTGG ACCTTTGCGGGTATGTACTTCCAGCTATTGTGACTACCAGCTTTG </p>	
---	--

	GGTATTATGGGGCGAAAATTAGGCCGAGAATTATTTGGTGTATTAC TTTGGCATTAGCTGTTGTGGGTTATGCAAGCATTITTTGATGCAGGCCT TACTCGCGCAGTGATACGAGAAGTCGCAATTGAAAAAGATAATGAA GAAAATAAGTTGAAAATTATTTCTTCAGCGACAGTTGTAATTATTTA TTGAGTTTGGCCGCCTCACTCTTATTATTTTTTTTTAGTGGTCATATC GCATTGCTACTGAACATTAGTGAGACTTTTTTTCATAATGTAAGTGT TCGCTTAAAATTCTCGCAGCATCCATACCATTATTTTTGATTACTCAA ATATGGTTGTCAATTTAGAAGGTGAAGAAAGATTTGGTTTACTTAA TATCTACAAATCAATTACGGGAGTGATATTAGCAATCTCACCGGCAT TATTTATACTTATTAACCCTCTTTGATGTATGCGATAATAGGCTTAG TTCTAGCAAGGTTTTATGTTTTATTTTGGCTTTTTATAAATTTACAG ATAAAGTGCTTAAAGCTAAACTAAACAATCGATATACCAACAATTA AAGATTGTTTATGTTCCGGTGGTGGATTACAGTAAGTAATATCATCA GCCCTGTGCTATCATATTTGATAGGTTTATTGTTTCAAATCAACTTG GGGCTGCTAATGTTGCTTTTTATACTGCACCATCAGAAATTTTCTC GGCTTAGTATAAATCCAGGTGCGTTTTCAAGAGCCTTATTTCCAAGA TTAGCTAATGCAAATAATCCGCTGAAAGATATAAAACGAAAAGAT TAATTACAATTTCACTTTTAATAATCATCACCCCTATTTTTTGTATTG GCGTGTATTTTTAGAGAAGATAATGGTTTTATGGATGGGGGCATCA TTTTTTGGTGAGCCTGGTTTGGTATTATCAATATTACTGATTGGCTTT ATTTTTAATGGATTGGCACAAGTACCATTTGCCAGTATCAATCCCG AGGTATGCTAAGATAACTGCATTTGTTTCATCTCTTAGAGTTGTTCC TTATTTACTTTTATTTTACCTCATAAAAGCACATGGGGTGTGG CGCGGGTATTGCGTGGTCACTGAGGATGATAGTAGATTATATAGCAT TAAGTCTTTTGGACGGTAAGTATATTAATAAATAAAATTCAAAATGC AAGTTAATAACTCATGGCTTTATTTGGGTAGGTGACAATTTATAATG ATATATATATTAACTTTAACTTCTTCTAGTTATAGCCATAATGTTT TCTCTTCTCGGCACAAAAGTAGGATCACATCTCCATTACCTTTGCA TTTTTTACCATGGTTACTAACTTTAATTGTCCGGGATAAGTAATTACGA TCAATTTTACGAGTTTAAATGAAAGAAGCTTTTACTCTTTGTGATTG GTTTACAGTTATTTTTATATTTTTATTTTCATAGGGGAAGTGGTTAATTA TAAACGTGAAAATATAAATGTTTATTATGGTCTTTCACATATTAAT ATGAATGAAAAAATATTGGATCATTGTCATCCCAATTTTATTATAT ACCATTTTCGAAATATATATGGTTGGTATGGGGGGAGCAGATGGATT CTTTCTCAATTTACGTCTTGCAAATACATTGGAGGGCTATACGGGTA AAAAATTTATCTTAATGCCTGCTGTATATCCTCTAATGATGGTATGT TCGCAATTGTTGTCTAACAAAAACTTCCAAATTAATAAATACTCC ATTTATTTCTGGATGTTTTTGTATTGTATTGGCACAATGGGAAAATTT TCAATATTAACGCCAATATTGACATATTTAATTATTTATGACTTCAAA CATAGATTAAGTAAAAAAAACAATAAAGTTTACATTGTTGATAA TTATATTAGCTTTAACTTTGCATTTTACACGTATGGCTGAGAATGACC ACTCAACATTTTATCTATTTTAGGGCTCTATATTTATTCACCAATAA TTGCTTTAGGCCAGTTGAATGAAGTAAATAGTAGTCATTTTGGTGAG TATACGTTTAGATTCTATATATGCTATAACTAATAAAAATTGGCCTATT AAAGAATTGCCAGTAAATACTATTCTTGACTATTACATACGTTTCTGT ACCAACAAATGTATATACTGCACCTTCAACCATTTTACCAGGATTTTG GTTATACTGGCATCATATTTGGAGCAGTATTATACGGACTAATATAT GTGAGTTTATACACGGCCGGTGTTCGTGGAATAATACACAGGCATT ACTGATTTACGCATTGTTTTAGTTAGCAGTGCAACGGCTTTCTTCGC TGAAACGCTAGTAACGAATTTAGCTGGAAATGTGATGTTAGTATTAT GTACCATCTTACTATGGCGATTTACAGTAATATGCAAACCAGTACAG TAACCATTCTAATGGCCACCTACAATGGCGAGGCCTTCATCAAAAAT CAGATTTTGTCACTACAACAACAACATTTTCTAACTGGCGGTTATT TATTCAGGATGATGGGTCTACAGACAATACTATATCTATAATAAAAA ACTTCCAAAAATCTGACTCCAGAATTCGGCTAGTTGATGATAATTTG AAAGGTCAAGGTGCAGGAAAAAATTTTTATCGCTGATAAAGTACA GCGAGACAGATTATACAATTTATTGTGACCAAGATGATATTTGGTTA GAAAACAAAATATTTGAATTAGTAAAGTATGCAAATGAAATTAAT TGAATGTATCAGATGCGCCTTCGCTAGTTTATGCTGATGGCTATGCTT ATATGGATGGTGAAGGTACAATCGATTTTTCTGGGATATCTAACAAT CATGCTGATCAATTAAGGATTTTCTTTTTTTAATGGTGGATACCAA GGATGTTCTATTATGTTCAATCGTGCAATGACCAAAATTTCTGTAAT TATCGAGGATTTGTATATCTACATGACGATATCAACAACATTTAGCTGC ATACGCTCTTGGTAAAGTTTATTTCTCCCGAAATACCTTATGTTATA TAGACAGCACAGAAATGCGGTAAGTGTATCAAAACATTCGCAAT	
--	--	--

<p> GGATTGACTTCTAAATTTAAATCACCAGTAAACTATCTTTTATCAG AAAACATTATCAGGTAATAAAATCTTTTTTTGAATGTAACAGCTCTA TCTTATCAGAGACGAATAAAAAAGTTTTTTTTGGATTTTATTTCATTTT GTGAATCAATAATAAATTTACAGATTTTTTTAAGTTATGGCGAGGT GGGTTTAGATTAATAAACAGTAGAACTAAATTATTATTAATAAATCTT AATACGGAGAAAATTTAGCGAATGATTTCAATACTTACACCTACTTT TAATCGGCAACATACTTTATCAAGGCTATTCAATTCTCTTATATTACA AACTGATAAAGATTTTGAGTGGATAATAATTGATGATGGTAGTATAG ATGCAACAGCGGTAAGTGTAGAAAGATTTTAGAAAAAATGTGATTT GACTTGATTTATTGCTATCAGGAAAATAATGGTAAGCCCATTGGCTTT AAACGCTGGTGTAAAGCTTGTAGAGGCGATTATATCTTTATTGTTG ACAGTGATGATGCTACTAACTCCCGATGCCATAAAAATTAATAAAGA ATCAATACATGATTGCTTATCTGAGAAGGAAAAGTTTCAGCGGAGTCG GTTTTAGAAAAGCATATATAAAAGGGGGGATTATTGGTAATGATTTA AATAATCTTCAGAACATATATACTATTTAAATGCGACTGAGATTAG CAATTTAATAAATGGTGATGTTGCATATTGTTTTAAAAAAGAAAGTT TGGTAAAAAATCCATTCCCCGTATAGAAGATGAAAAAATTTGTCCA GAATTATATATTTGGAATAAAAATAACTGACAAGGCGAAGATTCCGATT TAACATAAGCAAAGTTATATATCTTTGTGAGTATCTTGATGATGGTC TTTCTAAAAATTTCCATAACCAGCTTAAAAAATACCCAAAGGGGTTT AAGATTTATTACAAAGATCAAAGAAAACGAGAGAAAACCTATATAA AAAAAACAAAGATGCTAATTAGATATTTGCAATGTTGTTATTATGAG AAAATAAAATGAAAATACTATTTGTCATTACAGGTTTAGCCCTTGA GGTGCTGAGAAGCAGGTTTGTCTTTTAGCTGATAAATTAAGTTAAG CGGGCACCATGTAAGATTATTTCACTTGGACATATGTCTAATAATA AAGTCTTTCCTAGCGAAAATAATGTTAATGTCATTAATGTAATATG TCAAAAAACATTTCTGGAGTTATAAAAGGTTGTGTCAGAATTAGAGA TGTTATAGCTAATTTCAAACCAGACATTGTACACAGTCATATGTTTC ATGCAAACATTATCACTAGATTGTCTGTAATTGGAATCAAAAAACA CCTGGTATTATCAACTGCACATAATAAAAATGAAGGTGGGTATT CAGAATGCTCACATATAGAATAACCGATTGTTAAGTGATTGTTGTA CAAATGTTAGCAAAGAACAGTGGATGAGTTTTTACGGATAAAAGC CTTTAATCCCGCTAAAGCAATTACTATGTATAATGGGATAGATACCA ATAAATTTAAATTTGATTTATTGGCAAGGAGGGAAATTCGAGACGGT ATTAATATAAAAAATGATGATATATTACTTGTGTCAGGTCGTTT AACGTTAGCTAAAGATTATCCTAATTTATTGAATGCAATGACTCTGC TTCTGAACACTTTAACTTATTATTATTGGTGATGGTGAATTCGCTG ACGAAATTAATATGCTTATAAAAAAATTGCAATTATCTAATAGGGTG TCCTTGTGGGAGTTAAAAAATATTGCTCCCTATTTTTCTGCATGT GATATTTTGTCTCTCTCTCTCGTTGGGAAGGATTTGGATTAGTCGTG GCAGAAGCTATGTCATGTGAGCGAATTGTTGTTGGCACGGATTCAGG GGGAGTAAGAGAAGTTATTGGTGACGATGATTTTCTGTACCCATAT CTGATTCAACACAACCTTGAAGCAAAATTGAAAAATTGCTTTTGAGC CAGATACGTGATCACATTGGTTTTCGGAATCGTGAGCGTATTTTAAA AAATTTCTCAATAGATACTATTATTATGCAGTGGCAAGAACTCTATG GACTATAATTTGCTCAAACATGAAAGGTAGATTTATATTTGGAAC GTGTCTTTGTTGAATTTAATTCAATCTCAATTGAGATTTTTGTATT CAAAAATACCATCATAGCTAACGATGATTGGTATTTATTTTAAAGATG CTTTCTATAAATATATTGACGTTTTTAATGCGCCGAAACGATTTGGC TGGGAACAGAGAAGTAAAACCTGTTTTGAGAATGAAGAGTTTTTGAG ATGTTTATGGATATTAAAAATTGATCCAGTGAATTAATTATTTATAA TAAATCAAGATTTAATGTTAATAAATGATAATCTTTTCTGACTCA TATTAATTATGAGTGGTACGTTTGGTAAACGGTAAACTATTATATGA CAGCTAGAACAACATAAAGTTTTGCACCTACAATTACTCCACTCTTA AGTGGCGTTCAAAGGGTAACATTAACGAAATTAGTGCCTTATATAC TGATTATGATTATACACTAGTTTGCTCAAAAAAAGGTCCACTAACA AAGCATTGCTGGAATATGATGTCGATTGTCATTGTATCCCCGAACCT ACGAGAGAAATTACCGTAAAGAATGATTTTAAAGCATTGTTCAAGCT TTATAAGTTCATAAAAAAAGAAAAATTTGACATTGTGCATACACATT CTTCAAAAACAGGTATTTTGGGGCGAGTTGCTGCCAAATTAGCACGT GTTGGAAGGTGATCCACACTGTACATGGTTTTTCTTTCCAGCCGC ATCTAGTAAAAAAGTTATTACCTTTATTTTTTCATGGAATGGATAG CAAAGTTCTTTACGGATAAGTTAATCGTCTTGAATGTAGATGATGAA TATATAGCAATAAACAAATTAATAATCAAGCGGGATAAAGTTTTTTT AATTCCTAATGGAGTAGACTGATAAGTTTTCTCCTTAGAAAATA </p>

	AAATTTATAGTAGCACCTTGAATCTAGTAATGGTTGGTAGATTATCC AAGCAAAAAGATCCTGAGACATTATGCTTGCTGTTGAAAACTGCT GAATGAAAATGTTAATGTTAAGCTGACACTTGTAGGAGATGGTGAA CTAAAAGAACAGTTAGAAAAGCAGGTTCAAACGGCAAGATGGACGTA TAATTTTTTCATGGATGGTCAGATAACATTGTTAATATTTTAAAAGTTA ATGATCTTTTTATATTACCTTCTCTTTGGGAGGGTATGCCATTAGCAA TTTTAGAAGCATTGAGCTGTGGACTTCCATGTATAGTCACTAATATT CCAGGTAATAATAGCTTAATAGAAGATGGCTATAATGGTTGTTTGT TGAAATTAGAGATTGTCACTTATTATCTCAAAAAATCATGTCATATG TTGGTAAGCCAGAAGTATTGCACAGCAATCTACCAATGCACGATCA TTTATTCTGAAAAATTATGGATTAGTTAAAAGAAATAATAAGGTCAG ACAGCTATATGATAATTAATGAAACCGAAAAGTTAAAAAAGAACA GGTTTTTCAAAGTGAAAATAAAATTACAGTTTTTTTTATTGCAATGATT AACGTAACATCTGCATTACATTCAAGCCGCACAACCCCGCGGTGACC ACCCCTGACAGGAGTAAACAATGTCAAAGCAACAGATCGGCGTCTGT CGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTCGCGCTCAACATCGAAAGC CGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAAAAGACGGA AGAAGTTATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAAACTGGTTCCCTACTATA CGGTGAAAGAGTTCGTTGAATCTCTTGAAACGCCTCGTCGCATCTG TTAATGGTTAAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCCT GAAACCATATCTCGATAAAGGCGATATCATCATTGATGGTGGTAATA CCTTCTCCAGGACACCATTTCGTCTGAACCGCGAGCTTTCTGCACAA GGCTTTAACTTCATCGGTACGGGTGTTCCGGTGGTGAAGAGGGCGC GCTGAAAGGACCTTCTATCATGCCTGGTGGCAGAAAGAGGCCAT GAACTGGTTGCTCCTATCTGACCAAAATCGCCGCGTGGCTGAAGA TGGTGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGCCGATGGCGCAGGTCACT ATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTGAATACGGTGATATGCAACTG ATTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTGAAAGGTGGTCTGAATCTCTCTAA CGAAGAAGTGGCACAACCTTTACCGAGTGGAATAACGGTGAAGT AGCAGTTACCTGATCGACATCACTAAAGACATCTTCAACAAAAAG ATGAAGACGGTAACCTGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCAGC AAACAAAAGGTACGGGTAATGGACCAGTCAGAGCGCGCTGGATCTC GGTGAGCCACTGTCGCTGATTACTGAGTCTGTGTTTGCACGCTACAT CTTCTACTAAAAGATCAGCGCGTGGCTGCGTCTAAAGTACTGTCCG GTCCACAAGCGCAGCCAGCAGGCGACAAAGCAGAGTTCATTGAAAA AGTTCCCGTGGCTTTATCTGGGTAAGATTGTTTCTTACGCGCAGG GCTTCTCAGCTGCGTGTGCTGCTGAAGAGTACAAGTGGATCTG AACTACGGTGAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCG TGCGCAGTTCCTGCAGAAAATCACCGATGCTTATGCCGAAAATCCGC AGATCGCTAACCTGCTGCTGGCTCCGTAAGCAAATTGCCGAT GACTACCAGCAGGCTCTGCGTGATGTGCTTGTATGCAGTACAGAA CGGTATCCCGGTTCCGACCTTCGCCGCTGCGGTTGCCTATTACGATA GCTACCGTGCCGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGT GACTATTTCCGTGCACATACTTATAAGCGCATTGATAAAGAAGGTGT GTTCCATACTGAATGGCTGGATTGA	
Олигосахарил трансфераза PglB	MLKKEYLKNPYLVLFAMIIAYVFSVFCRFYVWWWASEFNEYFFNQL MIISNDGYAFAEGARDMIAGFHQPNDSLYYGSSLSALTYWLYKITPFSF ESIILYMSTFLSSLVVIPTILLANEYKRPLMGFVAALLASIANSYNRTMS GYDDTDMLVIVLPMFILFFMVRMILKKDFFSLIALPLFIGIYLWWYSSY TLNVALIGLFLIYTLIFHRKEKIFYIAVILSSLTSLNIAWFYQSAIIVLFA ALEQKRLNFMIIIGLSATLIFLILSGGVDPIYLQKIFYIFRSDENLTOG FMYFNVNQTIQEVENVDLSEFMRRISGSEIVFLFSLFGFVWLLRKHKSMI MALPILVLGFLALKGGLRFTIYSPVMALGFGFLSEFKAIMVKKYSQ TSNVCIVFATILTLAPVFIHINYKAPT VFSQNEASLLNQLKNIANREDY VVTWWDYGYPVRYSDVKTLVDGGKHLGKDNFFPSFALSQDEQAAA NMARLSVEYTEKSFYAPQNDILKTDILQAMMKDYNQSNVDLFLASLSK PDFKIDTPKTRDIYLYMPARMSLIFSTVASFSFINLDTGVLDKPFSTAY PLDVKNGEIYLSNGVVLSDDFRSFKIGDNVSVNSIVEINSIKQGEYKITP IDDKAQFYIFYLKDSAIPYAQFILMDKTMFNSAVVQMFFLGNVDKLNLF LVINSRDAKVFKLKI	6

Примеры

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

Недавно была разработана система биоконъюгации в *E. coli*, в которой антигенный полисахарид и белок-носитель синтезируются *in vivo* и затем конъюгируются *in vivo* под действием олигосахарил-трансферазы PglB, фермента *Campylobacter jejuni*, экспрессированного в *E. coli* (Wacker et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (2006) v. 103, pp. 7088-93). Эта система N-связанного гликозилирования белков способна пере-

носить различные полисахариды на белок-носитель, что позволяет применять методы очистки биоконъюгата от бактерий, в которых он экспрессируется. Биоконъюгация успешно используется для получения конъюгированного полисахарида для потенциальной четырехвалентной вакцины *E.coli* с O-антигеном (Poolman and Wacker, *J. Infect. Dis.* (2016) v.213(1), pp. 6-13; WO 2015/124769; WO 2017/035181). Композиция, содержащая 10 биоконъюгатов (O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75, композиция обозначается как ExPEC10V), уже описана и находится в стадии клинических испытаний (например, WO2020/191082A1). Каждый из биоконъюгатов производится отдельным штаммом-производителем, который демонстрирует вариабельность выхода в зависимости от O-серотипа. Для производящих O-антиген штаммов нескольких O-серотипов можно повысить выход путем экспрессии вариантов гликозилтрансферазы PglB *S. Jejuni* с модифицированной субстратоспецифичностью (см., например, WO 2016/107818, WO 2016/107819). Однако для O-серотипа O18, показавшего самый низкий выход биоконъюгатов среди десяти серотипов, из которых были получены биоконъюгаты для состава ExPEC10V, применение вариантов белка PglB *S. jejuni* и использование альтернативных гомологов PglB не привело к улучшению выхода. Кроме того, дальнейшие модификации платформы, направленные на увеличение выхода биоконъюгата O18, не привели к успеху. Среди этих модификаций - сверхэкспрессия WecA, белка, который инициирует биосинтез O-субъединицы, катализируя перенос N-ацетилглюкозамин (GlcNAc)-1-фосфата на ундекапренилфосфат (Und-P) с образованием Und-P-P-GlcNAc. Кроме того, замена нативного регулятора длины O-антигенной цепи Wzz, присутствующего в штамме-платформе для биоконъюгации *E.coli* K-12, на регулятор длины O-антигенной цепи других видов грамотрицательных бактерий, приводящая к увеличению длины O-антигенной цепи O18A, не привела к значительному увеличению выхода продукта.

Пример 1. Штамм-производитель биоконъюгата O18 с улучшенным выходом.

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

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

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

Пример 2. Конструирование модифицированных O-антиген-полимераз Wzy.

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

Различные комбинации аминокислотных замен в одном или более положениях 199, 377 и 395 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 O-антиген-полимеразы Wzy были получены методом сайт-направленного мутагенеза с использованием стандартных процедур. Различные комбинации, которые были получены, приведены в табл. 3.

Пример 3. Получение O-антигенного полисахарида с использованием модифицированной O-антиген-полимеразы Wzy.

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

Пример 4. Определение характеристик биоконъюгатов O18.

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

Таблица 3

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

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

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

Новый штамм для получения биоконъюгатов O18A использовали для получения биоконъюгата O18A, биоконъюгат O18A выделяли из периплазмы после осмотического шока, подвергали хроматографии для удаления белков клетки-хозяина, а выделенный биоконъюгат использовали для приготовления фармацевтической композиции, содержащей этот биоконъюгат O18A в качестве лекарственного вещества, по существу, как описано в WO 2020/191082 (пример 8 в нем).

Новое лекарственное вещество O18A также смешивали с лекарственными веществами других биоконъюгатов O-антигенов E.coli O1A, O2, O4(glc+), O6A, O15, O16, O25B и O75, а в некоторых случаях и O8, для получения поливалентных (9-валентных, соответственно 10-валентных) лекарственных препаратов. Эти лекарственные препараты при введении кроликам индуцировали антитела против серотипов E.coli, O-антигены которых присутствовали в композициях. Таким образом, было продемонстрировано, что биоконъюгаты и композиции согласно изобретению (полученные согласно способам изобретения) оказались пригодными для индуцирования иммунных реакций против E.coli.

Перечень последовательностей

<110> ЯНССЕН ФАРМАСЬЮТИКЛЗ, ИНК.

<120> ПОЛУЧЕНИЕ БИОКОНЪЮКАТОВ E.coli O18

<130> CRU6060EPEPA1

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 396

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

Met Ile Tyr Ile Leu Thr Leu Thr Leu Leu Leu Val Ile Ala Ile Met
 1 5 10 15

Phe Ser Leu Leu Gly Thr Lys Ser Arg Ile Thr Ser Pro Leu Pro Leu
 20 25 30

His Phe Leu Pro Trp Leu Leu Thr Leu Ile Val Gly Ile Ser Asn Tyr
 35 40 45

Asp Gln Phe Tyr Glu Phe Asn Glu Arg Ser Phe Tyr Ser Leu Leu Ile
 50 55 60

Trp Phe Thr Val Ile Phe Ile Phe Tyr Phe Ile Gly Glu Leu Val Asn
 65 70 75 80

Tyr Lys Arg Glu Asn Ile Asn Val Tyr Tyr Gly Leu Ser His Ile Lys
 85 90 95

Tyr Glu Cys Lys Lys Tyr Trp Ile Ile Val Ile Pro Ile Ser Leu Tyr
 100 105 110

Thr Ile Phe Glu Ile Tyr Met Val Gly Met Gly Gly Ala Asp Gly Phe
 115 120 125

Phe Leu Asn Leu Arg Leu Ala Asn Thr Leu Glu Gly Tyr Thr Gly Lys
 130 135 140

Lys Phe Ile Leu Met Pro Ala Val Tyr Pro Leu Met Met Ala Met Phe
 145 150 155 160

Ala Ile Val Cys Leu Thr Lys Thr Ser Lys Leu Asn Lys Tyr Ser Ile
 165 170 175

Tyr Phe Trp Met Phe Leu Tyr Cys Ile Gly Thr Met Gly Lys Phe Ser

047805

	180		185		190														
Ile	Leu	Thr	Pro	Ile	Leu	Thr	Tyr	Leu	Ile	Ile	Tyr	Asp	Phe	Lys	His				
	195						200				205								
Arg	Leu	Lys	Val	Lys	Lys	Thr	Ile	Lys	Phe	Thr	Leu	Leu	Ile	Ile	Ile				
	210					215					220								
Leu	Ala	Leu	Thr	Leu	His	Phe	Thr	Arg	Met	Ala	Glu	Asn	Asp	His	Ser				
225					230					235					240				
Thr	Phe	Leu	Ser	Ile	Leu	Gly	Leu	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Pro	Ile	Ile	Ala				
				245					250						255				
Leu	Gly	Gln	Leu	Asn	Glu	Val	Asn	Ser	Ser	His	Phe	Gly	Glu	Tyr	Thr				
			260					265					270						
Phe	Arg	Phe	Ile	Tyr	Ala	Ile	Thr	Asn	Lys	Ile	Gly	Leu	Ile	Lys	Glu				
		275					280					285							
Leu	Pro	Val	Asn	Thr	Ile	Leu	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Val	Pro	Val	Pro	Thr				
	290					295					300								
Asn	Val	Tyr	Thr	Ala	Leu	Gln	Pro	Phe	Tyr	Gln	Asp	Phe	Gly	Tyr	Thr				
305					310					315					320				
Gly	Ile	Ile	Phe	Gly	Ala	Val	Leu	Tyr	Gly	Leu	Ile	Tyr	Val	Ser	Leu				
				325					330					335					
Tyr	Thr	Ala	Gly	Val	Arg	Gly	Asn	Asn	Thr	Gln	Ala	Leu	Leu	Ile	Tyr				
			340					345						350					
Ala	Leu	Phe	Ser	Val	Ser	Ser	Ala	Thr	Ala	Phe	Phe	Ala	Glu	Thr	Leu				
		355					360					365							
Val	Thr	Asn	Leu	Ala	Gly	Asn	Val	Met	Leu	Val	Leu	Cys	Thr	Ile	Leu				
	370					375					380								
Leu	Trp	Arg	Phe	Thr	Val	Ile	Cys	Lys	Pro	Val	Gln								
385					390					395									

<210> 2
 <211> 1191
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<400> 2
 atgatataata tattaacttt aactcttctt ctagttatag ccataatggt ttctcttctc 60
 ggcacaaaaa gtaggatcac atctccatta cctttgcatt tttaccatg gttactaact 120

047805

Val Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala
 65 70 75 80

Leu Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val
 85 90 95

Glu Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly
 100 105 110

Ser Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser
 115 120 125

Asn Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser
 130 135 140

His Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala
 145 150 155 160

Lys Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn
 165 170 175

Glu Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val
 180 185 190

Met Ala Gln Ala Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala
 195 200 205

Ser Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn
 210 215 220

Tyr Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys
 225 230 235 240

Ile Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile
 245 250 255

Lys Asp Asn Asn Asn Ser Thr Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His
 260 265 270

Phe Pro Glu Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys
 275 280 285

His Leu Pro Leu Glu Ala Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp
 290 295 300

Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu
 305 310 315 320

047805

Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg
 325 330 335

Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile
 340 345 350

Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala
 355 360 365

Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly
 370 375 380

Ala Ala Ser Ala Asp Val Val Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala Lys Asp
 385 390 395 400

Gln Asn Arg Thr Lys Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp
 405 410 415

Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp
 420 425 430

Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val
 435 440 445

Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val
 450 455 460

Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val
 465 470 475 480

Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg
 485 490 495

Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln
 500 505 510

Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu
 515 520 525

Arg Val Tyr Val Pro Arg Trp Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Gly
 530 535 540

Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile
 545 550 555 560

Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu
 565 570 575

047805

Glu Gly Gly Arg Val Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr
 580 585 590

Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly
 595 600 605

Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala
 610 615 620

Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu
 625 630 635 640

Lys Leu Gly Ser Gly Gly Gly Asp Gln Asn Ala Thr
 645 650

<210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Optimized N-glycosylation consensus sequence

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa can be Asp or Glu

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa can be any natural amino acid except Pro

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa can be any natural amino acid except Pro

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa can be Ser or Thr

<400> 4

Xaa Xaa Asn Xaa Xaa
 1 5

<210> 5
 <211> 13039
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<400> 5
 atgacgaatt taaaagcagt tattcctgta gggggtcttg ggatgcatat gttgcctgcc 60

actaaggcga ttcccaaaga gatgctaccg atcgtcgaca agccaatgat tcagtacatc 120
 gttgacgaga ttgtggctgc agggatcaaa gaaatcctcc tggttaactca cgcgtccaag 180
 aacgcggtcg aaaaccactt cgacacctct tatgaattag aatctctcct tgaacagcgc 240
 gtgaagcgtc aactgctggc ggaagtacag tccatttgcc cgccggcgt gacaattatg 300
 aacgtgcgtc agggcgaacc tttaggtttg ggccactcca tttatgtgc acgacctgcc 360
 attggtgaca atccatttgt cgtggtgctg ccagacgttg tgatcgacga cgccagcgcc 420
 gacccgctgc gctacaacct tgctgccatg attgcbgct ttaacgaaac tggccgcagc 480
 caggttctgg caaacgcat gccggcgat ctctctgaat actccgtcat ccagactaaa 540
 gaaccgcttg atcgcgaagg taaagtcagc cgcattggtg aatttatcga aaaaccggat 600
 cagccgcaga ccctggactc agacatcatg gctgtagggc gttatgtgct ttctgccgat 660
 atttggcctg aactggagcg tactcaacct ggagcatggg gacgtattca gttgactgat 720
 gccattgctg agttggcaaa aaaacaagca gttgacgcaa tgctgatgac tggggacagt 780
 tacgactgcg gaaagaaaat gggttatatg caagcgtttg tgaagtatgg gctgcgtaac 840
 ctaaaagaag gggcgaagtt ccgtaaaggg attgagaagc tgtaagcga ataataaaaa 900
 tctgaccgga tgtaacggtt gataagaaaa ttataacggc agtgaagatt agcggcgaaa 960
 gtaatttggt gcgaattttc ctgccgttgt tttatataaa caatcagaat aacaacgagt 1020
 tagcaacagg attatcgtca aagttttcca ggattttcct tgtttccaga gcggattggt 1080
 aagacaatta gcttctgaat tttcgggtt tagcgcgagt gggtaacact cgtcacatcg 1140
 taggcatgca tgcagtgctc tggtagctgt aaagccaggg gcggtagcgt gcattaatac 1200
 ctctattaat caaactgaga gccgcttatt tcacagcatg ctctgaagta atatggaata 1260
 aattaagtga aaatacttgt tactggtggc gcaggattta ttggttctgc tgtagttcgt 1320
 cacattataa atgatacgca ggatagtgtt gttaatgtcg ataaattaac gtacgccgga 1380
 aacctggaat cacttgcaga tgtttctgat tctgaacgct atttcttga acatgcggat 1440
 atttgtgatg cagctgcaat ggcacggatt tttgctcagc atcagccgga tgcagtgatg 1500
 cacctggcag ctgaaagcca tgttgaccgt tcaattacag gccctgcggc atttattgaa 1560
 accaatattg ttggtactta tgtcctttta gaagcggctc ggaattactg gtctgcactt 1620
 galggcgaca agaaaaacag cllccgllll calcalatll clactgacga agtclatggl 1680
 gatttgctc atcctgacga ggtaaataat aaagaaggat tacccttatt tactgagacg 1740
 acagcctacg caccaagcag cccttattct gcatcaaaag cgtccagcga tcatttagtc 1800
 cgtgcgtgga aacgtaccta tggtttaccg accattgtga ctaattgctc taacaattat 1860
 ggtccttate atttcccga aaaattgatt ccattgggta ttctgaatgc tctggaaggt 1920
 aaaggattac ctatttatgg aaaaggcgat caaattcgcg actggctgta tgttgaagat 1980

catgcgcgtg	cgttatatac	cgtcgtaacc	gaaggtaaag	cggtgaaac	ttataacatt	2040
ggtggacaca	acgaaaagaa	aaacatcgat	gtagtgtctca	ctatttgtga	tttgttggat	2100
gagattgtcc	cgaaagagaa	atcttaccgc	gagcaaatta	cttatgttgc	cgatcgtccg	2160
ggacacgata	gacgttatgc	gattgatgct	gagaagattg	gtcgcgaatt	gggatggaaa	2220
ccacaggaaa	cgtttgagag	cgggattcgt	aaaactgtgg	aatggtatct	gtccaataca	2280
aaatgggttg	ataatgtgaa	aagtgggtgcc	tatcaatcgt	ggattgaaca	gaactatgag	2340
ggccgccact	aatgaatatac	ctcctttttg	gcaaaacagg	gcaggttgg	tgggaactac	2400
agcgtgctct	ggcacctctg	gtaatttga	ttgctcttga	tgttcaactcc	actgattact	2460
gtggtgattt	tagtaaccct	gaaggtgtgg	ctgaaaccgt	tagaagcatt	ggcctgata	2520
ttatgtcaa	cgcagccgct	cacaccgcag	tagacaaagc	agaatcagaa	ccggagtttg	2580
cacaattact	gaacgcgacg	agtgtcgaag	cgatcgcgaa	agcagccaat	gaagtcggcg	2640
cttgggttat	tcactactct	actgactacg	tatttccggg	gaccggtgaa	ataccatggc	2700
aggaggagga	tgcaaccgca	ccgctaaatg	tttacgggtga	aaccaagtta	gcaggagaaa	2760
aagcattaca	agagcattgt	gcgaagcacc	ttatttttccg	gaccagctgg	gtctatgcag	2820
gtaaaggaaa	taacttcgcc	aaaacgatgt	tgcgtctggc	aaaagagcgt	gaagaattag	2880
ccgttattaa	tgatcagttt	ggtgcgcca	ctggcgcaga	gttgcctggc	gattgtacgg	2940
cacatgccat	tcgtgtggca	ctgaataaac	cggaagtcgc	aggtttgtac	catctggtag	3000
ccagtggtag	cacaacctgg	cacgattatg	ctgctgctgg	ttttgaagag	gcgcgcaaa	3060
caggcattcc	ccttgcactc	aacaagctca	acgcagtagc	aacaacagtc	tatcctacac	3120
cagctcgtcg	tccacataac	tctcgcctta	atacagaaaa	atttcagcag	aactttgcgc	3180
ttgtcttgcc	tgactggcag	gttggtgtga	aacgcagctc	caacgaatta	tttacgacta	3240
cagcaattta	atagtttttg	catcttgttc	gtgatgggtg	aacaagatga	atataaagga	3300
atgatggaat	gaaaacgcgt	aaaggtatta	ttttagcggg	tggttctggt	acacgtcttt	3360
atcctgtgac	tatggctgtc	agtaaacagc	tgttaccgat	ttatgataaa	ccgatgatct	3420
attaccgct	ctctacactg	atggtggcgg	gtattcgcga	tattttgatt	atcagcacgc	3480
cacaggatac	tcctcgtttt	caacaactgc	tgggtgatgg	gagccagtgg	gggctaaatc	3540
ttactacaa	agtgaaccg	agtccggatg	gtcttgcgca	ggcatttatc	atcgggtgaag	3600
agtttatcgg	tggtgatgat	tgtgctttgg	tacttgggtga	taatctctc	tacggtcacg	3660
acctgcctaa	gttaatggat	gccgctgtta	acaaagaaa	tggtgcaacg	gtatttgcct	3720
atcacgttaa	tgatcctgaa	cgctatgggtg	tcgttgagtt	tgataaaaac	ggtacggcaa	3780
ttagcctcga	agaaaaaccg	ctacaaccaa	aaagtaatta	tgcagtaacc	gggctttatt	3840
tctatgataa	ctacgttgtg	gaaatggcga	aaaatcttaa	gccttctgcc	cgcggtgaac	3900

tggaaattac	cgatattaac	cgtatttata	tggaacaggg	gcatttatct	gttgccatga	3960
tgggacgtgg	ttatgcatgg	ctggacacgg	ggacacatca	gagtcttatt	gaagcaagca	4020
acttcattgc	caccattgaa	gagcgccagg	gactaaaggt	ttcctgcca	gaagaaattg	4080
cttatcgtaa	aggatttatt	gacgcagagc	aggttaaggt	attagccgaa	ccgctgaaga	4140
aaaacgctta	tggtcagtat	ttgctgaaaa	tgattaaagg	ttagtaataa	aatgaatggt	4200
attaaaacag	aaattccaga	cgtactgatt	tttgaaccga	aagtttttgg	tgacgagcgc	4260
ggtttctttt	tcgaaagcta	taaccagagg	gtttttgagg	aagctgtagg	tcgcaaagtt	4320
gagtttggtc	aggataacca	ttctaaatcg	agaaaaggag	tattgcgggg	attgcattat	4380
caattagagc	cgtatgcgca	agcaaaactt	gtgcgttgca	ttgagggtga	agtatttgat	4440
attgctgtag	atatacggaa	gtcatctcca	ttttttggta	aatgggttgg	tgtaacatta	4500
tccgctgaaa	ataaacgtca	attatggatc	cctgaagggt	ttgctcatgg	ttttgtggtg	4560
attagtgata	ctgcggaatt	tgtctataaa	acgaacaatt	attacagtca	acaagcagag	4620
cgaagcataa	tttttgatga	taaagactta	gggattgctt	ggccattgaa	tactcattat	4680
attctttcag	aaaaagattt	aatgcgcca	acatttaaga	aaatcagag	taatgagtat	4740
tttaaagtag	tttaatcaaa	aacagttttt	ggaacctttg	cgggtatgta	cttcagcta	4800
ttgtgacact	accagctttg	ggtattatgg	ggcgaaaatt	aggcccagaa	ttatttggtg	4860
tattcacttt	ggcattagct	gttgtgggtt	atgcaagcat	ttttgatgca	ggccttactc	4920
gcgcagtgat	acgagaagtc	gcaattgaaa	aagataatga	agaaaataag	ttgaaaatta	4980
tttcttcagc	gacagttgta	attatttatt	tgagtttggc	cgctcactc	ttattatfff	5040
tttttagtgg	tcatatcgca	ttgctactga	acattagtga	gacttttttt	cataatgtaa	5100
gtgtctcgct	taaaattctc	gcagcatcca	taccattatt	tttgattact	caaatagggt	5160
tgtcaatfff	agaagggtgaa	gaaagatttg	gtttacttaa	tatctacaaa	tcaattacgg	5220
gagtgatatt	agcaatctca	ccggcattat	ttatacttat	taaaccctct	ttgatgtatg	5280
cgataatagg	cttagttcta	gcaaggtttt	tatgttttat	tttggctttt	ataatttgtc	5340
acgataaagt	gcttaaagct	aaactaaca	tcgatatacc	aacaattaaa	agattgttta	5400
tggtcgggtg	ttggattaca	gtaagtaata	tcacagccc	tgtgctatca	tattttgata	5460
ggtttattgt	ttcaaatcaa	cttggggctg	ctaatgttgc	ttttatact	gcaccatcag	5520
aaattatffc	tcggcttagt	ataattccag	gtgcgttttc	aagagcctta	ttccaagat	5580
tagctaagtc	aaataattcc	gctgaaagat	ataaacgaa	aagattaatt	acaatttcac	5640
ttttaataat	catcaccctt	atfttttgta	ttggcgtggt	atfttcagag	aagataatgg	5700
ttttatggat	gggggcatca	ttttttggtg	agcctggttt	ggtattatca	atattactga	5760
ttggctttat	ttttaatgga	ttggcacaag	taccatttgc	cagtattcaa	tcccgaggtc	5820

atgctaagat aactgcattt gttcatctct tagagttggt tccttattta ttacttttat	5880
ttacacctcat aaaagcacat ggggttggtg gcgcgggtat tgcgtggtca gtgaggatga	5940
tagtagatta tatagcatta agtcttttgg acggtaagta tattaataaa taaaattcaa	6000
aatgcaagtt aataactcat ggctttattt gggtaggtga caatttataa tgatataat	6060
attaacttta actcttcttc tagttatagc cataatgttt tctcttctcg gcacaaaaag	6120
taggatcaca tctccattac ctttgcaatt tttaccatgg ttactaactt taattgtcgg	6180
gataagtaat tacgatcaat tttacgagtt taatgaaaga agcttttact ctttggtgat	6240
ttggtttaca gttattttta tattttattt cataggggaa ctggttaatt ataaacgtga	6300
aaatataaat gtttattatg gtctttcaca tattaatat gaatgtaaaa aatattggat	6360
cattgtcatc ccaatttcat tataaccat tttcgaaata tatatggttg gtatgggggg	6420
agcagatgga ttctttctca atttacgtct tgcaaataca ttggagggct atacgggtaa	6480
aaaatttatc ttaatgcctg ctgtatatcc tctaatgatg gctatgttcg caattgtttg	6540
tctaacaaaa acttccaaat taaataaata ctccatttat ttctggatgt ttttgtattg	6600
tattggcaca atgggaaaaat tttcaatatt aacgccaata ttgacatatt taattattta	6660
tgacttcaaa catagattaa aagtaaaaaa aacaataaag tttacattgt tgataattat	6720
attagcttta actttgcatt ttacacgtat ggctgagaat gaccactcaa catttttatc	6780
tatttttaggg ctctatattt attcaccaat aattgcttta ggcagttga atgaagtaaa	6840
tagtagtcat tttggtgagt atacgtttag attcatatat gctataacta ataaaattgg	6900
ccttattaaa gaattgccag taaatactat tcttgactat tcatacgttc ctgtaccaac	6960
aatgtatat actgcacttc aaccatttta ccaggatttt ggttatactg gcatcatatt	7020
tggagcagta ttatacggac taatatatgt gagtttatac acggccggtg ttcgtggaaa	7080
taatacacag gcattactga tttacgcatt gttttcagtt agcagtgcaa cggctttctt	7140
cgctgaaacg ctagtaacga atttagctgg aatgtgatg ttagtattat gtaccatctt	7200
actatggcga tttacagtaa tatgcaaacc agtacagtaa ccatttctaat ggccacctac	7260
aatggcgagg cttcatcaa aatcagatt ttgtcactac aacaacaaac attttctaac	7320
tggcggttat ttattcagga tgatgggtct acagacaata ctatatctat aataaaaaac	7380
ttcaaaaaat ctgactccag aattcggcta gttgatgata atttgaaag tcaaggtgca	7440
ggaaaaaatt ttttatcgct gataaagtac agcgagacag attatacaat ttattgtgac	7500
caagatgata tttgggttaga aaacaaaata tttgaattag taaagtatgc aatgaaatt	7560
aaattgaatg tatcagatgc gccttcgcta gtttatgctg atggctatgc ttatatggat	7620
ggtgagggta caatcgattt ttctgggata tctaacaatc atgctgatca attaaaggat	7680
tttctttttt ttaatggtgg ataccaagga tgttctatta tgttcaatcg tgcaatgacc	7740

aaatctcttc tgaattatcg aggatttgta tatctacatg acgatatcac aacattagct	7800
gcatacgctc ttggtaaagt ttatctctc ccgaaatacc ttatgttata tagacagcac	7860
acgaatgctg taactggat caaacattc cgcaatggat tgacttctaa atttaaatca	7920
ccagtaaact atcttttacc acgaaaacat tatcaggtaa aaaaatcttt ttttgaatgt	7980
aacagctcta tcttatcaga gacgaataaa aaagtTTTTT tggattttat ttcattttgt	8040
gaatcaaata ataaatttac agattTTTTT aagttatggc gaggtgggt tagattaaat	8100
aacagtagaa ctaaattatt attaaaattc ttaatacggg gaaaatttag cgaatgattt	8160
caatacttac acctactttt aatcggcaac atactttatc aaggctattc aattctctta	8220
tattacaaac tgataaagat tttgagtggg taataattga tgatggtagt atagatgcaa	8280
cagcggtagt tgtagaagat tttagaaaa aatgtgattt tgacttgatt tattgctatc	8340
aggaaaataa tggtaagccc atggctttta acgctgggtg taaagcttgt agagggcatt	8400
atatctttat tgttgacagt gatgatgcac taactcccga tgccataaaa ttaattaaag	8460
aatcaataca tgattgctta tctgagaagg aaagtTtcag cggagtctgt tttagaaaag	8520
catatataaa aggggggatt attggtaatg atttaaataa ttcttcagaa catatatact	8580
atttaaagtc gactgagatt agcaatttaa taaatgggtg tgttgcatat tgttttaaaa	8640
aagaaagttt ggtaaaaaat ccattcccc gtatagaaga tgaaaaattt gttccagaat	8700
tatatatttg gaataaaata actgacaagg cgaagattcg atttaacata agcaaagtta	8760
tatatctttg tgagtatctt gatgatggtc tttctaaaaa tttccataac cagcttaaaa	8820
aatacccaaa ggggtttaag atttattaca aagatcaaag aaaacgagag aaaacttata	8880
taaaaaaac aaagatgcta attagatatt tgcaatggtt ttattatgag aaaataaaat	8940
gaaaatacta tttgtcatta caggtttagg ccttggagggt gctgagaagc aggtttgtct	9000
tttagctgat aaattaagtt taagcgggca ccatgtaaag attatttcac ttggacatat	9060
gtctaataat aaagtctttc cttagcgaata taatgttaat gtcattaatg taaatatgct	9120
aaaaaacatt tctggagtta taaaagggtg tgtcagaatt agagatgta tagctaattt	9180
caaaccagac attgtacaca gtcatatggt tcatgcaaac attatcacta gattgtctgt	9240
aattggaatc aaaaacagac ctggtattat atcaactgca cataataaaa atgaaggtgg	9300
gtatttcaga atgctcacat atagaataac cgattgttta agtgattggt gtacaaatgt	9360
tagcaaagaa gcagtggatg agtttttacg gataaaagcc ttaaatcccg ctaaagcaat	9420
tactatgtat aatgggatag ataccaataa atttaaattt gatttattgg caaggagggg	9480
aattcgagac ggtattaata taaaaatga tgatatatta ttacttgctg caggctggtt	9540
aacgttagct aaagattatc ctaatttatt gaatgcaatg actctgcttc ctgaacactt	9600
taaacttatt attattgggt atggtgaatt gcgtgacgaa attaatatgc ttataaaaa	9660

attgcaatta tctaataagg tgccttggt gggagttaa aaaaatattg ctccctat 9720
 ttctgcatgt gatatttttg ttctctcttc tcggtgggaa ggatttggat tagtcgtggc 9780
 agaagctatg tcatgtgagc gaattgttgt tggcacggat tcagggggag taagagaagt 9840
 tattggtgac gatgattttc ttgtacccat atctgattca acacaacttg caagcaaaat 9900
 tgaaaaattg tctttgagcc agatacgtga tcacattggg tttcggaatc gtgagcgtat 9960
 tttaaaaaat ttctcaatag atactattat tatgcagtgg caagaactct atggaactat 10020
 aatttgctca aaacatgaaa ggtagattta tttttggaac gtgtcttttg tttgaattta 10080
 attcaatctc aattgagatt tttgtatttc aaaaatacca tcatagctaa cgatgattgg 10140
 tttttatttt aagatgcttt ctataaatat attgacgttt ttaatgcgcc gaaacgattg 10200
 ggctgggaac agagaagtaa aactgttttg agaatgaaga gtttttgaga tgtttatgga 10260
 tattaaaaat tgatccagtg aattaattat ttataataaa tcaagattta atgttaataa 10320
 atgataatct tttctgacac tcatattaat tatgagtggg acgtttggta aacggtaaac 10380
 tattatatga cagctagaac aactaaagtt ttgcacttac aattactccc actcttaagt 10440
 ggcgttcaaa gggtaacatt aaacgaaatt agtgcgttat atactgatta tgattataca 10500
 ctagtttgct caaaaaaagg tccactaaca aaagcattgc tggaaatga tgtcgattgt 10560
 cattgtatcc ccgaacttac gagagaaatt accgtaaaga atgattttta agcattgttc 10620
 aagctttata agttcataaa aaaagaaaaa tttgacattg tgcatacaca ttcttcaaaa 10680
 acaggtatth tggggcgagt tgctgcaaaa ttagcacgtg ttggaaaggt gatccacact 10740
 gtacatgggt tttcttttcc agccgatct agtaaaaaaa gttattacct ttatttttcc 10800
 atggaatgga tagcaaagtt ctttacggat aagttaatcg tcttgaatgt agatgatgaa 10860
 tatatagcaa taaacaaatt aaaattcaag cgggataaag tttttttaat tcctaattgga 10920
 gtagacactg ataagttttc tcctttagaa aataaaatth atagtagcac cttgaatcta 10980
 gtaatggttg gtagattatc caagcaaaaa gatcctgaga cattattgct tgctgttgaa 11040
 aaactgctga atgaaaatgt taatgttaag ctgacacttg taggagatgg tgaactaaaa 11100
 gaacagttag aaagcaggtt caaacggcaa gatggacgta taatttttca tggatggtca 11160
 gataacattg ttaatattth aaaagttaat gatcttttth tattaccttc tctttgggag 11220
 ggtatgcat tagcaattth agaagcattg agctgtggac ttccatgtat agtcactaat 11280
 attccaggta ataatagctt aatagaagat ggctataatg gttgtttgtt tgaaattaga 11340
 gattgtcagt tattatctca aaaaatcatg tcatatgttg gtaagccaga actgattgca 11400
 cagcaatcta ccaatgcacg atcatthatt ctgaaaaatt atggattagt taaaagaaat 11460
 aataaggtca gacagctata tgataattaa atgaaaccga aaagttaaaa aagaacaggt 11520
 ttttcaaagt gaaaataaaa ttacagttth tttattgcaa tgattaacgt aacatctgca 11580

047805

ttacattcaa gccgcacaac cccgcggtga ccaccctga caggagtaaa caatgtcaaa 11640
gcaacagatc ggcgctcgtcg gtatggcagt gatgggacgc aacctcgcgc tcaacatcga 11700
aagccgtggt tataccgtct ctattttcaa cggttcccgt gaaaagacgg aagaagttat 11760
tgccgaaaat ccaggcaaga aactggttcc ttactatacg gtgaaagagt tcggttgaatc 11820
tcttgaaacg cctcgtcgcga tctgtttaat ggttaaagca ggtgcaggca cggatgctgc 11880
tattgattcc ctgaaacat atctcgataa aggcgatatc atcattgatg gtggttaatac 11940
cttcttccag gacaccattc gtcgtaaccg cgagctttct gcacaaggct ttaacttcat 12000
cggtagcggg gtttccgggt gtgaagaggg cgcgctgaaa ggaccttcta tcatgcctgg 12060
tgggcagaaa gaggcctatg aactggttgc tcctatcctg accaaaatcg ccgccgtggc 12120
tgaagatggt gaaccatgcg ttacctatat tggtgccgat ggcgcaggtc actatgtgaa 12180
gatggttcac aacggtattg aatacgggta tatgcaactg attgctgaag cctatttctt 12240
gctgaaaggt ggtctgaatc tcttaacga agaactggca caaaccttta ccgagtggaa 12300
taacggtgaa ctgagcagtt acctgatcga catcactaaa gacatcttca ccaaaaaaga 12360
tgaagacggt aactacctgg ttgatgtgat cctggatgaa gcagcaaaca aaggtagcgg 12420
taaatggacc agtcagagcg cgtggatct cggtagacca ctgtcgtga ttactgagtc 12480
tgtgtttgca cgctacatct cttactaaa agatcagcgc gtggctgcgt ctaaagtact 12540
gtcgggtcca caagcgcagc cagcaggcga caaagcagag ttattgaaa aagttcgccg 12600
tgcgctttat ctgggtaaga ttgtttctta cgcgcagggc ttctctcagc tgcgtgctgc 12660
gtctgaagag tacaactggg atctgaacta cggtgaaatc gcgaagattt tccgtgctgg 12720
ctgcatcatc cgtgctcagt tcctgcagaa aatcaccgat gcttatgccg aaaatccgca 12780
gatcgtaac ctgctgctgg ctccgtactt caagcaaatt gccgatgact accagcaggc 12840
tctgcgtgat gtcgttgctt atgcagtaca gaacggatc ccggttccga ccttcgccgc 12900
tgcggttgcc tattacgata gctaccgtgc cgctgttctg cctgcgaacc tgatccaggc 12960
acagcgtgac tatttcggtg cacatactta taagcgcatt gataaagaag gtgtgttcca 13020
tactgaatgg ctggattga 13039

<210> 6
<211> 713
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PglB oligosaccharyl transferase

<400> 6

Met Leu Lys Lys Glu Tyr Leu Lys Asn Pro Tyr Leu Val Leu Phe Ala
1 5 10 15

047805

Met Ile Ile Leu Ala Tyr Val Phe Ser Val Phe Cys Arg Phe Tyr Trp
 20 25 30

Val Trp Trp Ala Ser Glu Phe Asn Glu Tyr Phe Phe Asn Asn Gln Leu
 35 40 45

Met Ile Ile Ser Asn Asp Gly Tyr Ala Phe Ala Glu Gly Ala Arg Asp
 50 55 60

Met Ile Ala Gly Phe His Gln Pro Asn Asp Leu Ser Tyr Tyr Gly Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Ser Ala Leu Thr Tyr Trp Leu Tyr Lys Ile Thr Pro Phe Ser
 85 90 95

Phe Glu Ser Ile Ile Leu Tyr Met Ser Thr Phe Leu Ser Ser Leu Val
 100 105 110

Val Ile Pro Thr Ile Leu Leu Ala Asn Glu Tyr Lys Arg Pro Leu Met
 115 120 125

Gly Phe Val Ala Ala Leu Leu Ala Ser Ile Ala Asn Ser Tyr Tyr Asn
 130 135 140

Arg Thr Met Ser Gly Tyr Tyr Asp Thr Asp Met Leu Val Ile Val Leu
 145 150 155 160

Pro Met Phe Ile Leu Phe Phe Met Val Arg Met Ile Leu Lys Lys Asp
 165 170 175

Phe Phe Ser Leu Ile Ala Leu Pro Leu Phe Ile Gly Ile Tyr Leu Trp
 180 185 190

Trp Tyr Pro Ser Ser Tyr Thr Leu Asn Val Ala Leu Ile Gly Leu Phe
 195 200 205

Leu Ile Tyr Thr Leu Ile Phe His Arg Lys Glu Lys Ile Phe Tyr Ile
 210 215 220

Ala Val Ile Leu Ser Ser Leu Thr Leu Ser Asn Ile Ala Trp Phe Tyr
 225 230 235 240

Gln Ser Ala Ile Ile Val Ile Leu Phe Ala Leu Phe Ala Leu Glu Gln
 245 250 255

Lys Arg Leu Asn Phe Met Ile Ile Gly Ile Leu Gly Ser Ala Thr Leu
 260 265 270

047805

Ile Phe Leu Ile Leu Ser Gly Gly Val Asp Pro Ile Leu Tyr Gln Leu
 275 280 285

Lys Phe Tyr Ile Phe Arg Ser Asp Glu Ser Ala Asn Leu Thr Gln Gly
 290 295 300

Phe Met Tyr Phe Asn Val Asn Gln Thr Ile Gln Glu Val Glu Asn Val
 305 310 315 320

Asp Leu Ser Glu Phe Met Arg Arg Ile Ser Gly Ser Glu Ile Val Phe
 325 330 335

Leu Phe Ser Leu Phe Gly Phe Val Trp Leu Leu Arg Lys His Lys Ser
 340 345 350

Met Ile Met Ala Leu Pro Ile Leu Val Leu Gly Phe Leu Ala Leu Lys
 355 360 365

Gly Gly Leu Arg Phe Thr Ile Tyr Ser Val Pro Val Met Ala Leu Gly
 370 375 380

Phe Gly Phe Leu Leu Ser Glu Phe Lys Ala Ile Met Val Lys Lys Tyr
 385 390 395 400

Ser Gln Leu Thr Ser Asn Val Cys Ile Val Phe Ala Thr Ile Leu Thr
 405 410 415

Leu Ala Pro Val Phe Ile His Ile Tyr Asn Tyr Lys Ala Pro Thr Val
 420 425 430

Phe Ser Gln Asn Glu Ala Ser Leu Leu Asn Gln Leu Lys Asn Ile Ala
 435 440 445

Asn Arg Glu Asp Tyr Val Val Thr Trp Trp Asp Tyr Gly Tyr Pro Val
 450 455 460

Arg Tyr Tyr Ser Asp Val Lys Thr Leu Val Asp Gly Gly Lys His Leu
 465 470 475 480

Gly Lys Asp Asn Phe Phe Pro Ser Phe Ala Leu Ser Lys Asp Glu Gln
 485 490 495

Ala Ala Ala Asn Met Ala Arg Leu Ser Val Glu Tyr Thr Glu Lys Ser
 500 505 510

Phe Tyr Ala Pro Gln Asn Asp Ile Leu Lys Thr Asp Ile Leu Gln Ala
 515 520 525

Met Met Lys Asp Tyr Asn Gln Ser Asn Val Asp Leu Phe Leu Ala Ser
530 535 540

Leu Ser Lys Pro Asp Phe Lys Ile Asp Thr Pro Lys Thr Arg Asp Ile
545 550 555 560

Tyr Leu Tyr Met Pro Ala Arg Met Ser Leu Ile Phe Ser Thr Val Ala
565 570 575

Ser Phe Ser Phe Ile Asn Leu Asp Thr Gly Val Leu Asp Lys Pro Phe
580 585 590

Thr Phe Ser Thr Ala Tyr Pro Leu Asp Val Lys Asn Gly Glu Ile Tyr
595 600 605

Leu Ser Asn Gly Val Val Leu Ser Asp Asp Phe Arg Ser Phe Lys Ile
610 615 620

Gly Asp Asn Val Val Ser Val Asn Ser Ile Val Glu Ile Asn Ser Ile
625 630 635 640

Lys Gln Gly Glu Tyr Lys Ile Thr Pro Ile Asp Asp Lys Ala Gln Phe
645 650 655

Tyr Ile Phe Tyr Leu Lys Asp Ser Ala Ile Pro Tyr Ala Gln Phe Ile
660 665 670

Leu Met Asp Lys Thr Met Phe Asn Ser Ala Tyr Val Gln Met Phe Phe
675 680 685

Leu Gly Asn Tyr Asp Lys Asn Leu Phe Asp Leu Val Ile Asn Ser Arg
690 695 700

Asp Ala Lys Val Phe Lys Leu Lys Ile
705 710

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Грамотрицательные бактериальные клетки-хозяева, содержащие:

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

(b) locus rfb O18 E.coli; и

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3. Клетка-хозяин по п.1 или 2, в которой полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy, содержит изолейцин в положении, которое соответствует положению 199 в SEQ ID NO: 1, лизин в положении, которое соответствует положению 377 в SEQ ID NO: 1, и аланин в положении, которое соответствует положению 395 в SEQ ID NO: 1.

4. Клетка-хозяин по любому из пп.1-3, в которой полинуклеотид или вектор, кодирующий полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy, интегрирован в геном клетки-хозяина.

5. Клетка-хозяин по любому из пп.1-4, которая представляет собой *Escherichia coli*.

6. Клетка-хозяин по п.5, которая представляет собой штамм K-12 *E.coli*, предпочтительно штамм W3110.

7. Клетка-хозяин по любому из пп.1-6, в которой присутствует по меньшей мере одно из следующего:

a) олигосахарилтрансфераза содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности с SEQ ID NO: 6;

b) белок-носитель содержит SEQ ID NO: 3 и

c) локус *rfb* O18 *E.coli* представляет собой локус *rfb* штамма *E.coli* с серотипом O18A.

8. Клетка-хозяин по любому из пп.1-7, в которой олигосахарилтрансфераза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

9. Клетка-хозяин по любому из пп.1-8, которая содержит локус *rfb* O18. *E.coli* с нуклеотидной последовательностью, кодирующей О-антиген-полимеразу Wzy, который кодирует полипептид, обладающий активностью О-антиген-полимеразы Wzy и имеющий последовательность, определенную в любом из пп.1-3.

10. Способ получения биоконъюгата антигенного полисахарида *E.coli* O18, конъюгированного с белком-носителем, включающий культивирование клетки-хозяина по любому из пп.1-9 для получения биоконъюгата.

11. Способ по п.10, дополнительно включающий восстановление биоконъюгата.

12. Способ по п.11, дополнительно включающий включение восстановленного биоконъюгата в фармацевтическую композицию.

13. Способ по п.12, дополнительно включающий добавление одного или более дополнительных биоконъюгатов полисахаридов О-антигена *E.coli*, конъюгированных с белком-носителем, в фармацевтическую композицию с получением поливалентной композиции биоконъюгата.

14. Способ по п.13, в котором один или более дополнительных биоконъюгатов содержат по меньшей мере один О-антигенный полисахарид, выбранный из группы, состоящей из серотипов *E.coli* O1, O2, O4, O6, O8, O15, O16, O25 и O75.

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

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

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

- (iii) биоконъюгат антигенного полисахарида E.coli O2, конъюгированного с белком-носителем;
(iv) биоконъюгат гликозилированного антигенного полисахарида E.coli O4, конъюгированного с белком-носителем;
(v) биоконъюгат антигенного полисахарида E.coli O6A, конъюгированного с белком-носителем;
(vi) биоконъюгат антигенного полисахарида E.coli O5, конъюгированного с белком-носителем;
(vii) биоконъюгат антигенного полисахарида E.coli O16, конъюгированного с белком-носителем;
(viii) биоконъюгат антигенного полисахарида E.coli O25B, конъюгированного с белком-носителем; и
(ix) биоконъюгат антигенного полисахарида E.coli O75, конъюгированного с белком-носителем, причем предпочтительно указанный белок-носитель в каждом биоконъюгате содержит SEQ ID NO: 3.
16. Способ по п.15, в котором поливалентная композиция биоконъюгата содержит:
(x) биоконъюгат антигенного полисахарида E.coli O8, конъюгированного с белком-носителем, при этом предпочтительно указанный белок-носитель содержит SEQ ID NO: 3.

