

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046206**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.02.15

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

(21) Номер заявки
202192390

(22) Дата подачи заявки
2020.03.18

(54) **БИОКОНЪЮГАТЫ ПОЛИСАХАРИДНЫХ О-АНТИГЕНОВ E.COLI, СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/819,746**

**А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(32) **2019.03.18**

(33) **US**

(43) **2021.12.03**

(86) **PCT/US2020/023404**

(87) **WO 2020/191082 2020.09.24**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЯНССЕН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US); ГЛАКСОСМИТКЛАЙН
БАЙОЛОДЖИКАЛС С.А. (BE)**

(56) **WO-A1-2015124769**
VAN DEN DOBBELSTEEN GERMIE P.J.M.
ET AL.: "Immunogenicity and safety of a tetravalent E.
colio-antigen bioconjugate vaccine in animal models",
VACCINE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 34,
no. 35, 6 July 2016 (2016-07-06), pages
4152-4160, XP029644969, ISSN: 0264-410X, DOI:
10.1016/J.VACCINE.2016.06.067, page 4156, right-
hand column

(72) Изобретатель:
**Гёртсен Ерун, Пулман Ян Тёнис, Фа
Келлен Кристина, Бюргаут Питер
Ян, Верденбург Эвелине Марлен,
Ибарра Ион Патрисиа, Аббанат
Даррен Роберт (NL), Кеммлер Стэфан
Йохен, Коварик Михель Томас,
Малли Мануэла, Гамбиллара Фонк
Вероника, Браун Мартин Эдвард,
Карранза Сандмейер Мария Паула
(CH)**

IHSSEN JULIAN ET AL.: "Production
of glycoprotein vaccines in Escherichia coli",
MICROBIAL CELL FACTORIES, vol. 9, no. 1, 11
August 2010 (2010-08-11), page 61, XP021077209,
ISSN: 1475-2859, DOI: 10.1186/1475-2859-9-61,
figure 1

ROLAND STENUTZ ET AL.: "The structures
of Escherichia coli O-polysaccharide antigens",
FEMS MICROBIOLOGY REVIEWS, ELSEVIER,
AMSTERDAM; NL, vol. 30, 1 January 2006
(2006-01-01), pages 382-403, XP007921666, ISSN:
0168-6445, DOI: 10.1111/J.1574-6976.2006.00016.X
[retrieved on 2006-02-09], table 5

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев**

WO-A1-2018077853
WO-A1-2019016187
WO-A1-2016107819

(57) Предложен биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем, и его композиции. Также предложены рекомбинантные клетки-хозяева для продуцирования биоконъюгата и способы продуцирования биоконъюгата с применением рекомбинантных клеток-хозяев. Рекомбинантные клетки-хозяева содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую глюкозилтрансферазу, которая способна модифицировать антиген O4 E.coli ответвлениями глюкозы для получения гликозилированного полисахаридного антигена O4. Биоконъюгаты гликозилированного полисахаридного антигена O4 E.coli, предложенные в данном документе, могут применяться в отдельности или в комбинации с одним или несколькими дополнительными полисахаридными O-антигенами E.coli для индукции антител против гликозилированного антигена E.coli и для вакцинации субъекта против внекишечной патогенной E.coli (ExPEC).

B1**046206****046206 B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

В данной заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США № 62/819746, поданной 18 марта 2019 г, содержание которой включено в данный документ во всей полноте путем ссылки.

Ссылка на перечень последовательностей, поданный в электронном виде

Данная заявка содержит перечень последовательностей, поданный в электронном виде через EFS-Web в виде перечня последовательностей в формате ASCII в файле под названием "004852_11560_Sequence-Listing", созданного 11 марта 2020, размером 198 кБ. Перечень последовательностей, поданный через EFS-Web, является частью описания и включен в него во всей полноте путем ссылки.

Предшествующий уровень техники

Внекишечные патогенные штаммы *E.coli* (ExPEC) обычно являются безвредными обитателями желудочно-кишечного тракта человека, наряду с комменсальными штаммами *E.coli*. Изоляты ExPEC трудно отличить от комменсальных изолятов по серотипу, несмотря на преобладание ExPEC во многих клональных линиях, что определяется по серотипам O-антигена, капсулярного и жгутикового антигена (сокращенно O:K:H, например O25:K1:H4). В отличие от комменсальных *E.coli*, штаммы ExPEC экспрессируют широкий спектр факторов вирулентности, позволяющих им колонизировать желудочно-кишечный тракт, а также вызывать широкий спектр внекишечных инфекций, связанных с существенной нагрузкой на систему здравоохранения из-за госпитализаций и летальных исходов. Новорожденные, пожилые люди и пациенты с ослабленным иммунитетом частично подвержены инфекциям ExPEC, включая инвазивную болезнь ExPEC (IED).

Штаммы ExPEC являются наиболее частой причиной инфекций мочевыводящих путей (ИМП) и вносят важный вклад в инфекции послеоперационной раны и менингит новорожденных. Эти штаммы также связаны с инфекциями брюшной полости и таза и внутрибольничной пневмонией, и порой сопровождают другие внекишечные инфекции, такие как остеомиелит, флегмона и раневые инфекции. Все эти первичные очаги инфекции могут привести к бактериемии ExPEC. ExPEC является наиболее частой причиной внебольничной бактериемии и основным возбудителем внутрибольничной бактериемии и обнаруживается примерно в 17-37% клинически значимых изолятов крови. Пациенты с ExPEC-положительным посевом крови обычно страдают септическим синдромом, тяжелым сепсисом или септическим шоком. Наблюдается повышение устойчивости ExPEC к антибиотикам первой линии, включая цефалоспорины, фторхинолоны и триметоприм/сульфаметоксазол. Появление и быстрое массовое распространение ExPEC с типом последовательности 131 (ST131) считается основным фактором, вызывающим повышенную лекарственную устойчивость, включая множественную лекарственную устойчивость. Среди клинических изолятов ExPEC этот клон обнаруживается в 12,5-30%, в основном имеет серотип O25b:H4 и демонстрирует выраженную резистентность к фторхинолонам, которая часто сопровождается устойчивостью к триметоприму/сульфаметоксазолу, и имеет бета-лактамазы расширенного спектра, придающие устойчивость к цефалоспорином. O-антиген включает иммунодоминантный компонент липополисахарида клеточной стенки (ЛПС) грамотрицательных бактерий, включая *E.coli*. В настоящее время идентифицировано более 180 серологически уникальных O-антигенов *E.coli*, при этом подавляющее большинство изолятов ExPEC классифицируются по менее чем 20 серотипам O-антигенов. Полноразмерные O-антигены *E.coli* обычно состоят из примерно 10-25 повторяющихся сахарных единиц, присоединенных к высококонсервативной центральной структуре LPS, причем каждый компонент синтезируется отдельно ферментами, кодируемыми преимущественно генными кластерами *gfb* и *gfa*, соответственно. После полимеризации O-антигена остов полисахаридного O-антигена может быть модифицирован, обычно путем добавления остатков ацетила или глюкозы. Эти модификации эффективно увеличивают разнообразие серотипов за счет создания антигенно различных серотипов, которые имеют общий полисахаридный остов, но различаются боковыми ответвлениями. Гены, кодирующие ферменты, модифицирующие O-антиген, обычно находятся за пределами кластера *gfb* на хромосоме, и в некоторых случаях эти гены обнаруживаются внутри лизогенных бактериофагов.

Изоляты ExPEC, принадлежащие к серогруппе O4, обычно выявлялись в современных мониторинговых исследованиях изолятов крови в США и ЕС. Структура полисахарида O4 была определена как $\rightarrow 2) \alpha\text{-L-Rha} (1\rightarrow 6) \alpha\text{-D-Glc} (1\rightarrow 3) \alpha\text{-L-FucNAc} (1\rightarrow 3) \beta\text{-D-GlcNAc} (1\rightarrow$ из штамма *E.coli* O4:K52 (Jann et al., *Carbohydr. Res.* (1993) v. 248, pp.241-250). Для штаммов O4:K3, O4:K6 и O4:K12 была определена отдельная форма структуры полисахарида O4, у которых указанная выше структура модифицирована добавлением $\alpha\text{-D-Glc} (1\rightarrow 3)$, связанной с остатком рамнозы полисахарида (Jann et al., 1993, см. выше), эта форма полисахарида упоминается ниже в данном документе как "гликозилированный O4". Ферменты, ответственные за модификацию O-антигена в штаммах *E.coli* O4, не идентифицированы. Усилия по разработке вакцины для предотвращения инфекций ExPEC были сосредоточены на конъюгатах полисахаридного O-антигена. Конъюгированная 12-валентная вакцина с O-антигеном была синтезирована путем выделения и очистки полисахаридного O-антигена и химической конъюгации с обезвреженным экзотоксином *A Pseudomonas aeruginosa* и протестирована на безопасность и иммуногенность в клиническом

исследовании 1 фазы (Cross et al., J. Infect. Dis. (1994) v.170, pp.834-40). Эта вакцина-кандидат никогда не была лицензирована для клинического применения. Недавно была разработана система биоконъюгирования в *E.coli*, в которой полисахаридный антиген и белок-носитель синтезируются *in vivo* и впоследствии конъюгируются *in vivo* за счет активности олигосахарилтрансферазы PglB, фермента *Campylobacter jejuni*, экспрессируемого в *E.coli* (Wacker et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (2006) v. 103, pp. 7088-93). Эта система гликозилирования N-связанного белка способна переносить различные полисахариды на белок-носитель, что позволяет использовать простые способы для очистки конъюгата.

Биоконъюгирование успешно применялось для получения конъюгированного полисахарида для четырехвалентной вакцины-кандидата с O-антигеном *E.coli* (Poolman and Wacker, J. Infect. Dis. (2016) v.213(1), pp. 6-13). Однако разработка успешной вакцины ExPEC требует охвата преобладающих серотипов, а наличие дополнительных модификаций O-антигена в подмножествах изолятов ExPEC представляет собой дополнительную проблему при охвате изолятов, экспонирующих немодифицированный и модифицированный LPS.

Краткое изложение сущности изобретения

Ввиду увеличения устойчивости изолятов ExPEC к антибиотикам и наличия дополнительных модификаций O-антигена среди преобладающих O-серотипов, существует потребность в улучшении профилактики и терапии этих инфекций.

Изобретение удовлетворяет эту потребность за счет определения генетического состава современных клинических изолятов, включая выявление генов, кодирующих ферменты, модифицирующие O-антиген, тем самым позволяя создавать рекомбинантные клетки-хозяева, способные синтезировать биоконъюгаты O-антигенов, включая биоконъюгаты, содержащие выбранные модификации O-антигена.

В одном аспекте в настоящем документе предложен биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, где гликозилированный полисахаридный антиген O4 *E.coli* имеет структуру формулы (O4-Glcⁿ), как показано в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 1 до 50, например от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20.

В конкретном воплощении гликозилированный полисахаридный антиген O4 *E.coli* ковалентно связан с остатком аспарагина (Asn) в сайте гликозилирования в белке-носителе, содержащем консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 1, предпочтительно имеющую SEQ ID NO: 2.

В некоторых воплощениях белок-носитель выбран из группы, состоящей из обезвреженного экзотоксина A *P.aeruginosa* (EPA), флагеллина *E.coli* (FlhC), CRM 197, мальтозосвязывающего белка (MBP), дифтерийного анатоксина, столбнячного анатоксина, обезвреженного гемолизина A *S.aureus*, агглютинирующего фактора A, агглютинирующего фактора B, термолabileного энтеротоксина *E.coli*, обезвреженных вариантов термолabileного энтеротоксина *E.coli*, субъединицы B холерного токсина (CTB), холерного токсина, обезвреженных вариантов холерного токсина, белка Sat *E.coli*, домена-"пассажира" белка Sat *E.coli*, пневмолизина *Streptococcus pneumoniae*, гемоцианина *Megathura crenulata* (KLH), PrV *P.aeruginosa*, белка внешней мембраны *Neisseria meningitidis* (OMPC) и белка D из нетипируемого *Haemophilus influenzae*. В конкретном воплощении белок-носитель представляет собой обезвреженный экзотоксин A *P.aeruginosa* (EPA). В таких воплощениях EPA предпочтительно содержит от 1 до 20, предпочтительно от 1 до 10, предпочтительно от 2 до 4, консенсусных последовательностей гликозилирования, имеющих SEQ ID NO: 1, консенсусные последовательности предпочтительно имеют SEQ ID NO: 2.

В конкретном воплощении белок-носитель содержит четыре консенсусные последовательности гликозилирования (EPA-4). В предпочтительном воплощении белок-носитель EPA содержит SEQ ID NO: 3.

В другом аспекте предложена композиция или иммуногенная композиция, содержащая биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli*, ковалентно связанный с белком-носителем, как описано в настоящем документе. В некоторых воплощениях композиция или иммуногенная композиция содержит по меньшей мере один дополнительный полисахаридный антиген, ковалентно связанный с белком-носителем.

В некоторых воплощениях композиция или иммуногенная композиция содержит по меньшей мере один дополнительный полисахаридный антиген, ковалентно связанный с белком-носителем, где по меньшей мере один дополнительный полисахаридный антиген выбран из группы, состоящей из полисахаридного антигена O1A *E.coli*, полисахаридного антигена O2 *E.coli*, полисахаридного антигена O6A *E.coli*, полисахаридного антигена O8 *E.coli*, полисахаридного антигена O15 *E.coli*, полисахаридного антигена O16 *E.coli*, полисахаридного антигена O18 *E.coli*, полисахаридного антигена O25B *E.coli* и полисахаридного антигена O75 *E.coli*. В конкретных воплощениях полисахаридный антиген O1A *E.coli* содержит структуру формулы (O1A), как показано в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. В конкретных воплощениях полисахаридный антиген O2 *E.coli* содержит структуру формулы (O2), как показано в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. В конкретных воплощениях полисахаридный антиген O6AE.coli содержит структуру формулы (O6A), как показано в табл. 1, где n представляет собой

целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. В конкретных воплощениях полисахаридный антиген O8 E.coli содержит структуру формулы (O8), как показано в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. В конкретных воплощениях полисахаридный антиген O15 E.coli содержит структуру формулы (O15), как показано в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. В конкретных воплощениях полисахаридный антиген O16 E.coli содержит структуру формулы (O16), как показано в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. В конкретных воплощениях полисахаридный антиген O18A E.coli содержит структуру формулы (O18A), как показано в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. В конкретных воплощениях полисахаридный антиген O25B E.coli содержит структуру формулы (O25B), как показано в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. В конкретных воплощениях полисахаридный антиген O75 E.coli содержит структуру формулы (O75), как показано в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20.

В некоторых воплощениях каждый дополнительный антиген O1 A, O2, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и/или O75 E.coli ковалентно связан с остатком Asn в сайте гликозилирования, содержащем консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 1, предпочтительно имеющую SEQ ID NO: 2, в каждом белке-носителе. В конкретных воплощениях каждый белок-носитель представляет собой обезвреженный экзотоксин A P.aeruginosa (EPA). Предпочтительно каждый EPA содержит 1-10, предпочтительно 2-4, предпочтительно 4 сайта гликозилирования, каждый из которых содержит консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 2. В конкретных воплощениях каждый EPA содержит SEQ ID NO:3.

В конкретных воплощениях композиция или иммуногенная композиция содержит по меньшей мере полисахаридные антигены O1 A, O2, гликозилированный O4, O6A и O25B E.coli, каждый из которых ковалентно связан с белком-носителем. В конкретных воплощениях композиция или иммуногенная композиция содержит по меньшей мере полисахаридные антигены O1A, O2, гликозилированный O4, O6A, O8, O15, O16, O25B и O75 E.coli, каждый из которых ковалентно связан с белком-носителем. В конкретных воплощениях композиция или иммуногенная композиция содержит по меньшей мере полисахаридные антигены O1A, O2, гликозилированный O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75 E.coli, каждый из которых ковалентно связан с белком-носителем.

В конкретном аспекте предложена композиция или иммуногенная композиция, которая содержит:

(1) биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 E.coli, ковалентно связанный с белком-носителем обезвреженным экзотоксином AP.aeruginosa (EPA-4), содержащим SEQ ID NO: 3, где гликозилированный полисахаридный антиген O4 E.coli содержит структуру формулы (O4-Glc+);

(2) биоконъюгат полисахаридного антигена O1A E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем EPA-4, где полисахаридный антиген O1A E.coli содержит структуру формулы (O1A);

(3) биоконъюгат полисахаридного антигена O2 E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем EPA-4, где полисахаридный антиген O2 E.coli содержит структуру формулы (O2);

(4) биоконъюгат полисахаридного антигена O6A E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем EPA-4, где полисахаридный антиген O6A E.coli содержит структуру формулы (O6A);

(5) биоконъюгат полисахаридного антигена O8 E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем EPA-4, где полисахаридный антиген O8 E.coli содержит структуру формулы (O8);

(6) биоконъюгат полисахаридного антигена O15 E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем EPA-4, где полисахаридный антиген O15 E.coli содержит структуру формулы (O15);

(7) биоконъюгат полисахаридного антигена O16 E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем EPA-4, где полисахаридный антиген O16 E.coli содержит структуру формулы (O16);

(8) биоконъюгат полисахаридного антигена O25B E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем EPA-4, где полисахаридный антиген O25B E.coli содержит структуру формулы (O25B); и

(9) биоконъюгат полисахаридного антигена O75 E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем EPA-4, где полисахаридный антиген O75 E.coli содержит структуру формулы (O75), где структура каждой из формул (O4-Glc+), (O1A), (O2), (O6A), (O8), (O15), (O16), (O18A), (O25B) и (O75) показана в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 1 до 50, например от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20.

В некоторых воплощениях такая композиция или иммуногенная композиция дополнительно содержит:

(10) биоконъюгат полисахаридного антигена O18A E.coli, ковалентно связанный с белком-носителем EPA-4, где полисахаридный антиген O18A E.coli содержит структуру формулы (O18A), где структура формулы (O18A) показана в табл. 1, и n в данной структуре представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 1 до 50, например от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, на-

пример от 10 до 20.

В некоторых воплощениях биоконъюгат полисахаридного антигена O25B E.coli присутствует в композиции, описанной в данном документе, в концентрации, которая приблизительно в 1,5-6 раз, например, в 2-4 раза выше, чем концентрация любого другого биоконъюгата в композиции.

В некоторых воплощениях композиция, описанная в данном документе, содержит биоконъюгаты полисахаридных антигенов O1A, O2, гликозилированного O4, O6A, O8, O15, O16, O25B и O75 E.coli, причем биоконъюгаты O1A:O2:гликозилированного O4:O6A:O8:O15:O16:O25B:O75 присутствуют в массовом соотношении полисахаридов 1:1:1:1:1:1:2:1 или 2:1:1:2:1:1:1:4:1.

В некоторых воплощениях композиция, описанная в данном документе, содержит биоконъюгаты полисахаридных антигенов O1A, O2, гликозилированного O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75 E.coli, причем биоконъюгаты O1A:O2:гликозилированного O4:O6A:O8:O15:O16:O18A:O25B:O75 присутствуют в массовом соотношении полисахаридов 1:1:1:1:1:1:1:2:1 или 2:1:1:2:1:1:1:4:1.

В некоторых воплощениях концентрация биоконъюгата полисахаридного антигена O25B E.coli в композиции, описанной в данном документе, составляет от 2 до 50 мкг/мл, предпочтительно от 8 до 40 мкг/мл, например, от 16 до 32 мкг/мл.

В другом аспекте предложен способ индукции у субъекта антител против гликозилированного антигена O4 E.coli, включающий введение субъекту биоконъюгата гликозилированного антигена O4 E.coli, описанного в настоящем документе, или композиции или иммуногенной композиции, описанных в данном документе.

В конкретном воплощении антитела обладают опсонофагоцитарной активностью.

В другом аспекте предложен способ вакцинации субъекта против внекишечной патогенной E.coli, включающий введение субъекту биоконъюгата гликозилированного антигена O4 E.coli, описанного в настоящем документе, или композиции или иммуногенной композиции, описанных в данном документе. В некоторых аспектах предложен биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 E.coli, описанный в данном документе, или композиция или иммуногенная композиция, описанные в данном документе, для применения в индукции антител против гликозилированного антигена O4 E.coli. В некоторых аспектах предложен биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 E.coli, описанный в данном документе, или композиция или иммуногенная композиция, описанные в данном документе, для применения в вакцинации против внекишечной патогенной E.coli (ExPEC). В некоторых аспектах предложено применение биоконъюгата гликозилированного полисахаридного антигена O4 E.coli, описанного в данном документе, или композиции или иммуногенной композиции, описанных в данном документе, в изготовлении лекарственного средства для индукции у субъекта антител против гликозилированного антигена O4 E.coli. В некоторых аспектах предложено применение биоконъюгата гликозилированного полисахаридного антигена O4 E.coli, описанного в данном документе, или композиции или иммуногенной композиции, описанных в данном документе, в изготовлении лекарственного средства для вакцинации субъекта против внекишечной патогенной E.coli (ExPEC). В другом аспекте в настоящем документе предложена рекомбинантная клетка-хозяин для получения биоконъюгата гликозилированного полисахаридного антигена O4 E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем, где гликозилированный полисахаридный антиген O4 E.coli содержит структуру формулы (O4-Glcⁿ), как показано в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 1 до 50, например от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20, клетка-хозяин содержит:

(1) нуклеотидную последовательность генного кластера *gfb* для полисахаридного антигена O4 E.coli;

(2) нуклеотидную последовательность, кодирующую глюкозилтрансферазу, последовательность которой по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 4, где глюкозилтрансфераза способна модифицировать полисахаридный антиген O4 E.coli с получением гликозилированного полисахаридного антигена O4 E.coli;

(3) нуклеотидные последовательности, кодирующие транслоказу и глюкозилтрансферазу, последовательности которых по меньшей мере на 80% идентичны SEQ ID NO: 7 и 8, соответственно, где транслоказа способна транслоцировать бактопренол-связанную глюкозу, а глюкозилтрансфераза способна гликозировать бактопренол;

(4) нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-носитель; и

(5) нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарил трансферазу, способную ковалентно связывать полисахаридный антиген O4 E.coli с белком-носителем с получением биоконъюгата.

В конкретном воплощении рекомбинантная клетка-хозяин содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую глюкозилтрансферазу, которая способна модифицировать полисахаридный антиген O4 E.coli для получения гликозилированного полисахаридного антигена O4 E.coli и имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, предпочтительно по меньшей мере на 98% идентична последовательности SEQ ID NO: 4. В некоторых воплощениях глюкозилтрансфераза содержит SEQ ID NO: 4.

В некоторых воплощениях рекомбинантная клетка-хозяин содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую транслоказу, которая способна транслоцировать бактопренол-связанную глюкозу и

имеет последовательность, которая по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, предпочтительно по меньшей мере на 98% идентична последовательности SEQ ID NO: 7. В некоторых воплощениях транслоказа содержит SEQ ID NO: 7.

В некоторых воплощениях рекомбинантная клетка-хозяин содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую гликозилтрансферазу, которая способна гликозилировать бактопренол и имеет последовательность, которая по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, предпочтительно по меньшей мере на 98% идентична последовательности SEQ ID NO: 8. В некоторых воплощениях гликозилтрансфераза содержит SEQ ID NO: 8. В некоторых воплощениях рекомбинантная клетка-хозяин содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует олигосахарилтрансферазу, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В предпочтительных воплощениях олигосахарилтрансфераза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, имеющую мутацию N311V, более предпочтительно SEQ ID NO: 6, имеющую обе мутации Y77H и N311V. В некоторых воплощениях рекомбинантная клетка-хозяин содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок-носитель, содержащий по меньшей мере один сайт гликозилирования, содержащий консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 1, предпочтительно имеющую SEQ ID NO: 2.

В некоторых воплощениях кластер генов *gfb* для полисахаридного антигена O4 *E.coli* содержит последовательность, которая кодирует ферменты, которые создают полисахаридный антиген O4 *E.coli* (формула (O4-Glc-) в табл. 1), и которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 9. В некоторых воплощениях кластер генов *gfb* содержит SEQ ID NO: 9.

В некоторых воплощениях рекомбинантная клетка-хозяин содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-носитель, где белок-носитель выбран из группы, состоящей из обезвреженного экзотоксина A *P.aeruginosa* (EPA), флагеллина *E.coli* (FliC), CRM 197, мальтозосвязывающего белка (MBP), дифтерийного анатоксина, столбнячного анатоксина, обезвреженного гемолизина A *S.aureus*, агглютинирующего фактора A, агглютинирующего фактора B, термолабильного энтеротоксина *E.coli*, обезвреженных вариантов термолабильного энтеротоксина *E.coli*, субъединицы В холерного токсина (CTB), холерного токсина, обезвреженных вариантов холерного токсина, белка Satis *E.coli*, домена-"пассажира" белка Satis *E.coli*, пневмолизина *Streptococcus pneumoniae*, гемоцианина *Megathura crenulata* (KLH), PcrV *P. aeruginosa*, белка внешней мембраны *Neisseria meningitidis* (OMPC) и белка D из нетипируемого *Haemophilus influenzae*.

В конкретном воплощении рекомбинантная клетка-хозяин кодирует белок-носитель обезвреженный экзотоксин A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA), предпочтительно EPA, содержащий 1-10, предпочтительно 2-4, предпочтительно 4 сайта гликозилирования, каждый из которых содержит консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 2. В предпочтительном воплощении EPA, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

Предпочтительно, рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой *E.coli*, например, штамм *E.coli* K-12, такой как штамм W3110.

В другом аспекте предложен способ получения биоконъюгата гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, где гликозилированный полисахаридный антиген O4 *E.coli* содержит структуру формулы (O4-Glc⁺), как показано в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 1 до 50, например от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20, способ включает культивирование рекомбинантной клетки-хозяина по изобретению в условиях для продуцирования биоконъюгата. В некоторых воплощениях способ дополнительно включает выделение биоконъюгата из рекомбинантной клетки-хозяина. В другом аспекте предложен биоконъюгат, полученный описанным способом. В другом аспекте предложена композиция, содержащая биоконъюгат, полученный описанным способом.

В другом аспекте предложен способ получения рекомбинантной клетки-хозяина для получения биоконъюгата гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, где гликозилированный полисахаридный антиген O4 *E.coli* содержит структуру формулы (O4-Glc⁺), как показано в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 1 до 50, например от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20, способ включает введение одной или более чем одной молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты в клетку для продуцирования рекомбинантной клетки-хозяина, где рекомбинантная клетка-хозяин содержит:

(1) нуклеотидную последовательность генного кластера *gfb* для полисахаридного антигена O4 *E.coli*;

(2) нуклеотидную последовательность, кодирующую гликозилтрансферазу, последовательность которой по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 4, где гликозилтрансфераза способна модифицировать полисахаридный антиген O4 *E.coli* с получением гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli*;

(3) нуклеотидные последовательности, кодирующие транслоказу и гликозилтрансферазу, последовательности которых по меньшей мере на 80% идентичны SEQ ID NO: 7 и 8, соответственно, где транс-

локаза способна транслоцировать бактопренол-связанную глюкозу, а гликозилтрансфераза способна гликозилировать бактопренол;

(4) нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-носитель; и

(5) нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу, способную ковалентно связывать гликозилированный полисахаридный антиген O4 *E.coli* с белком-носителем с получением биоконъюгата.

В конкретном воплощении гликозилтрансфераза, которая способна модифицировать полисахаридный антиген O4 *E.coli* для получения гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli*, имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, предпочтительно по меньшей мере на 98% идентична последовательности SEQ ID NO: 4. В некоторых воплощениях гликозилтрансфераза содержит SEQ ID NO: 4.

В некоторых воплощениях олигосахарилтрансфераза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, предпочтительно SEQ ID NO: 6, содержащую аминокислотную мутацию N311V. В некоторых воплощениях олигосахарилтрансфераза содержит SEQ ID NO: 6, имеющую аминокислотные мутации Y77H и N311V.

В некоторых воплощениях кластер генов *gfb* для полисахаридного антигена O4 *E.coli* содержит последовательность, которая кодирует ферменты, которые создают полисахаридный антиген O4 *E.coli* (формула (O4-Glc-) в табл. 1), и которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 9. В некоторых воплощениях кластер генов *gfb* содержит SEQ ID NO: 9.

В некоторых воплощениях транслоказа способна транслоцировать связанную с бактопренолом глюкозу и имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, предпочтительно по меньшей мере на 98% SEQ ID NO: 7. В некоторых воплощениях транслоказа содержит SEQ ID NO: 7. В некоторых воплощениях гликозилтрансфераза способна гликозилировать бактопренол и имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, предпочтительно по меньшей мере на 98% SEQ ID NO: 8. В некоторых воплощениях гликозилтрансфераза содержит SEQ ID NO: 8. В некоторых воплощениях белок-носитель содержит по меньшей мере один сайт гликозилирования, содержащий консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 1, предпочтительно имеющую SEQ ID NO: 2. В некоторых воплощениях белок-носитель выбран из группы, состоящей из обезвреженного экзотоксина A *P.aeruginosa* (EPA), флагеллина *E.coli* (Flc), CRM 197, мальтозосвязывающего белка (MBP), дифтерийного анатоксина, столбнячного анатоксина, обезвреженного гемолизина A *S.aureus*, агглютинирующего фактора A, агглютинирующего фактора B, термолабильного энтеротоксина *E.coli*, обезвреженных вариантов термолабильного энтеротоксина *E.coli*, субъединицы B холерного токсина (CTB), холерного токсина, обезвреженных вариантов холерного токсина, белка Sat *E.coli*, домена-"пассажира" белка Sat *E.coli*, пневмолизина *Streptococcus pneumoniae*, гемоцианина *Megathura crenulata* (KLH), PcrV *P. aeruginosa*, белка внешней мембраны *Neisseria meningitidis* (OMPC) и белка D из нетипируемого *Haemophilus influenzae*. В конкретном воплощении белок-носитель представляет собой обезвреженный экзотоксин A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA), предпочтительно EPA, содержащий 1-10, предпочтительно 2-4, предпочтительно 4 сайта гликозилирования, каждый из которых содержит консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 2. В конкретных воплощениях белок-носитель представляет собой EPA с четырьмя консенсусными последовательностями гликозилирования (EPA-4), предпочтительно белок-носитель содержит SEQ ID NO: 3.

В некоторых воплощениях рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой клетку *E.coli*, например, из штамма *E.coli* K12, такого как штамм W3110. В другом аспекте предложен способ получения биоконъюгата полисахаридного антигена O_x, ковалентно связанного с белком-носителем, способ включает стадии:

(1) получения рекомбинантной клетки-хозяина, содержащей:

а. нуклеотидную последовательность кластера генов *gfb* для полисахаридного антигена O_x;

б. нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий по меньшей мере один сайт гликозилирования, содержащий консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 1, предпочтительно имеющую SEQ ID NO: 2, и

в. нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу PglB_y; и

(2) культивирования рекомбинантной клетки-хозяина в условиях для продуцирования биоконъюгата, где:

когда антиген O_x представляет собой полисахаридный антиген O1A, PglB_y содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V;

когда антиген O_x представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, PglB_y содержит аминокислотную мутацию N311V или аминокислотные мутации Y77H и N311V, а рекомбинантная клетка-хозяин дополнительно содержит последовательность, кодирующую GtrS, последовательность которого по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 4, и нуклеотидную последовательность, кодирующую GtrA и GtrB, последовательность которых по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 7 и

8, соответственно;

когда антиген O_x представляет собой полисахаридный антиген O6A, PglB_y содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V;

когда антиген O_x представляет собой полисахаридный антиген O8, PglB_y не содержит аминокислотные мутации в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669;

когда антиген O_x представляет собой полисахаридный антиген O15, PglB_y содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V;

когда антиген O_x представляет собой полисахаридный антиген O16, PglB_y содержит аминокислотные мутации Y77H, S80R, Q287P, K289R и N311V;

когда антиген O_x представляет собой полисахаридный антиген O18A, PglB_y не содержит аминокислотные мутации в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669; и

когда антиген O_x представляет собой полисахаридный антиген O75, PglB_y содержит аминокислотную мутацию N311V, где в каждом случае аминокислотные мутации относятся к PglB_y дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В некоторых воплощениях белок-носитель представляет собой обезвреженный экзотоксин A *P.aeruginosa* (EPA). Предпочтительно белок-носитель EPA содержит 1-10, предпочтительно 2-4, предпочтительно 4 сайта гликозилирования, каждый из которых содержит консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 2. В конкретном воплощении белок носитель EPA содержит SEQ ID NO: 3. В другом аспекте предложен биоконъюгат, полученный способом получения биоконъюгата полисахаридного антигена O_x , ковалентно связанного с белком-носителем, как описано в данном документе. В другом аспекте предложена композиция, содержащая такой биоконъюгат. В таких воплощениях композиция содержит по меньшей мере 2, предпочтительно по меньшей мере 3, более предпочтительно по меньшей мере 5, еще более предпочтительно по меньшей мере 7 таких биоконъюгатов.

Краткое описание графических материалов

Приведенное ниже краткое описание, а также подробное описание изобретения будет более понятным при прочтении в привязке к графическим материалам. Следует понимать, что изобретение не ограничено конкретными воплощениями, приведенными в графических материалах.

В графических материалах:

на фиг. 1A-B показаны измеренные в ELISA титры IgG против немодифицированного (GLC-) или глюкозо-модифицированного (GLC+) O4 LPS в сыворотке от двух кроликов, иммунизированных биоконъюгатом Glc-модифицированного полисахарида O4, как описано в примере 4; титры определяли методом ELISA в четырех повторностях;

на фиг. 2 показаны титры IgG в ELISA с цельными клетками и объединенной сывороткой кроликов, иммунизированных биоконъюгатом Glc-модифицированного O4 против изолятов *E.coli* O4 с охарактеризованным статусом gtrS, как описано в примере 4; следующие изоляты были gtrS-отрицательными: A2625, stGVXN4988, OC24784, OC24787 и OC24788; следующие изоляты были gtrS-положительными: Y1382, E551, OC24334, stGVXN4983, stGVXN4994 и OC24794; также был включен штамм OC9487 (ATCC 35383; серотип O75), служивший отрицательным контролем; На фиг. 3A-B показаны вестерн-блоты LPS, экстрагированного из gtrS-положительных и отрицательных изолятов O4, где для детекции использовали объединенную сыворотку кроликов, иммунизированных модифицированным полисахаридом O4;

на фиг. 4A и 4B показаны гуморальные ответы, индуцированные гликозилированными биоконъюгатами O4 (O4-Glc+)-EPA; на фиг. 4A показаны уровни антител в сыворотке, измеренные методом ELISA на 0, 14 и 42 дни после иммунизации; показаны индивидуальные титры (\log_{10} EC50) и GMT \pm 95% ДИ; серая пунктирная линия указывает порог, выше которого кривые разведения образцов описываются 4-параметрической логистической регрессионной моделью; на фиг. 4B показаны результаты опсонофагocитарного анализа (ОПК) для определения функциональности антител в образцах сыворотки, полученных на 42 день после иммунизации биоконъюгатом гликозилированного O4 (O4-Glc+)- EPA (4,0 мкг); критерий суммы рангов Вилкоксона и поправка Бонферрони; * $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,0001$;

на фиг. 5 показан бустерный эффект гликозилированного биоконъюгата O4 (O4 Glc+) у крыс Спрег-Доули (Sprague Dawley), иммунизированных 3 различными дозами, как описано в примере 4; уровни антител в сыворотке измеряли с помощью ELISA на 0, 14 и 42 день после иммунизации; индивидуальные титры (\log_{10} EC50) показаны для каждого животного; линии между точками данных соединяют титры IgG для каждого животного во времени; серая пунктирная линия указывает порог, выше которого кривые разведения образцов описываются 4-параметрической логистической регрессионной моделью; статистический анализ проводили с помощью знакового рангового критерия Вилкоксона и поправки Бонферрони для множественных сравнений (день 14 против дня 0, $P = 0,012$ для 4,0 мкг/доза; день 42 против дня 0, $P = 0,006$ для всех доз; день 42 против дня 14, $P = 0,006$ для всех доз);

на фиг. 6 показана функциональность антител, индуцированная биоконъюгатом O4-Glc+-EPA; крыс Спрег-Доули (Sprague Dawley) иммунизировали 3 раза внутримышечно буфером для приготовления композиции или биоконъюгатом O4 (Glc+)-EPA в дозе 4,00 мкг/доза; функциональность антител опреде-

ляли путем исследования опсонофагоцитарной активности (ОПКА) с использованием штаммов O4(Glc+) и O4(Glc-) E.coli; показаны индивидуальные опсонические титры (O1) и GMT \pm 95% ДИ;

на фиг. 7А-В показаны электрофореграммы, по виду напоминающие блот, полученные при скрининге PglB при помощи капиллярного электрофореза с использованием моноклональных антител для детекции биоконъюгата O4-Glc+ в периплазматической фракции, позволяющие визуализировать продуцирование биоконъюгата O4-Glc+ для каждого тестируемого штамма. Моногликозилированный продукт примерно 180 кДа, дигликозилированный продукт примерно 320 кДа и тригликозилированный продукт примерно 450 кДа. А) Первый цикл скрининга PglB дикого типа на дорожке 3, N311V-PglB на дорожках 2 и 4, пустой контрольный штамм на дорожке 1 и другие варианты PglB на дорожках 5 и 6. Б) Второй цикл скрининга N311V PglB на дорожке 3, N311V+Y77H PglB на дорожке 9, пустой контрольный штамм на дорожках 1 и 2, другие варианты PglB на остальных дорожках;

на фиг. 8А-К показан гуморальный ответ, индуцированный вакциной ExPEC10V у новозеландских белых кроликов. Животные получали 3 внутримышечные инъекции ExPEC10V или физиологического раствора, которые вводили с интервалом 2 недели. Вакцину ExPEC10V вводили в 3 различных концентрациях (группа 1: высокая доза, группа 2: средняя доза и группа 3: низкая доза, табл. 11) и контрольная группа получала только физ. раствор (группа 4, 0,9% (мас./об.) раствор хлорида натрия). Уровни антител измеряли с помощью ELISA в день 0 (до вакцинации) и на 14, 27 и 42 дни (после вакцинации). Показаны индивидуальные титры (значения EC50) и средние геометрические титры (GMT) \pm 95% ДИ. Критерий суммы рангов Уилкоксона с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. Вакцинированных ExPEC10V животных (группа 1, 2 и 3) сравнивали с контролем, получившим физ. раствор (группа 4). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$. LOD: предел обнаружения;

на фиг. 9А-К показан гуморальный ответ, индуцированный ExPEC10V. Новозеландские белые кролики получали 3 внутримышечных иммунизации ExPEC10V (суммарно 105,6 мкг полисахарида) или 0,9% масс/об, раствор хлорида натрия (контроль). Титры IgG определяли при помощи ELISA в день 1 (до иммунизации, n= 20/группу), день 31 (после иммунизации, n=20/группу) и день 50 (после иммунизации, n=10/группу). На графиках показаны индивидуальные титры и среднее геометрическое значение \pm 95% доверительный интервал для каждой группы. Различия в титрах IgG между группами, получавшими ExPEC10V, и контрольной группой анализировали при помощи модели Tobit с критерием отношения правдоподобия. Значения $p \leq 0,05$ считали значимыми. * $P \leq 0,05$, **** $P \leq 0,0001$;

на фиг. 10А-В показана общая схема клинического исследования 1/2а фазы с вакциной ExPEC10V у человека. На фиг. 10А показана общая схема исследования для когорты 1, а на фиг. 10В показана общая схема исследования для когорты 2. Подробности описаны в примере 11.

Подробное описание изобретения

Все публикации, статьи и патенты, которые процитированы или описаны в разделе "Предшествующий уровень техники" или в других разделах описания, включены во всей полноте путем ссылки. Обсуждение документов, действий, материалов, устройств, изделий и т.п., которые включены в данное описание, служит для раскрытия контекста изобретения. Такое обсуждение не является допущением, что какой-либо из указанных объектов или все из них являются частью уровня техники по отношению к любому из изложенных или заявленных изобретений. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют обычное значение, известное специалистам в области, к которой относится данное изобретение. В противоположном случае, некоторые упомянутые термины имеют значение, указанное в описании.

Следует отметить, что в описании и формуле изобретения все термины в единственном числе охватывают указанные объекты во множественном числе, за исключением случаев, когда из контекста явным образом не следует противоположное. Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в ряду.

Специалисты в данной области поймут или смогут обнаружить, проведя рутинные эксперименты, множество эквивалентов конкретных воплощений изобретения, описанных в данном документе. Предполагается, что такие эквиваленты входят в объем данного изобретения.

Во всем этом описании и в приведенной далее формуле изобретения, если из контекста не следует иное, слово "содержать" и такие варианты, как "содержит" и "содержащий", подразумевают 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 использовании в данном документе термин "содержащий" может быть заменен термином "имеющий в своем составе" или "включающий", а иногда при использовании в данном документе термином "имеющий". "Состоящий из" при использовании в данном документе исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанный в элементе формулы изобретения. Термин "по существу состоящий из" не исключает материалы или стадии, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики" пункта формулы изобретения. Любой из вышеупомянутых терминов "содержащий", "имеющий в своем составе", "включающий" и "имеющий" всякий раз, когда они используются в данном документе в контексте аспекта или воплощения изобретения, может быть заменен термином "состоящий из" или "по существу со-

стоящий из" для изменения объема раскрытия.

В контексте настоящего описания союз "и/или" между множеством перечисленных элементов следует понимать как охватывающий как отдельные, так и комбинированные варианты. Например, если два элемента соединены "и/или", первый вариант относится к применимости первого элемента без второго. Второй вариант относится к применимости второго элемента без первого. Третий вариант относится к применимости первого и второго элементов вместе. Подразумевается, что любой из этих вариантов подпадает под значение и, следовательно, удовлетворяет требованию термина "и/или", используемого в данном документе. Подразумевается, что одновременное применение более чем одного из вариантов подпадает под это значение и, следовательно, удовлетворяет требованию термина "и/или".

Выявление структурной модификации О-антигена, а именно ответвления глюкозы, в серотипе O4 *E. coli* (Jann et al., 1993) представляет собой проблему для открытия и разработки гликоконъюгированной вакцины, нацеленной на бактериальные изоляты в этом серотипе. Доля современных клинических изолятов O4, экспрессирующих немодифицированные (не имеющие боковых ответвлений глюкозы) и модифицированные (имеющие боковые ответвления глюкозы) формы O4 О-антигена, неизвестны. Получение информации об этой характеристике имеет решающее значение для выбора соответствующей антигенной структуры. Кроме того, не определена степень, в которой индуцированные вакциной антитела против одной формы полисахарида O4, будут перекрестно реагировать с другой формой. Очистка О-антигена, свободного от липида А, и последующая химическая конъюгация с белком-носителем является длительным и трудоемким процессом. Кроме того, процессы очистки, обезвреживания липида А и химической конъюгации могут привести к потере эпитопов, гетерогенности антигена и снижению иммуногенности конъюгированного полисахарида. Синтез гликоконъюгатов путем биоконъюгирования может преодолеть эти ограничения классической очистки и химической конъюгации, но синтез *in vivo* О-антигена O4 с ответвлением глюкозы требует активности фермента, обеспечивающего ветвление полисахарида, который находится за пределами кластера генов *gfb*. На сегодняшний день модифицирующий О-антиген фермент, ответственный за ответвление глюкозы в штаммах O4 *E. coli*, не идентифицирован. Клонирование генного кластера *gfb* O4 в биоконъюгирующий штамм *E. coli*, экспрессирующий PglB, будет недостаточным для синтеза гликоконъюгата O4 с ответвлением глюкозы, а скорее приведет к образованию только биоконъюгатов O4 без ответвлений глюкозы (структура их гликана показана в формуле (O4) в табл. 1). Используемые в данном описании термины "гликозилированный O4", "O4 с ответвлением глюкозы", "O4 Glc+" и "Glc+ O4" О-антиген относятся к О-антигену O4 с боковым ответвлением глюкозы, и его структура показана в формуле (O4-Glc+) в табл. 1.

В настоящем документе раскрывается ген, кодирующий фермент, модифицирующий О-антиген, ответственный за ответвление глюкозы полисахаридного антигена O4 *E. coli*. Также описаны клетки-хозяева, например, генно-модифицированные клетки-хозяева, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую ферменты, способные продуцировать биоконъюгаты, содержащие гликозилированный полисахаридный антиген O4, ковалентно связанный с белком-носителем *in vivo*. Такие клетки-хозяева можно использовать для создания биоконъюгатов, содержащих гликозилированный антиген O4, связанный с белком-носителем, которые можно применять, например, в составе терапевтических и/или профилактических композиций (например, вакцин). Кроме того, в настоящем документе предложены композиции, содержащие биоконъюгаты гликозилированного полисахаридного антигена O4, отдельно или в комбинации с другими антигенами *E. coli* (например, полисахаридными антигенами O1, O2, O6, O8, O15, O16, O18, O25 и/или O75 и их подсеротипами). Композиции можно применять в способах профилактики и/или терапии, например, вакцинации хозяев против инфекции *E. coli*, и они могут найти применение в получении антител, которые можно применять, например, в способах терапии, таких как иммунизация субъектов.

Используемые в данном документе термины "О-антиген", "полисахаридный О-антиген", "сахаридный О-антиген" и "OPS" относятся к О-антигену грамотрицательных бактерий. Обычно О-антиген представляет собой полимер иммуногенных повторяющихся полисахаридных единиц. В конкретном воплощении термины "О-антиген", "полисахаридный О-антиген" и "OPS" относятся к О-антигену *Escherichia coli*. Различные серотипы *E. coli* экспрессируют разные О-антигены. В *E. coli* продукты генов, участвующие в биогенезе О-антигена, кодируются генным кластером *gfb*. Используемые в данном документе термины "кластер *gfb*" и "генный кластер *gfb*" относятся к генному кластеру, кодирующему ферментный аппарат, способный синтезировать структуру, являющуюся остовом О-антигена. Термин кластер *gfb* может применяться к любому кластеру биосинтеза О-антигена и предпочтительно относится к кластеру генов из рода *Escherichia*, в частности, *E. coli*.

Используемый в данном документе термин "O1A" относится к O1A антигену *E. coli* (подсеротипу *E. coli* серотипа O1). Термин "O2" относится к O2 антигену *E. coli* (подсеротипу *E. coli* серотипа O2). Термин "O6A" относится к O6A антигену *E. coli* (подсеротипу *E. coli* серотипа O6). Термин "O8" относится к O8 антигену *E. coli* (подсеротипу *E. coli* серотипа O8). Термин "O15" относится к O15 антигену *E. coli* (подсеротипу *E. coli* серотипа O15). Термин "O16" относится к O16 антигену *E. coli* (подсеротипу *E. coli* серотипа O16). Термин "O18A" относится к O18A антигену *E. coli* (подсеротипу *E. coli* серотипа O18). Термин "O25B" относится к O25B антигену *E. coli* (подсеротипу *E. coli* серотипа O25). Термин "O75" от-

носится к O75 антигену *E. coli* (подсеротипу *E. coli* серотипа O75).

Структуры полисахаридных O-антигенов *E. coli*, упоминаемые в данной заявке, показаны ниже в табл. 1. Показана одна повторяющаяся единица для каждого полисахаридного O-антигена *E. coli*.

Таблица 1. Структуры полисахаридных O-антигенов *E. coli*

Полисахаридные O-антигены <i>E. coli</i>	Структура повторяющейся единицы ¹
Негликозилированный полисахаридный антиген O4 (O4-Glc-)	$[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-FucpNAc}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow)]_n$
Гликозилированный полисахаридный антиген O4 (O4-Glc+)	$\begin{array}{c} \alpha\text{-D-Glcp} \\ \\ 1 \\ \downarrow \\ 3 \\ \\ [\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-FucpNAc}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow)]_n \end{array}$
Полисахаридный антиген O1A (O1A)	$\begin{array}{c} [\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow)]_n \\ \\ 2 \\ \uparrow \\ 1 \\ \\ \beta\text{-D-ManpNAc} \end{array}$
Полисахаридный антиген O2 (O2)	$\begin{array}{c} [\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow)]_n \\ \\ 2 \\ \uparrow \\ 1 \\ \\ \alpha\text{-D-Fucp3NAc} \end{array}$
Полисахаридный антиген O6A (O6)	$\begin{array}{c} [\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpNAc}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Manp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Manp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow)]_n \\ \\ 2 \\ \uparrow \\ 1 \\ \\ \beta\text{-D-Glcp} \end{array}$
Полисахаридный антиген O8 (O8)	$\alpha\text{-D-Manp3Me}\text{-}(1\rightarrow [3)\text{-}\beta\text{-D-Manp}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Manp}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Manp}\text{-}(1\rightarrow)]_n$
Полисахаридный антиген O15 (O15)	$[\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-FucpNAc}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow)]_n$
Полисахаридный антиген O16 (O16)	$\begin{array}{c} [\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Galf}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow)]_n \\ \\ 2 \\ \uparrow \\ \text{Ac} \end{array}$

Полисахаридный антиген O18A (O18A)	$[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow)]_n$ $\begin{array}{c} 3 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta\text{-D-GlcpNAc} \end{array}$
Полисахаридный антиген O25B (O25B)	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Glcp} \\ 1 \\ \downarrow \\ 6 \\ [\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow)]_n \\ 3 \qquad \qquad \qquad 2 \\ \uparrow \qquad \qquad \qquad \uparrow \\ 1 \qquad \qquad \qquad \text{Ac} \\ \alpha\text{-L-Rhap} \end{array}$
Полисахаридный антиген O75 (O75)	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Manp} \\ 1 \\ \downarrow \\ 4 \\ [\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow)]_n \end{array}$

Каждый n независимо представляет собой целое число от 1 до 100, такое как 1-50, 1-40, 1-30, 1-20 и 1-10, 3-50, 3-40, например по меньшей мере 5, такое как 5-40, например 7-30, например от 7 до 25, например от 10 до 20, но в некоторых случаях может быть 1-2.

Все описанные в данном документе моносахариды имеют общее значение, известное в данной области. Моносахариды могут иметь конфигурацию D или L. Если D или L не указаны, считается, что сахар имеет D-конфигурацию. Моносахариды обычно обозначают аббревиатурами, широко известными и используемыми в данной области техники. Например, Glc относится к глюкозе, D-Glc относится к D-глюкозе, а L-Glc относится к L-глюкозе. Другие общепринятые аббревиатуры для моносахаридов включают: Rha, рамноза; GlcNAc, N-ацетилглюкозамин; GalNAc, N-ацетилгалактозамин; Fuc, фукоза; Man, манноза; Man3Me, 3-O-метил-манноза; Gal, галактоза; FucNAc, N-ацетилфукозамин и Rib, рибоза. Суффикс "f" относится к фуранозе, а суффикс "p" относится к пиранозе.

Термины "RU", "единица повтора" и "повторяющаяся единица", используемые в отношении O-антигена, относятся к биологической повторяющейся единице (BRU) O-антигена, поскольку он синтезируется *in vivo* клеточными механизмами (например, гликозилтрансферазами). Количество RU O-антигена может варьировать в зависимости от серотипа, и в воплощениях изобретения обычно варьирует от примерно 1 до 100 RU, предпочтительно от примерно 1 до 50 RU, например, 1-50 RU, 1-40 RU, 1-30 RU, 1-20 RU и 1-10 RU, и более предпочтительно по меньшей мере 3 RU, по меньшей мере 4 RU, по меньшей мере 5 RU, например 3-50 RU, предпочтительно 5-40 RU, например 7-25 RU, например 10-20 RU. Однако в некоторых случаях количество RU O-антигена может составлять 1-2. Структура каждого O-антигена, который конкретно описан в данном документе, показана содержащей одну RU с переменной "n", обозначающей количество RU. В каждом полисахаридном O-антигене в составе биоконъюгата по изобретению n независимо равно целому числу от 1 до 100, такому как 1-50, 1-40, 1-30, 1-20, 1-10, предпочтительно по меньшей мере 3, более предпочтительно по меньшей мере 5, например, 3-50, предпочтительно 5-40 (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40), но в некоторых случаях может быть 1-2. В некоторых воплощениях n независимо представляет собой целое число от 7 до 25, например, приблизительно 10-20. Значения могут варьировать между отдельными полисахаридными O-антигенами в составе композиции и представлены здесь как средние значения, т.е. если биоконъюгат описан здесь как имеющий n , которое независимо равно целому числу 5-40, большая часть полисахаридных O-антигенов, содержащихся в композиции, имеет 5-40 повторяющихся единиц, но также могут содержаться некоторые полисахаридные O-антигены, имеющие менее 5 повторяющихся единиц или более 40 повторяющихся единиц. Термин "гликоконъюгат" относится к конъюгату сахарного или сахаридного антигена (например, олиго- и полисахаридного) с белком, связанному с другим химическим веществом, включая, без ограничения, белки, пептиды, липиды и т.д. Гликоконъюгаты можно получить химически, например, путем химического (синтетического) связывания белка и сахарного или сахаридного антигена. Термин гликоконъюгат также включает биоконъюгаты.

Термин "биоконъюгат" относится к конъюгату между белком (например, белком-носителем) и сахарным или сахаридным антигеном (например, олиго- и полисахаридным), полученным в клетке-хозяине, предпочтительно бактериальной клетке-хозяине, например, клетке-хозяине *E.coli*, где аппарат клетки-хозяина связывает антиген с белком (например, связывает с N). Предпочтительно, термин "биоконъюгат" относится к конъюгату между белком (например, белком-носителем) и O-антигеном, пред-

почтительно О-антигеном *E. coli* (например, O1A, O2, гликозилированным O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B, O75 и т.д.), полученным в клетке-хозяине, где аппарат клетки-хозяина связывает антиген с белком (например, связывает с N). Поскольку биоконъюгаты получают в клетках-хозяевах благодаря аппарату клетки-хозяина, антиген и белок ковалентно связаны в составе биоконъюгата через гликозидную связь. Биоконъюгаты могут быть получены в рекомбинантных клетках-хозяевах, генетически модифицированных для экспрессии клеточного аппарата, необходимого для синтеза О-антигена и/или связывания О-антигена с целевым белком. Биоконъюгаты, которые описаны в данном документе, обладают преимуществами по сравнению с химически полученными гликоконъюгатами, в которых гликаны выделены из клеточной стенки бактерий и впоследствии химически связаны с белком-носителем, например, биоконъюгаты требуют меньшего количества химических веществ при производстве и являются более однородными с точки зрения получаемого конечного продукта и содержат меньше или совсем не содержат свободного (т.е. не связанного с белком-носителем) гликана. Таким образом, в типичных воплощениях биоконъюгаты предпочтительны по сравнению с гликоконъюгатами, полученными химическим путем. Термин "приблизительно", когда он используется вместе с числом, относится к любому числу в пределах ± 1 , ± 5 или $\pm 10\%$ от указанного числа.

Термин "процент (%)" идентичности последовательностей" или "% идентичности" описывает количество соответствий ("совпадений") идентичных аминокислот двух или более выровненных аминокислотных последовательностей по сравнению с количеством аминокислотных остатков, составляющих общую длину аминокислотных последовательностей. Другими словами, используя выравнивание, можно установить процент одинаковых аминокислотных остатков для двух или более последовательностей (например, 90, 95, 97 или 98% идентичности), когда последовательности сравниваются и выравниваются для максимального соответствия, определенного с использованием алгоритма сравнения последовательностей, известного в данной области техники, или при выравнивании вручную и визуальной проверке. Последовательности, которые сравнивают для определения идентичности последовательностей, могут, таким образом, отличаться заменой(ами), добавлением(ями) или делецией(ями) аминокислот. Программы, подходящие для выравнивания белковых последовательностей, известны специалистам в области техники. Процент идентичности белковых последовательностей можно определить, например, с использованием таких программ как CLUSTALW, Clustal Omega, FASTA или BLAST, например, используя алгоритм NCBI BLAST (Altschul SF, et al (1997), *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402).

Например, для аминокислотных последовательностей идентичность и/или сходство последовательностей можно установить с помощью стандартных методик, известных в области техники, включая, без ограничения, алгоритм определения локальной идентичности последовательностей Смита и Ватермана, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482, алгоритм выравнивания идентичных областей Нидлмана и Вунша, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443), способ поиска сходства Пирсона и Липмана, 1988, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, с помощью компьютеризированной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), программы Best Fit для последовательностей, описанной Devereux et al, 1984, *Nucl. Acid Res.* 12:387-395, предпочтительно с применением настроек по умолчанию, или путем проверки. В некоторых воплощениях процент идентичности рассчитывают с помощью FastDB на основании следующих параметров: штраф за несовпадение 1; штраф за открытие гэпа 1; штраф за длину гэпа 0,33; и штраф за объединение 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," *Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications*, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Другим примером полезного алгоритма является алгоритм BLAST, описанный: Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Altschul et al, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; и Karin et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:5873-5787. Особенно полезной программой BLAST является программа WU-BLAST-2, которая была получена от Altschul et al, 1996, *Methods in Enzymology* 266: 460-480. WU-BLAST-2 использует несколько параметров поиска, большинство из которых имеют значения по умолчанию. Дополнительным полезным алгоритмом является "gapped BLAST", опубликованный Altschul et al, 1993, *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402. Термин "инвазивное заболевание, вызываемое внекишечными патогенными *Escherichia coli* (ExPEC) (IED)" определяется здесь как острое заболевание с системной бактериальной инфекцией, которое микробиологически подтверждается либо выделением и идентификацией *E. coli* из крови или других обычно стерильных участков тела, либо выделением и идентификацией *is. coli* из мочи пациента с наличием признаков и симптомов инвазивного заболевания (синдром системной воспалительной реакции (SIRS), сепсис или септический шок) и отсутствие других идентифицируемых источников инфекции.

Биоконъюгаты гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*.

В одном аспекте предложен биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанный с белком-носителем. В данном описании термин "O4" относится к O4 антигену *E. coli* (*E. coli* серотипа O4). Известно, что у *E. coli* серотипа O4 существует структурная модификация О-антигена. В частности, некоторые серотипы O4 экспрессируют модифицированный О-антиген, имеющий ответвленную глюкозную единицу. Используемые здесь термины "гликозилированный антиген O4", "гликозилированный полисахаридный антиген O4", "полисахаридный антиген O4-Glc+" и "антиген O4-

Glc⁺ относятся к антигену O4 (например, антигену O4 E.coli), имеющему ответвление глюкозы, в котором D-глюкоза связана с L-рамнозой в повторяющейся единице L-Rha→D-Glc→L-FucNAc→D-GlcNAc. В конкретном воплощении гликозилированный полисахаридный антиген O4 E.coli содержит структуру формулы (O4-Glc⁺), как показано в табл. 1, где n является целым числом от 1 до 100. В предпочтительных воплощениях n представляет собой целое число от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20.

Штаммы E.coli O4 независимо от статуса ответвления глюкозы, несут по существу идентичный кластер генов gfb, кодирующих гены, ответственные за продукцию полисахаридного антигена O4. Однако, синтез *in vivo* модифицированного антигена O4, имеющего ответвление глюкозы, требует активности фермента, обеспечивающего ветвление полисахарида, который находится за пределами кластера генов gfb. Насколько известно авторам изобретения, до настоящего времени фермента, обеспечивающего ветвление полисахарида, ответственного за модификацию антигена O4 глюкозой, не известно. Авторы изобретения обнаружили последовательность фермента, обеспечивающего ветвление полисахарида, ответственного за модификацию антигена O4 глюкозой. Обнаружение этого фермента позволяет получать биоконъюгаты модифицированного полисахаридного антигена O4, имеющего ответвление глюкозы. Модифицированная глюкозой форма полисахаридного антигена O4 присутствует в преобладающих серотипах и, таким образом, может применяться для обеспечения улучшенного иммунного ответа, например, для профилактического или терапевтического применения.

В частности, в настоящем документе представлена последовательность гена gtrS, кодирующего фермент глюкозилтрансферазу, специфичную для серотипа O4 E.coli, который гликозилирует антиген O4. Как правило, гены gtrA, gtrB и gtrS кодируют ферменты, ответственные за гликозилирование O-антигена. В то время как гены gtrA и gtrB в разных серотипах высоко гомологичны и взаимозаменяемы, ген gtrS кодирует специфичную для серотипа O-антиген глюкозилтрансферазу. Ген gtrS серотипа O4 E.coli кодирует фермент GtrS, который модифицирует антиген O4 путем введения ответвления глюкозы. Характеристика современных клинических изолятов E.coli серотипа O4 выявила присутствие gtrS у 78% протестированных изолятов, что указывает на то, что полисахаридный антиген O4 E.coli, модифицированный добавлением остатка глюкозы, преобладает у современных инфекционных изолятов.

В одном воплощении предложена нуклеиновая кислота гена gtrS из E.coli серотипа O4, кодирующая глюкозилтрансферазу GtrS, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. В другом воплощении нуклеиновая кислота gtrS кодирует белок GtrS из E.coli серотипа O4, который приблизительно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 98, 99 или 100% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4. Белок GtrS, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, способен специфически гликозилировать полисахаридный антиген O4 E.coli для получения гликозилированного антигена O4, имеющего структуру формулы (O4-Glc⁺), как показано в табл. 1. Специалист в области техники сможет создать мутированные формы белка GtrS SEQ ID NO: 4, идентичные по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO: 4, и протестировать такие последовательности на активность гликозилирования антигена O4 E.coli с учетом изложенного в данном документе изобретения. Рекомбинантные клетки-хозяева, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ген глюкозилтрансферазы gtrS E.coli серотипа O4, и применение рекомбинантных клеток-хозяев для получения полисахаридных антигенов O4, модифицированных глюкозой, и их биоконъюгатов описаны более подробно ниже.

Последовательности для белков, кодируемых gtrA и gtrB, которые функционируют как транслоказа глюкозы, связанной с бактопренолом (GtrA, перетаскивает глюкозу, связанную с бактопренолом, через внутреннюю мембрану в периплазму) и бактопренол глюкозилтрансферазы (GtrB, связывает глюкозу с бактопренолом), соответственно, могут содержать аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере примерно на 80% идентичны SEQ ID NO: 7 и 8 соответственно. В некоторых воплощениях последовательности нуклеиновых кислот, кодирующих белки GtrA и GtrB, которые по меньшей мере приблизительно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны SEQ ID NO: 7 и 8, соответственно, и обладающие активностью транслоказы глюкозы, связанной с бактопренолом, и бактопренол глюкозилтрансферазы, соответственно, также присутствуют в клетках-хозяевах по изобретению, которые дополнительно содержат O4-специфический локус gfb, последовательность, кодирующую O4-специфический GtrS, описанную выше, олигосахарилтрансферазу, описанную выше и последовательность, кодирующую белок-носитель, имеющий одну или более чем одну консенсусную последовательность гликозилирования, описанную в данном документе, для получения биоконъюгатов гликозилированного O4 E.coli (содержащих гликановую структуру формулы (O4-Glc⁺) по табл. 1).

Биоконъюгаты гликозилированного полисахаридного антигена O4 E.coli, предложенные в данном документе, ковалентно связаны с белком-носителем, предпочтительно гликозидной связью. Можно применять любой подходящий с учетом данного описания белок-носитель, известный специалистам в области техники.

Подходящие носители включают обезвреженный экзотоксин A P.aeruginosa (EPA), флагеллин E.coli (FHC), CRM 197, мальтозосвязывающий белок (MBP), дифтерийный анатоксин, столбнячный анатоксин,

обезвреженный гемолизин *A. S.aureus*, агглютинирующий фактор А, агглютинирующий фактор В, термолабильный энтеротоксин *E.coli*, обезвреженные варианты термолабильного энтеротоксина *E.coli*, субъединицу В холерного токсина (СТВ), холерный токсин, обезвреженные варианты холерного токсина, белок Sat *E.coli*, пассажирский домен белка Sat *E.coli*, пневмолизин *Streptococcus pneumoniae*, гемоцианин *Megathura crenulata* (KLH), PcrV *P.aeruginosa*, белок внешней мембраны *Neisseria meningitidis* (ОМРС) и белок D из нетипируемого *Haemophilus influenzae*, но не ограничиваются перечисленным. Описано биоконъюгирование с различными белками-носителями, содержащими требуемую консенсусную последовательность гликозилирования, демонстрируя, что с помощью этой технологии можно гликозилировать широкий спектр белков (см., например, WO 06/119987, WO 2015/124769, WO 2015/158403, WO 2015/82571, WO 2017/216286 и WO 2017/67964, вместе демонстрирующие широкий спектр белков-носителей, которые успешно применялись в биоконъюгации).

В некоторых воплощениях белок-носитель модифицирован таким образом, чтобы белок был менее токсичным и/или более восприимчивым к гликозилированию. В конкретном воплощении белки носители, использованные в данном изобретении, модифицированы таким образом, что количество сайтов гликозилирования в белках носителях максимизировано таким образом, что позволяет вводить белки в более низких концентрациях, например, в иммуногенной композиции, особенно в форме их биоконъюгатов.

Так, в некоторых воплощениях белки носители, описанные в данном документе, модифицированы, чтобы включать на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более сайтов гликозилирования больше, чем обычно связано с белком-носителем (например, по сравнению с количеством сайтов гликозилирования, связанных с белком-носителем в его нативном/естественном состоянии, т.е. у "дикого типа"). Введение сайтов гликозилирования в белок-носитель может быть выполнено путем вставки консенсусной последовательности гликозилирования в любом месте первичной структуры белка, например, путем добавления новых аминокислот к первичной структуре белка, так что сайт гликозилирования добавляется полностью или частично, или путем мутации существующих аминокислот в белке для создания сайта гликозилирования. Обычный специалист в данной области техники поймет, что аминокислотная последовательность белка может быть легко модифицирована с использованием подходов, известных в данной области техники, например, рекомбинантных подходов, которые включают модификацию последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок. В конкретных воплощениях консенсусные последовательности гликозилирования вводят в определенные области белка-носителя, например, в поверхностные структуры белка, на N- или C-концах белка и/или в петли, которые стабилизируются дисульфидными мостиками в основании белка. В некоторых воплощениях консенсусная последовательность гликозилирования может быть продлена путем добавления остатков лизина для более эффективного гликозилирования.

Приведенные в качестве иллюстрации примеры консенсусных последовательностей гликозилирования, которые могут быть встроены или созданы в белке-носителе, включают Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой кроме Pro (SEQ ID NO: 1); и Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой аминокислоты кроме Pro (SEQ ID NO: 2).

В некоторых воплощениях гликозилированный полисахаридный антиген O4 *E.coli* ковалентно связан с остатком аспарагина (Asn) в сайте гликозилирования (например, связан с N), где остаток Asn присутствует в составе сайта гликозилирования, содержащего консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 1, более предпочтительно имеющую SEQ ID NO: 2. Как правило, белок-носитель содержит 1-10 сайтов гликозилирования, предпочтительно от 2 до 4 сайтов гликозилирования, наиболее предпочтительно 4 сайта гликозилирования, каждый из которых содержит консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 и наиболее предпочтительно аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

В конкретных воплощениях белок-носитель представляет собой обезвреженный экзотоксин А *P. aeruginosa* (ЕРА). В литературе описаны различные обезвреженные варианты ЕРА, и они могут применяться в качестве белков носителей. Например, обезвреживание может быть достигнуто за счет мутации и делеции важных для каталитической активности остатков, таких как L552V и ΔE553 согласно Lukas et al., 1988, Infect Immun, 56: 3095-3098, и Ho et al., 2006, Hum Vaccin, 2:89-98. В данном описании "ЕРА" относится к обезвреженному экзотоксину А из *P.aeruginosa*. В тех воплощениях, где белок-носитель представляет собой ЕРА, гликозилированный полисахаридный антиген O4 *E.coli* может быть ковалентно связан с остатком Asn в сайте гликозилирования, содержащем консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 1, и предпочтительно ковалентно связан с остатком Asn в сайте гликозилирования, содержащем консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 2. Предпочтительно, белок-носитель ЕРА содержит 1-10 сайтов гликозилирования, предпочтительно от 2 до 4 сайтов гликозилирования, наиболее предпочтительно 4 сайта гликозилирования, каждый из которых содержит консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 и, наиболее предпочтительно, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

В некоторых воплощениях белок-носитель ЕРА содержит четыре сайта гликозилирования, каждый из которых содержит консенсусную последовательность гликозилирования, например, сайт гликозили-

рования содержащий консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 2. Используемые в данном документе термины "белок-носитель ЕРА-4" и "ЕРА-4" относятся к белку-носителю, представляющему собой обезвреженный экзотоксин А из *P.aeruginosa*, содержащему четыре сайта гликозилирования, каждый из которых содержит консенсусные последовательности гликозилирования, имеющие SEQ ID NO: 2. Предпочтительным примером белка-носителя является белок-носитель ЕРА, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

Композиции.

В другом аспекте предложена композиция, содержащая биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli*, ковалентно связанного с белком-носителем. Композиции, предложенные в данном документе, могут включать любой биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli*, ковалентно связанный с белком-носителем (например, ЕРА), описанный в настоящем документе.

В некоторых воплощениях композиция представляет собой иммуногенную композицию. Используемый в данном документе термин "иммуногенная композиция" относится к композиции, которая может вызывать иммунный ответ у хозяина или субъекта, которому вводится композиция. Иммуногенные композиции могут дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых воплощениях композиция представляет собой фармацевтическую композицию, которая дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель. Термин "фармацевтически приемлемый носитель", используемый в данном документе, относится к разбавителю, адъюванту, эксципиенту или несущей среде, с которыми вводят композицию и которые являются нетоксичными и не должны влиять на эффективность активного ингредиента. Например, в качестве жидких носителей, в частности для инъекционных растворов, могут применяться солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина. Подходящие эксципиенты включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п. Другие примеры подходящих фармацевтически приемлемых носителей описаны в издании "Remington's Pharmaceutical Sciences" под редакцией E.W. Martin.

В одном воплощении композиция по изобретению содержит биоконъюгаты по изобретению в Трис-буферном солевом растворе (TBS) pH 7,4 (например, содержащем Tris, NaCl и KCl, например, 25 mM, 137 mM и 2,7 mM, соответственно). В других воплощениях композиции по изобретению содержат биоконъюгаты по изобретению в буфере $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ с концентрацией приблизительно 10 mM и pH приблизительно 7,0, содержащем приблизительно 5% (мас./об.) сорбита, приблизительно 10 mM метионина и приблизительно 0,02% (мас./об.) полисорбата 80. В других воплощениях композиции по изобретению содержат биоконъюгаты по изобретению в буфере $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ с концентрацией приблизительно 10 mM и pH приблизительно 7,0, содержащем приблизительно 8% (мас./об.) сахарозы, приблизительно 1 mM ЭДТА и приблизительно 0,02% (мас./об.) полисорбата 80 (см., например, WO 2018/077853 о подходящих буферах для биоконъюгатов O-антигенов *E.coli*, ковалентно связанных с белком-носителем ЕРА).

В некоторых воплощениях описанные композиции представляют собой одновалентные составы и содержат один полисахаридный O-антиген *E.coli*, например, в выделенной форме или в составе гликоконъюгата или биоконъюгата, такой как гликозилированный полисахаридный антиген O4 *E.coli*. Также предложены композиции (например, фармацевтические и/или иммуногенные композиции), которые являются поливалентными композициями, например, двухвалентными, трехвалентными, четырехвалентными и т.д. композициями. Например, поливалентная композиция содержит более чем один антиген, такой как O-антиген *E.coli*, его гликоконъюгат или биоконъюгат. В конкретных воплощениях предложенная поливалентная композиция содержит биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli* и по меньшей мере один дополнительный антиген.

В одном воплощении композиция (например, фармацевтическая композиция и/или иммуногенная композиция) представляет собой одновалентную композицию, содержащую биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli*, ковалентно связанный с белком-носителем, как описано в настоящем документе. В одном воплощении композиция (например, фармацевтическая композиция и/или иммуногенная композиция) представляет собой поливалентную композицию, содержащую гликозилированный полисахаридный антиген O4 *E.coli*, ковалентно связанный с белком-носителем, как описано в настоящем документе, и по меньшей мере один дополнительный антиген.

В некоторых воплощениях дополнительный антиген представляет собой сахаридный или полисахаридный антиген, более предпочтительно полисахаридный O-антиген *E.coli*, такой как O-антигены *E.coli* одного или нескольких серотипов из O1, O2, O6, O8, O15, O16, O18, O25 и O75 и их подсеротипов. В некоторых воплощениях каждый из дополнительных полисахаридных O-антигенов *E.coli* представляет собой гликоконъюгат, что означает, что полисахаридный O-антиген *E.coli* ковалентно связан с другим химическим веществом, например, белком, пептидом, липидом и т.д., наиболее предпочтительно, белком-носителем, например, химическим или ферментативным способом. В предпочтительных воплощениях каждый из дополнительных полисахаридных O-антигенов *E.coli* представляет собой биоконъюгат, в котором полисахаридный O-антиген ковалентно связан, например, с белком-носителем посредством гли-

козидной связи ферментативно посредством аппарата клетки-хозяина. В некоторых воплощениях композиции, предложенные в данном документе, могут содержать 1-20 дополнительных гликоконъюгатов, более предпочтительно биоконъюгатов полисахаридных О-антигенов *E.coli*, таких как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 дополнительных гликоконъюгатов или предпочтительно биоконъюгатов полисахаридных О-антигенов *E.coli*. В композиции, предложенные в данном документе, могут быть включены другие антигены, такие как пептидные, белковые или липидные антигены и т. д.

В некоторых воплощениях композиция (например, фармацевтическая и/или иммуногенная композиция) содержит биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli* и по меньшей мере один дополнительный полисахаридный антиген, выбранный из группы, состоящей из полисахаридного антигена O1A *E.coli*, полисахаридного антигена O2 *E.coli*, полисахаридного антигена O6A *E.coli*, полисахаридного антигена O8 *E.coli*, полисахаридного антигена O15 *E.coli*, полисахаридного антигена O16 *E.coli*, полисахаридного антигена O18 *E.coli*, полисахаридного антигена O25B *E.coli* и полисахаридного антигена O75 *E.coli*. Предпочтительно каждый из дополнительных полисахаридных О-антигенов ковалентно связан с белком-носителем и более предпочтительно является биоконъюгатом. В одном воплощении полисахаридный антиген O1A (например, в выделенной форме или в составе гликоконъюгата или биоконъюгата) используется в предложенной композиции (например, в комбинации с гликозилированным полисахаридным О-антигеном O4 или его биоконъюгатом). В конкретном воплощении полисахаридный антиген O1A содержит структуру формулы (O1A), как показано в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Предпочтительно полисахаридный антиген O1A является частью биоконъюгата и ковалентно связан с белком-носителем, например ЕРА.

В одном воплощении полисахаридный антиген O2 (например, в выделенной форме или в составе гликоконъюгата или биоконъюгата) используется в предложенной композиции (например, в комбинации с гликозилированным полисахаридным антигеном O4 или его биоконъюгатом). В конкретном воплощении полисахаридный антиген O2 содержит структуру формулы (O2), как показано в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Предпочтительно полисахаридный антиген O2 является частью биоконъюгата и ковалентно связан с белком-носителем, например ЕРА.

В одном воплощении полисахаридный антиген O6A (например, в выделенной форме или в составе гликоконъюгата или биоконъюгата) используется в предложенной композиции (например, в комбинации с гликозилированным полисахаридным антигеном O4 или его биоконъюгатом). В конкретном воплощении полисахаридный антиген O6A содержит структуру формулы (O6A), как показано в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Предпочтительно полисахаридный антиген O6A является частью биоконъюгата и ковалентно связан с белком-носителем, например ЕРА.

В одном воплощении полисахаридный антиген O8 (например, в выделенной форме или в составе гликоконъюгата или биоконъюгата) используется в предложенной композиции (например, в комбинации с гликозилированным полисахаридным антигеном O4 или его биоконъюгатом). В конкретном воплощении полисахаридный антиген O8 содержит структуру формулы (O8), как показано в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Предпочтительно полисахаридный антиген O8 является частью биоконъюгата и ковалентно связан с белком-носителем, например ЕРА.

В одном воплощении полисахаридный антиген O15 (например, в выделенной форме или в составе гликоконъюгата или биоконъюгата) используется в предложенной композиции (например, в комбинации с гликозилированным полисахаридным антигеном O4 или его биоконъюгатом). В конкретном воплощении полисахаридный антиген O15 содержит структуру формулы (O15), как показано в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Предпочтительно полисахаридный антиген O15 является частью биоконъюгата и ковалентно связан с белком-носителем, например ЕРА.

В одном воплощении полисахаридный антиген O16 (например, в выделенной форме или в составе гликоконъюгата или биоконъюгата) используется в предложенной композиции (например, в комбинации с гликозилированным полисахаридным антигеном O4 или его биоконъюгатом). В конкретном воплощении полисахаридный антиген O16 содержит структуру формулы (O16), как показано в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Предпочтительно полисахаридный антиген O16 является частью биоконъюгата и ковалентно связан с белком-носителем, например ЕРА.

В одном воплощении полисахаридный антиген O18A (например, в выделенной форме или в составе гликоконъюгата или биоконъюгата) используется в предложенной композиции (например, в комбинации с гликозилированным полисахаридным антигеном O4 или его биоконъюгатом). В конкретном воплощении полисахаридный антиген O18A содержит структуру формулы (O18A), как показано в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Предпочтительно полисахаридный антиген O18A является частью био-

конъюгата и ковалентно связан с белком-носителем, например ЕРА.

В одном воплощении полисахаридный антиген О25В (например, в выделенной форме или в составе гликоконъюгата или биоконъюгата) используется в предложенной композиции (например, в комбинации с гликозилированным полисахаридным антигеном О4 или его биоконъюгатом). В конкретном воплощении полисахаридный антиген О25В содержит структуру формулы (О25В), как показано в табл. 1, где *n* представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Предпочтительно полисахаридный антиген О25В является частью биоконъюгата и ковалентно связан с белком-носителем, например ЕРА.

В одном воплощении полисахаридный антиген О75 (например, в выделенной форме или в составе гликоконъюгата или биоконъюгата) используется в предложенной композиции (например, в комбинации с гликозилированным полисахаридным антигеном О4 или его биоконъюгатом). В конкретном воплощении полисахаридный антиген О75 содержит структуру формулы (О75), как показано в табл. 1, где *n* представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Предпочтительно полисахаридный антиген О75 является частью биоконъюгата и ковалентно связан с белком-носителем, например ЕРА.

В другом воплощении композиция (например, фармацевтическая и/или иммуногенная композиция) содержит по меньшей мере полисахаридные антигены О1А, О2, гликозилированный О4, О6А и О25В *E.coli*, предпочтительно биоконъюгаты полисахаридных антигенов О1А, О2, гликозилированного О4, О6А и О25В, ковалентно связанных с белком-носителем (например, пентавалентная композиция). В предпочтительном воплощении композиция (например, фармацевтическая и/или иммуногенная композиция) содержит по меньшей мере полисахаридные антигены О1А, О2, гликозилированный О4, О6А, О8, О15, О16, О25В и О75 *E.coli*, предпочтительно биоконъюгаты полисахаридных антигенов О1А, О2, гликозилированного О4, О6А, О8, О15, О16, О25В и О75, ковалентно связанных с белком-носителем (например, 9-валентная композиция).

В другом предпочтительном воплощении композиция (например, фармацевтическая и/или иммуногенная композиция) содержит по меньшей мере полисахаридные антигены О1А, О2, гликозилированный О4, О6А, О8, О15, О16, О18А, О25В и О75 *E.coli*, предпочтительно биоконъюгаты полисахаридных антигенов О1А, О2, гликозилированного О4, О6А, О8, О15, О16, О18А, О25В и О75, ковалентно связанных с белком-носителем (например, 10-валентная композиция).

В настоящем документе также рассматриваются композиции, которые возможно дополнительно содержат дополнительные О-антигены (например, в выделенной форме или являющиеся частью гликоконъюгата или биоконъюгата) *E.coli* других серотипов.

В некоторых воплощениях каждый дополнительный полисахаридный антиген О1А, О2, О6А, О8, О15, О16, О18А, О25В и/или О75 *E.coli* ковалентно связан с белком-носителем. Полисахаридный О-антиген может быть связан с белком-носителем химическими или другими способами синтеза, или полисахаридный О-антиген может быть частью биоконъюгата и предпочтительно является частью биоконъюгата. Можно применять любой подходящий с учетом данного описания белок-носитель, известный специалистам в области техники. Подходящие носители включают обезвреженный экзотоксин А *P.aeruginosa* (ЕРА), флагеллин *E.coli* (FliC), CRM 197, мальтозосвязывающий белок (MBP), дифтерийный анатоксин, столбнячный анатоксин, обезвреженный гемолизин А *S.aureus*, агглютинирующий фактор А, агглютинирующий фактор В, термолабильный энтеротоксин *E.coli*, обезвреженные варианты термолабильного энтеротоксина *E.coli*, субъединицу В холерного токсина (СТВ), холерный токсин, обезвреженные варианты холерного токсина, белок Sat *E.coli*, пассажирский домен белка Sat *E.coli*, пневмолизин *Streptococcus pneumoniae*, гемоцианин *Megathura crenulata* (KLH), PcrV *P.aeruginosa*, белок внешней мембраны *Neisseria meningitidis* (OMPС) и белок D из нетипируемого *Haemophilus influenzae*, но не ограничиваются перечисленным. Предпочтительно, белок-носитель представляет собой ЕРА.

В некоторых воплощениях каждый из дополнительных полисахаридных антигенов *E.coli* О1А, О2, О6А, О8, О15, О16, О18А, О25В и/или О75, особенно когда он является частью биоконъюгата, ковалентно связан с остатком аспарагина (Asn) в белке-носителе, где остаток Asn присутствует в сайте гликозилирования, содержащем консенсусную последовательность гликозилирования Asn-X-Ser (Thr), где X может быть любой аминокислотой, кроме Pro (SEQ ID NO: 1), предпочтительно где остаток Asn присутствует в сайте гликозилирования, содержащем консенсусную последовательность гликозилирования Asp (Glu)-X-Asn-Z-Ser (Thr), где X и Z независимо выбраны из любой аминокислоты, кроме Pro (SEQ ID NO: 2). Белок-носитель может содержать 1-10 сайтов гликозилирования, предпочтительно от 2 до 4 сайтов гликозилирования, наиболее предпочтительно 4 сайта гликозилирования, каждый из которых содержит консенсусную последовательность гликозилирования. В конкретном воплощении белок-носитель представляет собой белок-носитель ЕРА-4, например белок-носитель ЕРА-4, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

В конкретном воплощении предложена композиция (например, фармацевтическая и/или иммуногенная композиция), содержащая: (1) биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена О4 *E.coli*, ковалентно связанного с белком-носителем обезвреженным экзотоксином А *P.aeruginosa*, содержащим SEQ ID NO: 3 (белок-носитель ЕРА-4), где гликозилированный полисахаридный антиген О4

E.coli содержит структуру Формулы (O4-Glc+); (2) биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O1A *E.coli*, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА-4, где полисахаридный антиген O1A *E.coli* содержит структуру Формулы (O1A); (3) биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O2 *E.coli*, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА-4, где полисахаридный антиген O2 *E.coli* содержит структуру Формулы (O2); (4) биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O6A *E.coli*, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА-4, где полисахаридный антиген O6A *E.coli* содержит структуру Формулы (O6A); (5) биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O8 *E.coli*, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА-4, где полисахаридный антиген O8 *E.coli* содержит структуру Формулы (O8); (6) биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O15 *E.coli*, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА-4, где полисахаридный антиген O15 *E.coli* содержит структуру Формулы (O15); (7) биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O16 *E.coli*, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА-4, где полисахаридный антиген O16 *E.coli* содержит структуру Формулы (O16); (8) биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O25B *E.coli*, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА-4, где полисахаридный антиген O25B *E.coli* содержит структуру Формулы (O25B) и (9) биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O75 *E.coli*, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА-4, где полисахаридный антиген O75 *E.coli* содержит структуру Формулы (O75), где каждая из Формул приведена в табл. 1, и независимо для каждой из формул n представляет собой целое число от 1 до 100, например, от 1 до 50, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40. В конкретном воплощении указанная композиция (например, фармацевтическая и/или иммуногенная композиция) дополнительно содержит: (10) биоконъюгат полисахаридного антигена O18A *E.coli*, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА-4, где полисахаридный антиген O18A *E.coli* содержит структуру формулы (O18A), приведенную в табл. 1, где n в данной структуре представляет собой целое число от 1 до 100, например, от 1 до 50, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40.

В некоторых воплощениях предложенная композиция содержит биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli* и по меньшей мере биоконъюгат полисахаридного антигена O25B *E.coli*, где биоконъюгат антигена O25B *E.coli* присутствует в композиции в концентрации, которая приблизительно в 1,5-6 раз, например, в 2-4 раза выше, например, в 1,5, 2, 3, 4, 5 или 6 раз выше, чем концентрация любого другого биоконъюгата, присутствующего в композиции.

В конкретных воплощениях композиция содержит биоконъюгаты полисахаридных антигенов O1A, O2, гликозилированного O4, O6A, O8, O15, O16, O25B и O75 *E.coli*, причем биоконъюгаты O1A:O2: гликозилированного O4:O6A:O8:O15:O16:O25B:O75 присутствуют в соотношении (по массе полисахаридов O-антигенов) 1:1:1:1:1:1:2:1 или 2:1:1:2:1:1:1:4:1.

В конкретных воплощениях композиция содержит биоконъюгаты полисахаридных антигенов O1A, O2, гликозилированного O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75 *E.coli*, причем биоконъюгаты O1A:O2: гликозилированного O4:O6A:O8:O15:O16:O18A:O25B:O75 присутствуют в соотношении (по массе полисахаридов O-антигенов) 1:1:1:1:1:1:1:2:1 или 2:1:1:2:1:1:1:1:4:1. В некоторых воплощениях предложенная композиция содержит биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli* и по меньшей мере биоконъюгат полисахаридного антигена O25B *E.coli*, где биоконъюгат антигена O25B *E.coli* присутствует в композиции в концентрации от 2 до 50 мкг/мл, предпочтительно от 8 до 40 мкг/мл, более предпочтительно от 16 до 32 мкг/мл, такой как 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 или 32 мкг/мл. В таких воплощениях концентрация биоконъюгата полисахаридного антигена O25B *E.coli* предпочтительно приблизительно в 1,5-6 раз, например, в 2-4 раза выше, например, в 1,5, 2, 3, 4, 5 или 6 раз выше, чем концентрация любого другого биоконъюгата, присутствующего в композиции.

В некоторых воплощениях композиции, описанные в данном документе (например, фармацевтические и/или иммуногенные композиции) содержат или вводятся в комбинации с адъювантом. Адъювант для введения в комбинации с композицией, описанной в данном документе, может вводиться до (например, за 72, 48, 24, 12, 6, 2, 1 ч, 10 мин), одновременно или после (например, через 72, 48, 24, 12, 6, 2, 1 ч, 10 мин) введения указанной композиции. В данном документе термин "адъювант" относится к соединению, которое при введении в сочетании или в составе композиции, описанной в данном документе, усиливает и/или повышает иммунный ответ на полисахаридный O-антиген *E.coli* в составе биоконъюгата, однако, когда вводят только адъювантное соединение, иммунный ответ на полисахаридный O-антиген *E.coli* в составе биоконъюгата не вырабатывается. В некоторых воплощениях адъювант усиливает иммунный ответ на полисахаридный O-антиген *E.coli* в составе его биоконъюгата и не вызывает аллергии или иной нежелательной реакции. Усиление иммунного ответа адъювантами может быть опосредовано несколькими механизмами, включая, например, рекрутирование лимфоцитов, стимулирование В и/или Т клеток или стимулирование макрофагов. Примеры подходящих адъювантов включают соли алюминия (квасцы) (такие как гидроксид алюминия, фосфат алюминия, сульфат алюминия и оксид алюминия, включая наночастицы, содержащие квасцы или составы с наноалюминием), фосфат кальция, монофосфорилипид А (MPL) или 3-де-О-ацилированный монофосфорилипид А (3D-MPL) (см., например, патент Великобритании GB 2220211, EP 0971739, EP 1194166, US 6491919), AS01, AS02, AS03 и AS04 (все GlaxoSmithKline; см., например, EP 1126876, US 7357936 для AS04, EP 0671948, EP 0761231, US 5750110

для AS02), MF59 (Novartis), имидазопиридиновые соединения (см. WO 2007/109812), соединения имидазохиноксалина (см. WO 2007/109813), дельта-инулин, STING-активирующие синтетические циклические динуклеотиды (например, US20150056224), комбинации лецитина и гомополимеров карбомера (например, US 6676958) и сапонины, такие как QuilA и QS21 (см., например, Zhu D and W Tuo, 2016, Nat Prod Chem Res 3: e113 (doi:10.4172/2329-6836.1000e113), Matrix M, Iscoms, Iscomatrix ит.д., возможно, в комбинации в QS7 (см. Kensil et al., in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); патент US № 5057540), но не ограничиваются перечисленным. В некоторых воплощениях адъювант представляет собой адъювант Фрейнда (полный или неполный). Другие адъюванты представляют собой эмульсии масло-в-воде (такие как сквален или арахисовое масло), возможно в комбинации с иммуностимуляторами, такими как монофосфорил липид А (см. Stoute et al., N. Engl. J. Med. 336, 86-91 (1997)). Другим адъювантом является CpG (Bioworld Today, Nov. 15, 1998). Другими примерами адъювантов являются липосомы, содержащие иммуностимуляторы, такие как MPL и QS21, такие как AS01E и AS01B (например, US 2011/0206758). Другими примерами адъювантов являются CpG (Bioworld Today, 15 ноября 1998 г.) и имидазохинолины (такие как имиквимод и R848). См., например, Reed G, et al., 2013, Nature Med, 19: 1597-1608. В некоторых воплощениях адъювант содержит агонист толл-подобного рецептора 4 (TLR4). Агонисты TLR4 хорошо известны в данной области техники, см., например, Ireton GC and SG Reed, 2013, Expert Rev Vaccines 12: 793-807. В некоторых воплощениях адъювант содержит агонист TLR4, содержащий липид А или его аналог или производное, такие как MPL, 3D-MPL, RC529 (например, EP1385541), PET-липид А, GLA (адъювант гликопиранозил липид, синтетический дисахаридный гликолипид; например, US 20100310602, US 8722064), SLA (например, Carter D et al, 2016, Clin Transl Immunology 5: e108 (doi: 10.1038/cti.2016.63), где описан структурно-функциональный подход для оптимизации лигандов TLR4 для человеческих вакцин), PHAD (фосфорилированный гексаацил-дисахарид), 3D-PHAD (структура которого является такой же, как у GLA), 3D-(6-ацил)-PHAD (3D(6A)-PHAD) (PHAD, 3D-PHAD и 3D(6A)PHAD являются синтетическими вариантами липида А, см., например, avantilipids.com/divisions/adjuvants, где также приведены структуры этих молекул), E6020 (номер CAS 287180-63-6), ONO4007, OM-174 и тому подобное. В некоторых воплощениях композиции, описанные в данном документе не содержат адъювант и не вводятся в комбинации с адъювантом.

В некоторых воплощениях композиции, описанные в данном документе, составлены, чтобы быть подходящими для предполагаемого способа введения субъекту. Например, композиции (например, фармацевтические и/или иммуногенные), описанные в данном документе, могут быть составлены для подкожного, парентерального, перорального, подязычного, буккального, внутрикожного, чрескожного, колоректального, внутривенного, ректального введения, интраназального, интратрахеального, внутримышечного, местного, трансдермального или интрадермального введения. В конкретном воплощении предложенная композиция (например, фармацевтическая и/или иммуногенная) составлена для внутримышечной инъекции.

Способы применения.

Биоконъюгаты и композиции, предложенные в данном документе, могут применяться для индукции у субъекта антител против гликозилированного антигена O4 E.coli и для вакцинации субъекта против E.coli, в частности, внекишечной патогенной E.coli (ExPEC). В данном описании "субъект" означает любого животного, предпочтительно, млекопитающего, которому будет или был введен биоконъюгат или композиция, предложенные в данном документе. Термин "млекопитающее", используемый в данном документе, охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, без ограничения, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, приматов, не являющихся людьми, таких как обезьяны, или человекообразных обезьян, людей и т.д. В некоторых воплощениях субъектом является человек. Человек может быть любого возраста. В некоторых воплощениях субъектом является человек в возрасте от примерно двух месяцев до примерно 18 лет, например от 1 года до 18 лет. В некоторых воплощениях субъектом является человек в возрасте по меньшей мере 18 лет. В некоторых воплощениях субъектом является человек в возрасте от 15 до 50 лет, например от 18 до 40 лет, например от 20 до 45 лет. В некоторых воплощениях субъектом является человек мужского пола. В некоторых воплощениях субъектом является человек женского пола. В некоторых воплощениях у субъекта ослаблен иммунитет. В некоторых воплощениях субъектом является человек в возрасте по меньшей мере 50 лет, по меньшей мере 55 лет, по меньшей мере 60 лет, по меньшей мере 65 лет. В некоторых воплощениях субъектом является человек не старше 100 лет, не старше 95 лет, не старше 90 лет, не старше 85 лет, не старше 80 лет или не старше 75 лет. В некоторых воплощениях субъектом является человек в возрасте по меньшей мере 60 лет и не старше 85 лет. В некоторых воплощениях субъектом является человек в стабильном состоянии здоровья. В некоторых воплощениях субъектом является человек в стабильном состоянии здоровья в возрасте по меньшей мере 60 лет и не старше 85 лет. В некоторых воплощениях субъект представляет собой человека, у которого в анамнезе была инфекция мочевыводящих путей (ИМП), т.е. бактериальная инфекция в уретре, мочевом пузыре, мочеточниках и/или почках), то есть имевший по меньшей мере один эпизод ИМП в его или ее жизни. В некоторых воплощениях субъект представляет собой человека, имевшего в анамнезе ИМП в течение последних двадцати, пятнадцати,

двенадцати, десяти, девяти, восьми, семи, шести, пяти, четырех, трех, двух лет или одного года. В некоторых воплощениях субъект представляет собой человека, имевшего в анамнезе ИМП в течение последних двух лет. В некоторых воплощениях субъект представляет собой человека, имевшего в анамнезе рецидивирующие ИМП, т.е. перенес по меньшей мере две ИМП в течение шести месяцев или по меньшей мере три ИМП в течение года. В некоторых воплощениях субъект представляет собой человека, имевшего в анамнезе ИМП в течение последних двух лет. В некоторых воплощениях субъектом является человек в стабильном состоянии здоровья в возрасте 60 лет или старше. В некоторых воплощениях субъект представляет собой человека в возрасте 60 лет или старше, имевшего в анамнезе ИМП в течение последних двух лет. В некоторых воплощениях субъект представляет собой человека в возрасте 60 лет и младше 75 лет, имевшего в анамнезе ИМП в течение последних двух лет. В некоторых воплощениях субъект представляет собой человека в возрасте 75 лет или старше, имевшего в анамнезе ИМП в течение последних двух лет. В некоторых воплощениях субъект представляет собой пациента, которому запланированы плановые урогенитальные и/или абдоминальные процедуры или операции, например, трансректальная пункционная биопсия предстательной железы под контролем УЗИ (TRUS-PNB).

В одном аспекте предложен способ индукции у субъекта антител против гликозилированного антигена O4 E.coli, включающий введение субъекту любого из биоконъюгатов гликозилированного антигена O4 E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем, описанным в настоящем документе, или композиции, содержащей биоконъюгат гликозилированного антигена O4 E.coli, ковалентно связанный с белком, отдельно или в комбинации с другими полисахаридными O-антигенами E.coli или их гликоконъюгатами или биоконъюгатами.

В некоторых воплощениях антитела индуцированные, вызванные или выявленные против гликозилированного антигена O4 E.coli, обладают опсонофагоцитарной активностью. В конкретных воплощениях индуцированные, вызванные или выявленные антитела представляют собой перекрестно-реагирующие антитела, способные опосредовать опсонофагоцитарное уничтожение штаммов E.coli как с гликозилированным, так и с негликозилированным O4.

В некоторых воплощениях антитела индуцированные, вызванные или выявленные против гликозилированного антигена O4 E.coli специфически распознают немодифицированный и модифицированный глюкозой полисахаридный антиген O4. В некоторых воплощениях антитела индуцированные, вызванные или выявленные против гликозилированного антигена O4 E.coli, специфически распознают E.coli серотипа O4. В некоторых воплощениях антитела индуцированные, вызванные или выявленные против гликозилированного антигена O4 E.coli, предпочтительно связываются с гликозилированным антигеном O4 по сравнению с негликозилированным антигеном O4. Антитела, индуцированные биоконъюгатами и композициями, описанными в данном документе, могут включать молекулы иммуноглобулина и иммунологически активные части молекул иммуноглобулина, то есть молекулы, которые содержат антиген-связывающий сайт, который специфически связывается с полисахаридным O-антигеном E.coli, например гликозилированным полисахаридным антигеном O4. Антитела, индуцированные, вызванные или выявленные с применением биоконъюгатов или композиций, предложенных в настоящем документе, можно применять для мониторинга эффективности терапии и/или прогрессирования заболевания. Для этой цели можно использовать любую систему иммуноанализа, известную в данной области, включая конкурентные и неконкурентные системы анализа с использованием таких методов, как радиоиммуноанализ, ELSA (иммуноферментный анализ), иммуноанализы на основе электрохемиллюминесценции (ECL), иммуноанализы типа "сэндвич", реакции преципитации, реакции преципитации с диффузией в геле, иммунодиффузионные тесты, иммунорадиометрические тесты, флуоресцентные иммуноанализы, иммуноанализы с белком А и иммуноэлектрофоретические тесты, но не ограничиваясь перечисленным. Некоторые из этих анализов, например, иммуноанализы на основе ECL можно проводить в мультиплексном формате, и обычно мультиплексные форматы анализа предпочтительны.

Антитела, индуцированные, вызванные или выявленные с применением биоконъюгата гликозилированного полисахаридного антигена O4 E.coli, могут применяться для обнаружения штаммов E.coli O4, в частности, штаммов с гликозилированным O4, например, среди множества штаммов E.coli и/или для диагностики инфекции, вызванной штаммом E.coli с O4 или гликозилированным O4.

В другом аспекте в настоящем документе предложен способ вакцинации субъекта против E.coli (например, внекишечной патогенной E.coli, ExPEC), включающий введение субъекту любого из биоконъюгатов гликозилированного антигена O4 E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем, описанный в данном документе, или композиция, содержащая биоконъюгат гликозилированного антигена O4 E.coli, ковалентно связанный с белком-носителем, отдельно или в комбинации с другими O-антигенами E.coli или их гликоконъюгатами или биоконъюгатами. Специалист в данной области поймет, что субъект будет вакцинирован против штаммов E.coli, чьи O-антигены или их гликоконъюгаты или биоконъюгаты присутствуют в вводимой композиции. Например, введение композиции, содержащей полисахаридные антигены O1A, O2, гликозилированный O4, O6A и O25B, можно использовать для вакцинации субъекта против E.coli серотипов O1A, O2, O4, O6A и O25B. В некоторых воплощениях вакцинация предназначена для предотвращения инвазивного заболевания ExPEC (IED), например, уросепсиса, бактериемии, сепсиса и т. д. В некоторых воплощениях вакцинация предназначена для предотвращения или уменьшения

возникновения или тяжести инфекций мочевыводящих путей. В некоторых вариантах реализации IED может быть приобретено в больнице, например, у пациентов, которым проводят урогенитальные и/или абдоминальные процедуры или операции. В некоторых воплощениях IED может быть связано с медицинской помощью, например, у пациентов, получающих медицинскую помощь при другом заболевании, например, через центральные катетеры и т. д., например, в больнице, амбулаторном хирургическом центре, отделении терминальной стадии почечной недостаточности, учреждении длительного ухода и т. д. В некоторых вариантах реализации IED может быть внебольничного происхождения, например, у пациента, который в последнее время не подвергался рискам для здоровья.

В другом аспекте предложен способ индукции у субъекта иммунного ответа против *E.coli* (например, ExPEC), включающий введение субъекту любого из биоконъюгатов гликозилированного антигена O4 *E.coli*, ковалентно связанных с белком-носителем, описанных в данном документе, или композиции, содержащей биоконъюгат гликозилированного антигена O4 *E.coli*, ковалентно связанный с белком-носителем, отдельно или в комбинации с другими O-антигенами *E.coli* или их гликоконъюгатами или биоконъюгатами. В одном воплощении во время введения у субъекта имеется инфекция, вызванная *E.coli* (например, ExPEC). В предпочтительном воплощении во время введения у субъекта отсутствует инфекция, вызванная *E.coli* (например, ExPEC).

В некоторых воплощениях описанные композиции и биоконъюгаты можно вводить субъекту для индукции иммунного ответа, который включает выработку антител, предпочтительно антител, обладающих опсонофагоцитарной активностью. Такие антитела можно выделять способами, известными специалисту в данной области техники (например, иммуноаффинной хроматографией, центрифугированием, преципитацией и т. д.).

Способность биоконъюгатов и композиций, описанных в данном документе, вызывать иммунный ответ у субъекта можно оценивать с применением любого подхода, известного специалистам в области техники или описанного в данном документе. В некоторых воплощениях способность биоконъюгата вызывать иммунный ответ у субъекта можно оценивать посредством иммунизации субъекта (например, мыши, крысы, кролика или обезьяны) или ряда субъектов биоконъюгатом, описанным в данном документе, а также иммунизации дополнительного субъекта (например, мыши, крысы, кролика или обезьяны) или ряда субъектов контролем (PBS). Субъекта или ряд субъектов можно впоследствии инфицировать ExPEC и определять способность ExPEC вызывать заболевание (например, ИМП, бактериемию или другое заболевание) у субъекта или ряда субъектов. Специалистам в области техники понятно, что, если субъект или ряд субъектов, иммунизированных контролем, страдают от заболевания после инфицирования ExPEC, а субъект или ряд субъектов, иммунизированных биоконъюгатом(ами) или его композицией, описанными в данном документе, страдают меньше или не страдают заболеванием, биоконъюгат способен вызывать у субъекта иммунный ответ. Способность биоконъюгата(ов) или его (их) композиции, описанных в данном документе, вызывать образование антисыворотки, перекрестно реагирующей с O-антигеном ExPEC, можно исследовать, например, при помощи иммунологического анализа, такого как ELISA (см., например, Van den Dobbelsteen et al, 2016, *Vaccine* 34: 4152-4160) или иммуноанализа на основе ECL (электрохемилюминесценции). Например, способность биоконъюгатов, описанных в данном документе, вызывать иммунный ответ у субъекта можно оценивать с применением сывороточного бактерицидного теста (SBA) или опсонофагоцитарного теста (ОРК или ОРКА), который представляет собой зарекомендовавший себя и общепринятый способ, используемый для получения разрешения на применение вакцин на основе гликоконъюгатов. Такие тесты хорошо известны в области техники и, вкратце, включают стадии выработки и выделения антител против мишени, представляющей интерес (например, полисахаридного O-антигена *E.coli*, например, гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli*), посредством введения субъекту (например, мыши, крысе, кролику или обезьяне) соединения, вызывающего выработку таких антител. Впоследствии можно оценивать бактерицидную способность антител, например, посредством культивирования бактерий, о которых идет речь (например, *E.coli* соответствующего серотипа), в присутствии указанных антител и комплемента и, в зависимости от теста, нейтрофилов и оценивать способность антител опосредовать гибель и/или нейтрализацию бактерий, например, используя стандартные микробиологические подходы. Пример анализа ОРК для биоконъюгированных вакцин против *E.coli* приведен, например, Abbanat et al, 2017, *Clin. Vaccine Immunol.* 24: e00123-17. Анализ ОРК можно проводить в моноплексном или мультиплексном формате, из которых обычно предпочтительнее мультиплексный формат (например, тестирование нескольких серотипов одновременно). Мультиплексный анализ ОРК в данном документе иногда обозначают "МОРА".

В некоторых воплощениях описанные способы включают введение эффективного количества биоконъюгатов гликозилированного антигена O4 *E.coli*, ковалентно связанных с белком-носителем, описанных в данном документе, или композиции, содержащей биоконъюгат гликозилированного антигена O4 *E.coli*, ковалентно связанный с белком-носителем, отдельно или в комбинации с другими O-антигенами *E.coli* или их гликоконъюгатами или биоконъюгатами. В одном воплощении "эффективное количество" представляет собой количество, которое вакцинирует субъекта против *E.coli* (например, ExPEC). В другом воплощении "эффективное количество" представляет собой количество, которое вызывает у субъекта иммунный ответ против *E.coli* (например, ExPEC), такой как иммунный ответ, включающий выработку

ку антител, предпочтительно антител, обладающих опсонофагоцитарной активностью.

В конкретных воплощениях, где предложенная композиция содержит биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 E.coli и по меньшей мере биоконъюгат полисахаридного антигена O25B E.coli, эффективное количество полисахаридного антигена O25B E.coli приблизительно в 1,5-6 раз, например, приблизительно в 2-4 раза выше, например, в 1,5, 2, 3, 4, 5 или 6 раз выше, чем концентрация любого другого биоконъюгата, присутствующего в композиции. В таких воплощениях эффективное количество полисахаридного антигена O25B E.coli составляет, например, примерно от 5 до 18 мкг на введение, например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 мкг на введение.

В некоторых воплощениях биоконъюгат или композицию по изобретению вводят субъекту однократно. В некоторых воплощениях биоконъюгат или композицию по изобретению вводят субъекту более одного раза, например, в режиме прайм-буст. В некоторых воплощениях время между двумя введениями составляет по меньшей мере две недели, по меньшей мере один месяц, по меньшей мере два месяца, по меньшей мере три месяца, по меньшей мере шесть месяцев, по меньшей мере один год, по меньшей мере два года, по меньшей мере пять лет, по меньшей мере десять лет или по меньшей мере пятнадцать лет. У людей желаемый иммунный ответ обычно может быть вызван однократным введением биоконъюгата или композиции по изобретению. В некоторых воплощениях предусмотрено повторное введение, например, через десять лет.

Клетки-хозяева.

В настоящем документе предложены клетки-хозяева, например прокариотические клетки-хозяева, способные продуцировать O-антигены E.coli и биоконъюгаты, содержащие такие O-антигены E.coli. Предложенные клетки-хозяева предпочтительно модифицированы таким образом (например, посредством генной инженерии), чтобы содержать одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих аппарат клетки-хозяина (например, гликозилтрансферазы), используемые для получения полисахаридных O-антигенов E.coli и/или их биоконъюгатов.

Для получения полисахаридных O-антигенов E.coli, описанных в данном документе (например, гликозилированного полисахаридного антигена O4 E.coli) и биоконъюгатов, содержащих полисахаридные O-антигены E.coli, описанных в данном документе (например, биоконъюгата гликозилированного полисахаридного антигена O4 E.coli) могут применяться любые клетки-хозяева, известные специалистам в данной области, включая археобактерии, прокариотические клетки-хозяева и эукариотические клетки-хозяева. В предпочтительном воплощении клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку-хозяина. Примеры прокариотических клеток-хозяев для применения в продукции полисахаридных O-антигенов E.coli, описанных в данном документе, и биоконъюгатов, содержащих описанные здесь полисахаридные O-антигены E.coli, включают 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, но не ограничиваются ими. В конкретном воплощении клетка-хозяин, используемая для продуцирования полисахаридных O-антигенов E.coli, описанных в данном документе, и биоконъюгатов, содержащих описанные здесь полисахаридные O-антигены E.coli, является прокариотической клеткой-хозяином и предпочтительно представляет собой E.coli. В некоторых воплощениях клетки-хозяева, используемые для получения полисахаридных O-антигенов E.coli и биоконъюгатов, описанных в настоящем документе, сконструированы таким образом, чтобы они содержали гетерологичные нуклеиновые кислоты, например, гетерологичные нуклеиновые кислоты, содержащие генные кластеры gfb желаемого серотипа O-антигена, гетерологичные нуклеиновые кислоты, которые кодируют один или несколько белков-носителей и/или гликозилтрансфераз. В конкретном воплощении в клетки-хозяева, описанные в данном документе, могут быть введены гетерологичные гены gfb и/или гетерологичные нуклеиновые кислоты, которые кодируют белки, участвующие в путях гликозилирования (например, в путях прокариотического и/или эукариотического гликозилирования). Такие нуклеиновые кислоты могут кодировать белки, включающие олигосахарилтрансферазы и/или гликозилтрансферазы, но не ограничивающиеся ими. В данном документе описаны последовательности различных генов и генных кластеров, кодирующих гликозилтрансферазы, которые могут найти применение в получении рекомбинантных клеток-хозяев, которые могут, например, использоваться для получения полисахаридных O-антигенов E.coli и их биоконъюгатов. Специалистам в данной области понятно, что из-за вырожденности генетического кода белок, имеющий конкретную аминокислотную последовательность, может кодироваться множеством различных нуклеиновых кислот. Таким образом, специалистам в данной области понятно, что нуклеиновая кислота, предложенная в данном документе, может быть изменена таким образом, что ее последовательность будет отличаться от последовательности, представленной в настоящем документе, без влияния на аминокислотную последовательность белка, кодируемого нуклеиновой кислотой. В настоящем документе предложены клетки-хозяева (например, рекомбинантные клетки-хозяева) для продуцирования биоконъюгата гликозилированного полисахаридного антигена O4 E.coli, полисахаридного антигена O1A, полисахаридного антигена O2, полисахаридного антигена O6A, полисахаридного антигена O8, полисахаридного антигена O15, полисахаридного антигена O16, полисахаридного антигена O18A, полисахаридного антигена O25B или полисахаридного антигена O75. Предложенные клетки-хозяева содер-

жат нуклеиновые кислоты, кодирующие ферменты (например, гликозилтрансферазы), способные продуцировать полисахаридный O-антиген *E.coli*. Клетки-хозяева, предложенные в данном документе, могут естественным образом экспрессировать нуклеиновые кислоты, которые способны продуцировать интересующий O-антиген, или можно сделать клетки-хозяева, экспрессирующие такие нуклеиновые кислоты. В некоторых воплощениях нуклеиновые кислоты являются гетерологичными для клеток-хозяев и вводятся в клетки-хозяева с использованием генетических подходов, известных в данной области. Например, нуклеиновые кислоты могут быть введены в клетку-хозяина путем генетической манипуляции (например, генный кластер экспрессируется на плазмиде или плаزمиды или интегрирован в геном клетки-хозяина (см., например, опубликованные международные заявки на патент WO 2014/037585, WO 2014/057109, WO 2015/052344). В одном воплощении предложена клетка-хозяин (например, рекомбинантная клетка-хозяин) способная продуцировать биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli*, ковалентно связанного с белком-носителем. Такая клетка-хозяин содержит, предпочтительно в результате инженерии клетки-предшественника, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ген *gtrS*, который, насколько известно авторам изобретения, впервые идентифицирован ими как кодирующий фермент, обеспечивающий ветвление полисахаридов, способный переносить глюкозу на антиген O4 *E.coli* (т.е. глюкозилтрансферазу, специфичную к полисахаридному антигену O4 *E.coli*), и, в частности, к L-Rha посредством α -1,3-гликозидной связи. Пример аминокислотной последовательности такого фермента, обеспечивающего ветвление, представлен в SEQ ID NO: 4. Другие примеры содержат аминокислотные последовательности, которые идентичны ей по меньшей мере на 80%. Приведенные в качестве иллюстрации примеры нуклеиновых кислот, кодирующих гены *gtrS*, специфичные к полисахаридному антигену O4 *E.coli*, включают SEQ ID NO: 5 или вырожденные по отношению к ней последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют SEQ ID NO: 4, или последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют функциональные специфичные к O4 ферменты *GtrS*, которые по меньшей мере на 80% идентичны SEQ ID NO: 4, но не ограничиваются ими.

В конкретном воплощении клетка-хозяин (например, рекомбинантная клетка-хозяин), способная продуцировать биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli*, ковалентно связанный с белком-носителем, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую глюкозилтрансферазу, идентичную по меньшей мере на 80% SEQ ID NO: 4, например, приблизительно на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 4. Принимая во внимание избыточность генетического кода, специалист в данной области может создать варианты нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотные последовательности глюкозилтрансфераз, например, используя последовательности с оптимизированными кодонами, при желании.

В некоторых воплощениях клетка-хозяин (например, рекомбинантная клетка-хозяин), способная продуцировать биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli*, ковалентно связанный с белком-носителем, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую глюкозилтрансферазу (*GtrS*), идентичную по меньшей мере на 80% SEQ ID NO: 4, дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую транслоказу глюкозы, связанной с бактопренолом (*GtrA*), идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO: 7, и нуклеотидную последовательность, кодирующую бактопренол-глюкозилтрансферазу (*GtrB*), идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO: 8. В некоторых воплощениях указанные последовательности нуклеиновых кислот кодируют белки *GtrA* и *GtrB*, которые по меньшей мере приблизительно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны SEQ ID NO: 7 и 8, соответственно, и обладают активностью транслоказы глюкозы, связанной с бактопренолом (SEQ ID NO: 7) и бактопренол-глюкозилтрансферазы (SEQ ID NO: 8), соответственно. Принимая во внимание избыточность генетического кода, специалист в данной области может создать варианты нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотные последовательности транслоказ глюкозы, связанной с бактопренолом и бактопренол-глюкозилтрансфераз, например, используя последовательности с оптимизированными кодонами, при желании.

Предложенная клетка-хозяин (например, рекомбинантная клетка-хозяин) способная продуцировать биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, дополнительно содержит нуклеотидную последовательность генного кластера *gfb* для полисахаридного антигена O4 *E.coli*. Пример генного кластера генов *gfb*, который может найти применение для продукции полисахаридного антигена O4 *E.coli*, представлен в данном документе как SEQ ID NO: 9. Другим примером является локус AY568960, который можно найти в GenBank. Также могут применяться вырожденные последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие те же ферменты, которые кодируются этой последовательностью, или последовательности, кодирующие ферменты, которые идентичны по меньшей мере на 80%, предпочтительно идентичны по меньшей мере на 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%.

В конкретном воплощении в настоящем документе представлена клетка-хозяин (например, рекомбинантная клетка-хозяин, предпочтительно рекомбинантная прокарриотическая клетка-хозяин, предпочтительно рекомбинантная клетка-хозяин *E.coli*), которая продуцирует гликозилированный полисахаридный антиген O4, при этом клетка-хозяин содержит *gtrS*, генный кластер *gfb* полисахаридного антигена O4 *E.coli* и нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-носитель. Такие клетки-хозяева могут быть скон-

струированы с использованием рекомбинантных подходов, чтобы они содержали одну или несколько плазмид, содержащих ген *gtrS*, генный кластер *gfb* и/или нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-носитель, или содержали некоторые или все соответствующие гены, такие как *gtrS*, кластер *gfb* и/или нуклеиновая кислота, кодирующая белок-носитель, интегрированные в геном клетки-хозяина. В некоторых воплощениях гены или генные кластеры интегрированы в геном клетки-хозяина с использованием гомологичной рекомбинации. Преимуществом интеграции генов в геном клетки-хозяина является стабильность в отсутствие отбора с использованием антибиотиков.

В другом конкретном воплощении в настоящем документе предложена клетка-хозяин (например, рекомбинантная клетка-хозяин, предпочтительно рекомбинантная прокариотическая клетка-хозяин), которая продуцирует гликозилированный полисахаридный антиген O4, при этом клетка-хозяин содержит *GtrS* (глюкозилтрансферазу), а также ферменты, кодируемые генным кластером *gfb*. В некоторых воплощениях некоторые или все из вышеуказанных ферментов являются гетерологичными для клетки-хозяина.

В других конкретных воплощениях в настоящем документе предложена клетка-хозяин (например, рекомбинантная клетка-хозяин, предпочтительно рекомбинантная прокариотическая клетка-хозяин), которая продуцирует гликозилированный полисахаридный антиген O4 *E.coli*, при этом клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу и/или нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-носитель. В одном конкретном воплощении олигосахарилтрансфераза является гетерологичной для клетки-хозяина. В другом конкретном воплощении белок-носитель является гетерологичным для клетки-хозяина. Предпочтительно, клетка-хозяин содержит гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую глюкозилтрансферазу, последовательность которой по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 4. В предпочтительных воплощениях гены *gfb* кластера O4 являются гетерологичными для клетки-хозяина. Предпочтительно последовательность, кодирующая фермент, который способен вводить ответвленную боковую цепь глюкозы в антиген O4, т.е. ген *gtrS* (кодирующий глюкозилтрансферазу, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности с SEQ ID NO: 4), является гетерологичной для клетки-хозяина. Нуклеиновая кислота является гетерологичной по отношению к клетке-хозяину, если в природе такая же последовательность отсутствует в указанной клетке-хозяине. Гетерологичная нуклеиновая кислота может быть, например, введена в родительскую клетку с помощью генной инженерии, например, путем трансформации (например, химической трансформации или электропорации) и/или рекомбинации. В некоторых воплощениях гетерологичная нуклеиновая кислота, такая как желаемый локус *gfb*, кодирующая последовательность *gtrS*, последовательность, кодирующая белок-носитель, и/или последовательность, кодирующая глюкозилтрансферазу, интегрированы в геном клетки-хозяина, предпочтительно бактериальной клетки-хозяина, предпочтительно клетки-хозяина *E.coli*. В предпочтительных воплощениях эндогенный локус *gfb* и, если применимо, кодирующая последовательность *gtrS* были инактивированы, предпочтительно посредством делеции из генома рекомбинантной клетки-хозяина по сравнению с ее предшественником, и предпочтительно они заменены желаемым гетерологичным локусом *gfb*, и, если применимо, желаемой кодирующей последовательностью *gtrS*, соответственно. В некоторых воплощениях клетка-хозяин представляет собой *E.coli* K-12 (в качестве неограничивающего примера, штаммом K-12 является штамм *E.coli* W3110), или штамм B *E.coli* (в качестве неограничивающего примера, штаммом B является штамм *E.coli* BL21), или любой другой четко определенный штамм *E.coli*, например, лабораторные штаммы или производственные штаммы, в отличие от первичных изолятов дикого типа. В предпочтительных воплощениях клетка-хозяин получена от *E.coli*, которая не экспрессирует антиген O4 или гликозилированный антиген O4, путем введения в такую *E.coli* локуса *gfb* O4 и гена *gtrS*, кодирующего глюкозилтрансферазу, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO: 4. Преимуществами использования хорошо охарактеризованных штаммов, таких как *E.coli* K-12 или *E.coli* B, в качестве предшественников для клеток-хозяев является возможность использовать аналогичный процесс производства для различных биоконъюгатов O-антигена, поскольку характеристики штамма-производителя четко определены. Несмотря на то, что биоконъюгаты разных O-антигенов будут вести себя по-разному и процессы экспрессии могут быть оптимизированы для каждого производственного штамма, по крайней мере, основной процесс получения биоконъюгатов O-антигена с использованием таких четко определенных штаммов-предшественников будет более предсказуемым, чем когда в качестве предшественников для получения штаммов-хозяев используются неизвестные штаммы, такие как изоляты дикого типа. Таким образом, опыт получения ранее описанных биоконъюгатов O-антигена *E.coli*, таких как биоконъюгаты O1A, O2, O6A и O25B, как описано, например, в WO 2015/124769 и WO 2017/035181, может быть использован в качестве основы для разработки производства других биоконъюгатов O-антигена *E.coli*. В отличие от *gtrS*, гены *gtrA* и *gtrB* не являются серотип-специфичными, и в некоторых воплощениях они гомологичны клетке-хозяину (например, штамм *E.coli* K12 W3110 включает гены *gtrA* и *gtrB*, которые способны функционировать вместе со специфическим для серотипа O4 рекомбинантно введенным геном *gtrS*, кодирующим глюкозилтрансферазу SEQ ID NO: 4 или глюкозилтрансферазу, которая идентична ему по меньшей мере на 80%, заменяющим эндогенный ген *gtrS*). В других воплощениях один или оба гена *gtrA* и *gtrB* (кодирующие белки *GtrA* и *GtrB*, которые по меньшей мере примерно на 80% идентичны SEQ ID

NO: 7 и 8, соответственно, и обладают активностью транслоказы бактопренол-связанной глюкозы и бактопренол-глюкозилтрансферазы соответственно, также рекомбинантно вводятся в клетку-хозяин, например, в случае, если клетка-хозяин не имеет эндогенных генов *gtrA* и/или *gtrB*.

В данном документе также предложены клетки-хозяева (например, рекомбинантные клетки-хозяева) способные продуцировать биоконъюгат полисахаридного антигена O1A, O2, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B или O75 *E.coli*, ковалентно связанного с белком-носителем. Такие клетки-хозяева (например, рекомбинантные клетки-хозяева) содержат нуклеотидную последовательность генного кластера *gfb*, специфичного для полисахаридного O-антигена. Генные кластеры *gfb* можно выделить из штаммов *E.coli* дикого типа и объединить с нуклеиновыми кислотами, кодирующими олигосахарилтрансферазу (например, *PglB*) и белок-носитель (например, *EPA*) в одной клетке-хозяине, чтобы получить рекомбинантную клетку-хозяина, которая продуцирует представляющий интерес O-антиген *E.coli* или его биоконъюгат. Например, такие клетки-хозяева могут быть сконструированы с использованием рекомбинантных подходов, чтобы они содержали одну или несколько плазмид, содержащих генный кластер *gfb*, олигосахарилтрансферазу (например, *PglB*) и белок-носитель (например, *EPA*), с использованием технологий биоконъюгирования, такой как описанная в WO 2014/037585, WO 2009/104074 и WO 2009/089396. Предпочтительно клетки-хозяева содержат генные кластеры *gfb*, интегрированные в их геном. В некоторых воплощениях нуклеиновые кислоты, кодирующие олигосахарилтрансферазу, белок-носитель и, где это применимо, ген *gtrS*, также интегрированы в геном клетки-хозяина. В некоторых воплощениях гетерологичные или гомологичные гены *gtrA* и *gtrB* также интегрированы в геном клетки-хозяина. Получение биоконъюгатов для антигенов O1A, O2, O6A и O25B подробно описано в WO 2015/124769 и WO 2017/035181. Примеры генных кластеров для каждого O-антигена *E.coli* (локусы *gfb*) описаны Iguchi A, et al, DNA Research, 2014, 1-7 (doi: 10.1093/dnares/dsu043) и DebRoy C, et al, PLoS One. 2016, 11(1):e0147434 (doi: 10.1371/journal.pone.0147434; исправления в: Plos One. 2016, 11(4):e0154551, doi: 10.1371/journal.pone.0154551). Последовательности нуклеиновых кислот для кластеров *gfb* и аминокислотные последовательности для белков, кодируемых в них, также можно найти в общедоступных базах данных, таких как GenBank. Примеры последовательности кластеров *gfb*, которые можно использовать в штаммах-продуцентах для биоконъюгатов с полисахаридными антигенами серотипов, раскрытых в данном документе, также представлены в SEQ ID NO: 9 и 11-19. Таким образом, для каждого из желаемых биоконъюгатов, упомянутых выше, соответствующий кластер *gfb* может быть введен в клетку-хозяина, чтобы получить клетки-хозяева содержащие специфический кластер *gfb* для желаемого O-антигена, а также содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую олигосахарилтрансферазу и белок-носитель. По причинам, указанным выше, предпочтительно, чтобы клетки-хозяева были рекомбинантными клетками-хозяевами и предпочтительно происходили из штаммов с относительно хорошо известными характеристиками, таких как лабораторные или производственные штаммы *E.coli*, например *E.coli* K12 или *E.coli* BL21 и т.д. Предпочтительно кластеры *gfb* гетерологичны клетке-хозяину, например, введены в клетку-предшественницу клетки-хозяина и предпочтительно интегрированы в ее геном. Предпочтительно исходный генный кластер *gfb*, если таковой присутствовал в клетке-предшественнике, заменен в клетке-хозяине кластером генов *gfb* для интересующего O-антигена, чтобы обеспечить продукцию биоконъюгата интересующего O-антигена. Предпочтительно олигосахарилтрансфераза гетерологична для клетки-хозяина, и в некоторых воплощениях нуклеиновая кислота, кодирующая такую олигосахарилтрансферазу, интегрирована в геном клетки-хозяина.

Любая из клеток-хозяев, предложенных в настоящем документе (например, рекомбинантные клетки-хозяева, предпочтительно рекомбинантные прокариотические клетки-хозяева), содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие дополнительные ферменты, активные в N-гликозилировании белков, например, предложенная клетка-хозяин может дополнительно содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую олигосахарилтрансферазу, или нуклеиновые кислоты, кодирующие другие гликозилтрансферазы.

Предложенные в данном документе клетки-хозяева содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую олигосахарилтрансферазу. Олигосахарилтрансферазы переносят связанные с липидом олигосахариды на аспарагиновые остатки образующихся полипептидных цепей, которые содержат консенсусный мотив N-гликозилирования. Нуклеиновая кислота, кодирующая олигосахарилтрансферазу, может быть нативной для клетки-хозяина или может быть введена в клетку-хозяин с использованием генетических подходов. В предпочтительных воплощениях олигосахарилтрансфераза является гетерологичной для клетки-хозяина. *E.coli* в природе не содержит олигосахарилтрансферазу, и, следовательно, если *E.coli* используется в качестве клетки-хозяина для продукции биоконъюгатов, в такой клетке-хозяине содержится гетерологичная олигосахарилтрансфераза, например, введенная посредством генной инженерии. Олигосахарилтрансфераза может происходить из любого источника, известного в данной области техники с учетом настоящего раскрытия. В некоторых воплощениях в качестве альтернативы олигосахарилтрансферазе с N-гликозилтрансферазной активностью, такой как O-гликозилтрансфераза, в качестве неограничивающего примера можно использовать, например, *PglL* в сочетании с ее собственной, иной консенсусной последовательностью гликозилирования в белке-носителе, как, например, описано в WO 2016/82597. Таким образом, согласно изобретению, в качестве олигосахарилтрансферазы также можно использовать другие гликозилтрансферазы, такие как O-гликозилтрансферазы.

В некоторых предпочтительных воплощениях олигосахарилтрансфераза представляет собой олигосахарилтрансферазу из *Campylobacter*. Например, в одном воплощении олигосахарилтрансфераза представляет собой олигосахарилтрансферазу из *Campylobacter jejuni* (т.е. *pglB*; см., например, Wacker et al., 2002, Science 298:1790-1793; см. также, например, NCBI Gene ID: 3231775, номер доступа Uniprot 086154). В другом воплощении олигосахарилтрансфераза представляет собой олигосахарилтрансферазу из *Campylobacter lari* (см., например, NCBI Gene ID: 7410986).

В конкретных воплощениях олигосахарилтрансфераза представляет собой олигосахарилтрансферазу *PglB* из *Campylobacter jejuni*, включая природный белок (дикого типа) или любой его вариант, например, описанный в опубликованных международных заявках на патент WO 2016/107818 и WO 2016/107819. *PglB* может переносить связанные с липидом олигосахариды на остатки аспарагина в консенсусных последовательностях SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. В конкретных воплощениях олигосахарилтрансфераза *PglB* содержит SEQ ID NO: 6 или ее вариант. В некоторых воплощениях одна или несколько эндогенных консенсусных последовательностей гликозилирования в *PglB* дикого типа были мутированы, чтобы избежать аутогликозилирования *PglB*, например SEQ ID NO: 6, содержащая мутацию N534Q. Примеры вариантов олигосахарилтрансфераз *PglB*, подходящих для применения в рекомбинантных клетках-хозяевах, предложенных в настоящем документе, включают олигосахарилтрансферазу *PglB* с SEQ ID NO: 6, содержащую по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из N311V, K482R, D483H, A669V, Y77H, S80R, Q287P и K289R. В одном конкретном воплощении вариант олигосахарилтрансферазы *PglB* имеет SEQ ID NO: 6, содержащую мутацию N311V. В другом конкретном воплощении вариант олигосахарилтрансферазы *PglB* имеет SEQ ID NO: 6, содержащую мутации Y77H и N311V. В другом конкретном воплощении вариант олигосахарилтрансферазы *PglB* имеет SEQ ID NO: 6, содержащую мутации N311V, K482R, D483H и A669V. В другом конкретном воплощении вариант олигосахарилтрансферазы *PglB* имеет SEQ ID NO: 6, содержащую мутации Y77H, S80R, Q287P, K289R и N311V. Обнаружено и описано в настоящем документе, что некоторые варианты олигосахарилтрансферазы *PglB* неожиданно обеспечивают улучшенный выход при продукции биоконъюгатов О-антигена *E.coli* определенных серотипов. Улучшенный или оптимальный вариант *PglB* для заданного О-антигена *E.coli* предсказать невозможно. Таким образом, в некоторых аспектах изобретения также предложены способы получения биоконъюгатов специфических О-антигенов *E.coli* с использованием в качестве олигосахарилтрансферазы специфических вариантов *PglB*. Дополнительные варианты *PglB*, которые по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентичны SEQ ID NO: 6 и все еще обладают олигосахарилтрансферазной активностью, предпочтительно имея в комбинации одну или несколько конкретных аминокислот в указанных положениях, изложенных в данном документе (например, 77Y, 80S, 287Q, 289K, 311N, 482K, 483D, 669A; или 311V; или 311V, 482R, 483H, 669V; или 77H, 80R, 287P, 289R, 311V; или 77H, 311V; и т.д.) также можно использовать для производства биоконъюгатов.

В конкретном воплощении клетка-хозяин (например, рекомбинантная клетка-хозяин), способная продуцировать биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli*, ковалентно связанный с белком-носителем, дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу *PglB* *Campylobacter jejuni*, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, или предпочтительно SEQ ID NO: 6, содержащую мутацию N311V, или более предпочтительно SEQ ID NO: 6, содержащую мутации Y77H и N311V. В других конкретных воплощениях клетка-хозяин (например, рекомбинантная клетка-хозяин), способная продуцировать биоконъюгат полисахаридного антигена O1A, O6A или O15 *E.coli*, ковалентно связанный с белком-носителем, дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу *PglB* *Campylobacter jejuni*, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, или предпочтительно SEQ ID NO: 6, содержащую мутации N311V, K482R, D483H и A669V.

В конкретном воплощении клетка-хозяин (например, рекомбинантная клетка-хозяин), способная продуцировать биоконъюгат полисахаридного антигена O16 *E.coli*, ковалентно связанный с белком-носителем, дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу *PglB* *Campylobacter jejuni*, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, или предпочтительно SEQ ID NO: 6, содержащую мутации Y77H, S80R, Q287P, K289R и N311V.

В конкретном воплощении клетка-хозяин (например, рекомбинантная клетка-хозяин), способная продуцировать биоконъюгат полисахаридного антигена O75 *E.coli*, ковалентно связанный с белком-носителем, дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу *PglB* *Campylobacter jejuni*, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, или предпочтительно SEQ ID NO: 6, содержащую мутацию N311V.

В конкретном воплощении клетка-хозяин (например, рекомбинантная клетка-хозяин), способная продуцировать биоконъюгат полисахаридного антигена O8, O18A, O25B или O2 *E.coli*, ковалентно связанный с белком-носителем, дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу *PglB* *Campylobacter jejuni*, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, предпочтительно где SEQ ID NO: 6 не содержит аминокислотные мутации в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669.

В некоторых воплощениях любые из клеток-хозяев, предложенных в данном документе, содержат

нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-носитель, например, белок, к которому может (могут) быть присоединен(ы) полисахаридный(ые) O-антиген(ы), продуцируемый(ые) аппаратом гликозилирования клетки-хозяина, с образованием биоконъюгата. Клетка-хозяин может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую любой белок-носитель, известный специалистам в области техники с учетом данного изобретения, включая обезвреженный экзотоксин A *P.aeruginosa* (EPA), флагеллин *E.coli* (FHC), CRM 197, мальтозосвязывающий белок (MBP), дифтерийный анатоксин, столбнячный анатоксин, обезвреженный гемолизин *A.S.aureus*, агглютинирующий фактор A, агглютинирующий фактор B, термолабильный энтеротоксин *E.coli*, обезвреженные варианты термолабильного энтеротоксина *E.coli*, субъединицу B холерного токсина (CTB), холерный токсин, обезвреженные варианты холерного токсина, белок Sat *E.coli*, домен-"пассажир" белка Sat *E.coli*, пневмолизин *Streptococcus pneumoniae*, гемоцианин *Megathura crenulata* (KLH), PcrV *P.aeruginosa*, белок внешней мембраны *Neisseria meningitidis* (OMPC) и белок D из нетипируемого *Haemophilus influenzae*, но не ограничиваясь перечисленным.

В предпочтительных воплощениях клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую обезвреженный экзотоксин A *P.aeruginosa* (EPA). Предпочтительно, белок-носитель EPA содержит 1-10 сайтов гликозилирования, предпочтительно от 2 до 4 сайтов гликозилирования, наиболее предпочтительно 4 сайта гликозилирования, каждый из которых содержит консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 и, наиболее предпочтительно, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В конкретном воплощении клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-носитель EPA-4, содержащую SEQ ID NO: 3. В некоторых воплощениях белки-носители, используемые при создании биоконъюгатов клетками-хозяевами, описанными в настоящем документе, содержат "метку", то есть последовательность аминокислот, которая позволяет выделять и/или идентифицировать белок-носитель. Например, добавление метки к белку-носителю может быть полезно для очистки этого белка и, следовательно, очистки конъюгированных вакцин, содержащих меченый белок-носитель. Примеры меток, которые могут быть использованы в данном документе, включают, без ограничения, гистидиновые (HIS) метки (например, гексагистидиновые метки или 6XHis-Tag), метки FLAG-TAG и HA (гемагглютининовые). В некоторых воплощениях используемые здесь метки являются удаляемыми, например, удаляются химическими агентами или ферментативными способами, когда они больше не нужны, например, после очистки белка. В других воплощениях белок-носитель не содержит метку.

В некоторых воплощениях белок носитель, описанный в данном документе, содержит сигнальную последовательность, которая направляет белок носитель в периплазматическое пространство клетки-хозяина, экспрессирующей белок носитель. В конкретном воплощении сигнальная последовательность происходит из *E.coli* DsbA, порина A внешней мембраны *E.coli* (OmpA), мальтозосвязывающего белка *E.coli* (MalE), пектатлиазы *Erwinia carotovora* (PelB), FlgI, NikA или эндоксилазы (*XynA*) *Bacillus*, sp., термолабильного энтеротоксина LTIIb *E.coli*, эндоксилазы *XynA* *Bacillus* или флагеллина (FlgI) *E.coli*. В одном воплощении сигнальная последовательность содержит SEQ ID NO: 10. Сигнальная последовательность может быть отщеплена после транслокации белка в периплазму и, таким образом, может больше не присутствовать в конечном белке-носителе биоконъюгата.

В некоторых воплощениях в клетки-хозяева могут быть введены дополнительные модификации (например, с использованием рекомбинантных методов), описанные в настоящем документе. Например, в фоновом генотипе (геноме) клетки-хозяина может быть осуществлена делеция или модификация нуклеиновых кислот клетки-хозяина (например, генов), которые кодируют белки, которые образуют часть возможного конкурирующего или мешающего пути гликозилирования (например, конкурируют или мешают одному или нескольким гетерологичным генам, участвующим в гликозилировании, которые рекомбинантно вводятся в клетку-хозяина), таким образом, чтобы инактивировать их/сделать их дисфункциональными (т.е. нуклеиновые кислоты клетки-хозяина, которые подвергнуты делеции/модификации, не кодируют функциональный белок). В некоторых воплощениях, когда осуществлена делеция нуклеиновых кислот из генома клеток-хозяев, предложенных в данном документе, они заменены желаемой последовательностью, например, последовательностью, которая полезна для продукции полисахаридного O-антигена или его биоконъюгата. Примеры генов или генных кластеров, которые могут быть подвергнуты делеции в клетках-хозяевах (и, в некоторых случаях, заменены другими желательными последовательностями нуклеиновых кислот), включают гены или генные кластеры клеток-хозяев, участвующих в биосинтезе гликолипидов, такие как *waaL* (см., например, Feldman et al. al., 2005, PNAS USA 102: 3016-3021), кластер биосинтеза ядра липида A (*wad*), кластер галактозы (*gal*), кластер арабинозы (*ara*), кластер колановой кислоты (*wc*), кластер капсульного полисахарида, гены биосинтеза ундекапrenoла-p (например, *urpS*, *urpP*), гены рециркуляции *und-P*, метаболические ферменты, участвующие в биосинтезе сахаров, активированных нуклеотидами, общий кластер антигенов энтеробактерий (*esa*) и кластеры модификации O-антигена профагов, такие как кластер *gtrABS* или его области. В конкретном воплощении описанные в данном документе клетки-хозяева модифицированы таким образом, что они не продуцируют какого-либо полисахаридного O-антигена, кроме желаемого полисахаридного O-антигена, например, гликозилированного полисахаридного антигена O4.

В конкретном воплощении ген *waaL* удален из генома клетки-хозяина (например, рекомбинантной

клетки-хозяина), предложенной в данном документе, или функционально инактивирован. Термины "waaL" и "ген waaL" относятся к гену O-антиген-лигазы, кодирующему связанный с мембраной фермент с активным сайтом, расположенным в периплазме. Кодируемый фермент переносит O-антиген, связанный с ундекапренилфосфатом (UPP), в ядро липида A, образуя липополисахарид. Делеция или разрушение эндогенного гена waaL (например, у штаммов Awaal) нарушает перенос O-антигена на липид A и вместо этого может усиливать перенос O-антигена на другую биомолекулу, такую как белок-носитель.

В другом конкретном воплощении в исходном геноме прокариотической клетки-хозяина, представленной в настоящем документе, осуществлена делеция или функциональная инактивация одного или более чем одного из: гена waaL, гена gtrA, гена gtrB, гена gtrS и генного кластера gfb.

В одном воплощении используемая клетка-хозяин представляет собой *E.coli*, которая продуцирует биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4, при этом в геноме клетки-хозяина осуществлена делеция или функциональная инактивация гена waaL и вставка гена gtrS, специфичного для полисахаридного антигена O4 *E.coli*. В некоторых воплощениях для штаммов-продуцентов биоконъюгатов гликозилированного O-антигена O4 ген gtrS, кодирующий глюкозилтрансферазу, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности с SEQ ID NO: 4, вставляют вместо гена gtrS родительского штамма, чтобы заменить ген gtrS в этом родительском штамме на ген, который отвечает за гликозилирование антигена O4. Примером такого родительского штамма является штамм W3110 *E.coli* K-12. Гены gtrA и gtrB могут быть гомологичными для родительского штамма, или, в альтернативном варианте, один или оба этих гена могут быть гетерологичными для родительского штамма. Как правило, в отличие от гена gtrS, эти гены gtrA и gtrB неспецифичны для структуры O-антигена. В данном документе также предложены способы создания рекомбинантных клеток-хозяев. Рекомбинантные клетки-хозяева, полученные способами, описанными в данном документе, могут применяться для получения биоконъюгатов O-антигенов *E.coli*. Способы включают введение одной или более чем одной молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты в клетку для получения рекомбинантной клетки-хозяина. Как правило, молекулы рекомбинантных нуклеиновых кислот являются гетерологичными. Для внедрения молекул рекомбинантных нуклеиновых кислот в клетку-хозяина можно применять любой подходящий с учетом данного описания способ, известный в области техники. Рекомбинантные нуклеиновые кислоты могут быть введены в клетки-хозяева, описанные в данном документе, с помощью любых способов, известных специалистам в данной области, например, электропорации, химической трансформации, теплового шока, естественной трансформации, фаговой трансдукции и конъюгации. В конкретных воплощениях рекомбинантные нуклеиновые кислоты вводят в клетки-хозяева, описанные в данном документе, с использованием плазмиды. Например, гетерологичные нуклеиновые кислоты могут экспрессироваться в клетках-хозяевах с помощью плазмиды (например, вектора экспрессии). В другом конкретном воплощении гетерологичные нуклеиновые кислоты вводят в клетки-хозяева, описанные в настоящем документе, с использованием метода вставки в геном, как например, описано в опубликованных международных заявках на патент WO 2014/037585, WO 2014/057109 или WO 2015/052344.

В одном воплощении способ получения рекомбинантной клетки-хозяина для получения биоконъюгата гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, включает введение в клетку, предпочтительно клетку *E.coli*, молекул одной или нескольких рекомбинантных нуклеиновых кислот, чтобы получить рекомбинантную клетку-хозяина. В таких воплощениях молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, введенные в клетку, включают (1) нуклеотидную последовательность генного кластера gfb для полисахаридного антигена O4 *E.coli*; (2) нуклеотидную последовательность, кодирующую глюкозилтрансферазу, последовательность которой по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 4, где глюкозилтрансфераза способна модифицировать полисахаридный антиген O4 *E.coli* с образованием гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli*; (3) нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-носитель; и (4) нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарил трансферазу, способную ковалентно связывать гликозилированный полисахаридный антиген O4 *E.coli* с белком-носителем для получения биоконъюгата. В предпочтительных воплощениях нуклеотидная последовательность, кодирующая глюкозилтрансферазу, последовательность которой по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 4, заменяет эндогенный ген gtrS. Делеция эндогенного gtrS имеет то преимущество, что оно не мешает образованию полисахаридной структуры гликозилированного антигена O4. В некоторых воплощениях нуклеотидная последовательность генного кластера gfb для полисахаридного антигена O4 *E.coli* замещает эндогенный кластер генов gfb родительского штамма, который используется для создания рекомбинантной клетки-хозяина. Если клетка еще не кодирует гены gtrA и/или gtrB, в клетку можно внедрить нуклеотидные последовательности, кодирующие транслоказу (gtrA) и глюкозилтрансферазу (gtrB), последовательность которых по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 7 и 8, соответственно. Если клетка уже кодирует гены gtrA и gtrB (как, например, в случае штамма W3110 *E.coli* K-12), нет необходимости вводить или изменять эти гены.

В конкретном воплощении глюкозилтрансфераза (gtrS, специфичная для добавления глюкозной ветви к антигену O4) имеет SEQ ID NO: 4.

В конкретном воплощении олигосахарилтрансфераза представляет собой PglB из *S.jejuni*. В одном таком воплощении олигосахарилтрансфераза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID

NO: 6. В другом таком воплощении олигосахарилтрансфераза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, содержащую мутацию N311V. В другом таком воплощении олигосахарилтрансфераза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, содержащую мутации Y77H и N311V.

В другом конкретном воплощении белок-носитель содержит по меньшей мере один сайт гликозилирования, содержащий консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 1, предпочтительно SEQ ID NO: 2. В другом конкретном воплощении белок-носитель представляет собой EPA, предпочтительно EPA-4, такой как EPA-4, содержащий SEQ ID NO: 3.

Штаммы *E.coli*, которые обычно используются в молекулярной биологии как инструмент и как модельный организм, могут, например, использоваться в качестве родительских клеток для клеток-хозяев в некоторых воплощениях изобретения. Неисчерпывающие примеры включают штаммы *E.coli* K12 (например, такие как W1485, W2637, W3110, MG1655, DH1, DH5a, DH10 и т.д.), В штаммы (например, BL-21, REL606 и т.д.), С штаммы или W штаммы. В одном конкретном воплощении штамм-хозяин происходит из родительского штамма W3110. Этот штамм можно, например, получить из музея культур *E.coli* в Йельском университете. Для получения дополнительной информации о *E.coli* см., например, Ecoli-wiki.net.

Способы получения конъюгатов и биоконъюгатов.

Также предложены способы получения гликоконъюгатов полисахаридных O-антигенов *E.coli*, описанных в данном документе. Гликоконъюгаты, включая биоконъюгаты, могут быть получены *in vitro* или *in vivo*, например, с использованием для получения рекомбинантных клеток-хозяев, описанных в данном документе. В некоторых воплощениях гликоконъюгаты могут быть получены путем химического синтеза, т.е. получены вне клеток-хозяев (*in vitro*). Например, полисахаридный O-антиген *E.coli* может быть конъюгирован с белками-носителями, с применением способов, известных специалистам в области техники, включая способы с применением активации реакционноспособных групп полисахарида/олигосахарида, а также белка носителя. См., например, Pawlowski et al., 2000, Vaccine 18:1873-1885; и Robbins, et al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106:7974-7978), содержание которых включено во всей полноте путем ссылки. Такие подходы включают экстрагирование антигенных полисахаридов/олигосахаридов из клеток-хозяев, очистку полисахаридов/олигосахаридов, химическую активацию полисахаридов/олигосахаридов и конъюгирование полисахаридов/олигосахаридов с белком носителем. В некоторых воплощениях клетки-хозяева, описанные в данном документе, могут применяться для получения биоконъюгатов, содержащих полисахаридный O-антиген *E.coli*, ковалентно связанный с белком-носителем. Способы получения таких биоконъюгатов известны в области техники. См., например, WO 2003/074687 и WO 2006/119987. Такие способы включают культивирование любой рекомбинантной клетки-хозяина, описанной в данном документе, в условиях для продуцирования биоконъюгата. Биоконъюгаты могут быть выделены, отделены и/или очищены из рекомбинантных клеток-хозяев с использованием любого способа, известного в данной области с учетом настоящего раскрытия. Например, биоконъюгаты могут быть очищены любым способом очистки белка, известным в области техники, например, посредством хроматографии (например, ионообменной, анионообменной, аффинной и колоночной хроматографии с разделением по размерам), центрифугирования, по различиям в растворимости или любым другим стандартным способом очистки белков. См., например, способы, описанные в WO 2009/104074. Кроме того, для облегчения очистки биоконъюгаты могут быть слиты с последовательностями гетерологичных полипептидов. Фактические условия, используемые для очистки конкретного биоконъюгата, будут частично зависеть от таких факторов, как суммарный заряд, гидрофобность и/или гидрофильность биоконъюгата, и будут очевидны специалистам в области техники. Получение биоконъюгатов для O1A, O2, O6A и O25B, а также содержащих их вакцинных композиций, например, было описано в WO 2015/124769 и WO 2017/035181. Также представлены биоконъюгаты, полученные описанными здесь способами, то есть с использованием рекомбинантных клеток-хозяев, описанных в данном документе.

В некоторых воплощениях способ получения биоконъюгата полисахаридного O-антигена *E.coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, включает: (1) получение рекомбинантной клетки-хозяина, содержащей (а) нуклеотидную последовательность генного кластера *gfb* для полисахаридного O-антигена; (б) нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-носитель, предпочтительно EPA, содержащий по меньшей мере один сайт гликозилирования, содержащий консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 1, предпочтительно SEQ ID NO: 2, и более предпочтительно содержащий четыре сайта гликозилирования, каждый из которых содержит консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 2; и (в) нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу, например, олигосахарилтрансферазу PglB или ее вариант. В некоторых воплощениях полисахаридные O-антигены *E.coli*, полученные с использованием рекомбинантных клеток-хозяев, описанных в данном документе, ковалентно связаны с белком-носителем при определенном массовом соотношении полисахарида к белку (масс/масс). Это массовое соотношение количества полисахаридного O-антигена, ковалентно связанного с белком-носителем, называется "соотношением гликан/белок", или "соотношением полисахарид/белок", или "соотношением PS/белок". В некоторых воплощениях полисахаридный O-антиген ковалентно связан с белком-носителем при соотношении полиса-

хариды и белка (мас./мас.) примерно от 1:20 до 20:1, предпочтительно от 1:10 до 10:1, более предпочтительно от 1:3 до 3:1. В некоторых неограничивающих воплощениях биоконъюгатов, описанных в данном документе, соотношение гликан/белок составляет примерно от 0,1 до 0,5, например, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45 или 0,5. В таких воплощениях массовое соотношение полисахаридный О-антиген:белок составляет примерно от 1:10 до 1:2, например, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3 или 1:2, в зависимости от конкретного серотипа О-антигена. В некоторых воплощениях соотношение гликан/белок составляет от примерно 0,15 до примерно 0,45. В общем, более высокое соотношение гликан/белок полисахаридного О-антигена к белку-носителю является предпочтительным, поскольку в некоторых случаях высокое количество белка-носителя может привести к иммунологическому взаимовлиянию. Кроме того, более высокое соотношение гликан/белок поможет получить достаточное количество полисахаридного О-антигена, дозированного в форме биоконъюгата, при сохранении относительно низкого количества белка-носителя, что особенно полезно для поливалентных композиций, в которых композиция должна охватывать несколько серотипов, например, композиций, содержащих биоконъюгаты по меньшей мере 4 различных О-антигенов, по меньшей мере 5 различных О-антигенов, по меньшей мере 6 различных О-антигенов, по меньшей мере 7 различных О-антигенов, по меньшей мере 8 различных О-антигенов, по меньшей мере 9 различных О-антигенов, по меньшей мере 10 различных О-антигенов и т. д.

Соотношение гликан/белок в конъюгате согласно изобретению может быть определено путем определения количества белка и количества гликана. Количество белка можно определить путем измерения поглощения УФ излучения при 280 нм (A₂₈₀). Количество гликанов может быть определено на основе ионной хроматографии с импульсным амперометрическим детектированием (IC-PAD) сахара в повторяющейся единице (например, Man для O8 из табл. 1 и GlcNAc для других гликанов из табл. 1), после чего структурная информация о повторяющейся единице может использоваться для расчета общего количества гликанов (например, повторяющаяся единица O1A имеет молярную массу 845 Да, а один моль такой повторяющейся единицы содержит один моль GlcNAc, что позволяет рассчитать общее количество гликанов, когда количество GlcNAc было определено IC-PAD).

В некоторых воплощениях биоконъюгат полисахаридного антигена O25B *E.coli*, ковалентно связанный с белком-носителем, полученным с использованием рекомбинантной клетки-хозяина в соответствии с клетками и способами, описанными в настоящем документе, имеет определенную степень ацетилирования в положении 2 сахара L-Rh. Степень О-ацетилирования полисахаридного антигена O25B в биоконъюгате составляет предпочтительно, 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%.

Аналогично, степень О-ацетилирования полисахаридного антигена O16 *E.coli* в биоконъюгате составляет предпочтительно, 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 конкретных воплощениях способ получения биоконъюгата полисахаридного О-антигена включает получение рекомбинантной клетки-хозяина, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую конкретный фермент олигосахарилтрансферазу, в частности олигосахарилтрансферазу PglB или ее вариант, в зависимости от биоконъюгата полисахаридного О-антигена, который требуется получить. Конкретный вариант фермента олигосахарилтрансферазы может влиять на выход биоконъюгата, продуцируемого клеткой-хозяином. Обычно более высокий выход является предпочтительным, поскольку выход будет влиять на затраты на получение конкретного биоконъюгата, что особенно важно для поливалентных композиций, содержащих несколько различных биоконъюгатов.

В одном конкретном воплощении, когда О-антиген представляет собой полисахаридный антиген O1A, O6A или O15, олигосахарилтрансфераза PglB содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V, где аминокислотные мутации относятся к PglB дикого типа, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В другом конкретном воплощении, когда О-антиген представляет собой полисахаридный антиген O4, олигосахарилтрансфераза PglB содержит аминокислотную мутацию N311V или аминокислотные мутации Y77H и N311V, где аминокислотные мутации относятся к PglB дикого типа, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В другом конкретном воплощении, когда О-антиген представляет собой полисахаридный антиген O16, олигосахарилтрансфераза PglB содержит аминокислотные мутации Y77H, S80R, Q287P, K289R и N311V, где аминокислотные мутации относятся к PglB дикого типа, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

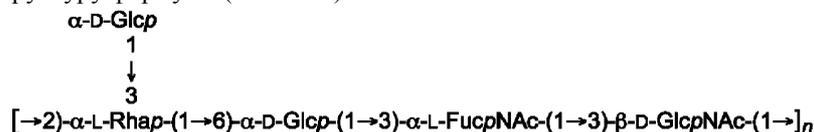
В другом конкретном воплощении, когда О-антиген представляет собой полисахаридный антиген O75, олигосахарилтрансфераза PglB содержит аминокислотную мутацию N311V, где аминокислотные мутации относятся к PglB дикого типа, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В другом конкретном воплощении, когда О-антиген представляет собой полисахаридный антиген O8, O18A, O25B или O2, олигосахарилтрансфераза PglB содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, где SEQ ID NO: 6 не содержит аминокислотные мутации в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669. В некоторых воплощениях олигосахарилтрансфераза PglB содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В некоторых воплощениях биоконъюгаты полисахаридных О-антигенов, продуцируемые рекомбинантными клетками-хозяевами, кодирующими ферменты олигосахарилтрансферазы из пар О-антиген/олигосахарилтрансфераза PglB, указанных выше, предпочтительно имеют одну или несколько предпочтительных характеристик, описанных в данном документе, например соотношение гликан/белок и/или процент мультигликозилированного белка-носителя.

Воплощения

Воплощение 1 представляет собой биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 E.coli, ковалентно связанный с белком-носителем, где гликозилированный полисахаридный антиген O4 E.coli содержит структуру формулы (O4-Glc+)



где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20.

Воплощение 1 представляет собой биоконъюгат по воплощению 1, где гликозилированный полисахаридный антиген O4 E.coli ковалентно связан с остатком Asn в сайте гликозилирования в белке-носителе, содержащем консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 1, предпочтительно имеющую SEQ ID NO: 2.

Воплощение 3 представляет собой биоконъюгат по воплощению 1 или воплощению 2, где белок-носитель выбран из группы, состоящей из обезвреженного экзотоксина A P.aeruginosa (EPA), флагеллина E.coli (FliC), CRM 197, мальтозосвязывающего белка (MBP), дифтерийного анатоксина, столбнячного анатоксина, обезвреженного гемолизина A.S.aureus, агглютинирующего фактора A, агглютинирующего фактора B, термолабильного энтеротоксина E.coli, обезвреженных вариантов термолабильного энтеротоксина E.coli, субъединицы B холерного токсина (CTB), холерного токсина, обезвреженных вариантов холерного токсина, белка Sat E.coli, домена-"пассажира" белка Sat E.coli, пневмолизина Streptococcus pneumoniae, гемоцианина Megathura crenulata (KLH), PcrV P. aeruginosa, белка внешней мембраны Neisseria meningitidis (OMPC) и белка D из нетипируемого Haemophilus influenzae.

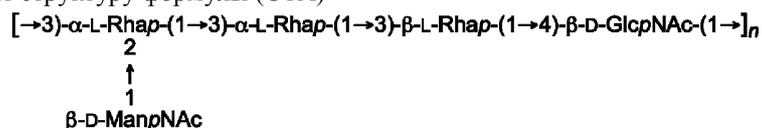
Воплощение 4 представляет собой биоконъюгат по воплощению 3, где белок-носитель представляет собой обезвреженный экзотоксин A P.aeruginosa (EPA), предпочтительно содержащий от 1 до 20, предпочтительно от 1 до 10, предпочтительно от 2 до 4, консенсусных последовательностей гликозилирования, имеющих SEQ ID NO: 1, консенсусные последовательности предпочтительно имеют SEQ ID NO: 2.

Воплощение 5 представляет собой биоконъюгат по воплощению 4, где белок-носитель содержит четыре консенсусных последовательности гликозилирования (EPA-4), предпочтительно где белок-носитель содержит SEQ ID NO: 3.

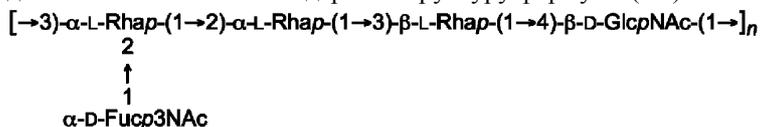
Воплощение 6 представляет собой композицию, содержащую биоконъюгат по любому из воплощений 1-5.

Воплощение 7 представляет собой иммуногенную композицию, содержащую биоконъюгат по любому из воплощений 1-5.

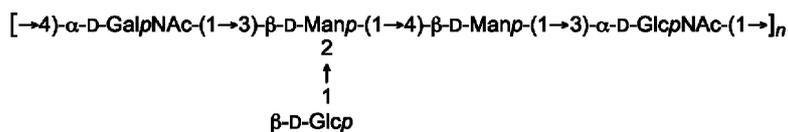
Воплощение 8 представляет собой композицию по воплощению 6 или иммуногенную композицию по воплощению 7, содержащую по меньшей мере один дополнительный полисахаридный антиген, ковалентно связанный с белком-носителем. Воплощение 9 представляет собой композицию или иммуногенную композицию по воплощению 8, где по меньшей мере один дополнительный полисахаридный антиген выбран из группы, состоящей из полисахаридного антигена O1A E.coli, полисахаридного антигена O2 E.coli, полисахаридного антигена O6A E.coli, полисахаридного антигена O8 E.coli, полисахаридного антигена O15 E.coli, полисахаридного антигена O16 E.coli, полисахаридного антигена O18A E.coli, полисахаридного антигена O25B E.coli и полисахаридного антигена O75 E.coli. Воплощение 10 представляет собой композицию или иммуногенную композицию по воплощению 9, где (1) полисахаридный антиген O1A E.coli содержит структуру формулы (O1A)



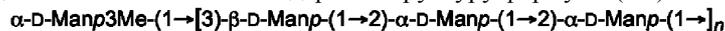
(2) полисахаридный антиген O2 E.coli содержит структуру формулы (O2)



(3) полисахаридный антиген O6AE.coli содержит структуру формулы (O6A)



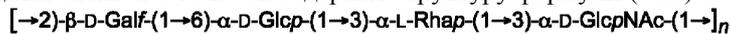
(4) полисахаридный антиген O8 E.coli содержит структуру формулы (O8)



(5) полисахаридный антиген O15 E.coli содержит структуру формулы (O15)



(6) полисахаридный антиген O16 E.coli содержит структуру формулы (O16)

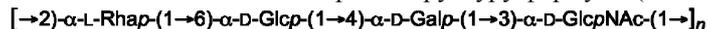


$$\uparrow 2$$

$$\uparrow$$

$$\text{Ac}$$

(7) полисахаридный антиген O18A E.coli содержит структуру формулы (O18A)



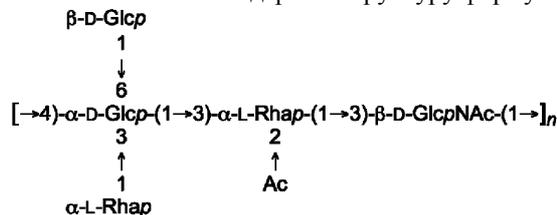
$$\uparrow 3$$

$$\uparrow$$

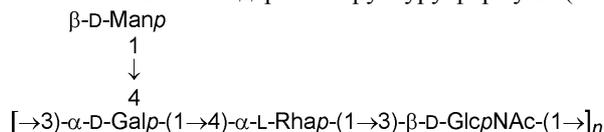
$$\uparrow$$

$$\beta\text{-D-GlcpNAc}$$

(8) полисахаридный антиген O25B E.coli содержит структуру формулы (O25B)



(9) полисахаридный антиген O75 E.coli содержит структуру формулы (O75)



где каждый n независимо представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20.

Воплощение 11 представляет собой композицию или иммуногенную композицию по воплощению 10, где каждый из дополнительных полисахаридных антигенов O1A, O2, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и/или O75 E.coli ковалентно связан с остатком Asp в сайте гликозилирования в каждом белке-носителе, содержащем консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 1, предпочтительно имеющую SEQ ID NO: 2.

Воплощение 12 представляет собой композицию или иммуногенную композицию по воплощению 11, где каждый белок-носитель представляет собой обезвреженный экзотоксин A Pseudomonas aeruginosa (EPA).

Воплощение 13 представляет собой композицию или иммуногенную композицию по воплощению 12, где каждый EPA содержит 1-10, предпочтительно 2-4 сайта гликозилирования, каждый из которых содержит консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 2.

Воплощение 14 представляет собой композицию или иммуногенную композицию по воплощению 12, где каждый EPA содержит четыре сайта гликозилирования, каждый из которых содержит консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 2.

Воплощение 15 представляет собой композицию или иммуногенную композицию по воплощению 12, где каждый EPA содержит SEQ ID NO: 3.

Воплощение 16 представляет собой композицию или иммуногенную композицию по любому из воплощений 9-15, которая содержит по меньшей мере полисахаридные антигены O1A, O2, гликозилированный O4, O6A и O25B E.coli, каждый из которых ковалентно связан с белком-носителем.

Воплощение 17 представляет собой композицию или иммуногенную композицию по любому из воплощений 9-15, которая содержит по меньшей мере полисахаридные антигены O1A, O2, гликозилированный O4, O6A, O8, O15, O16, O25B и O75 E.coli, каждый из которых ковалентно связан с белком-носителем.

Воплощение 18 представляет собой композицию или иммуногенную композицию по любому из воплощений 9-15, которая содержит по меньшей мере полисахаридные антигены O1A, O2, гликозилированный O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75 E.coli, каждый из которых ковалентно связан с белком-носителем.

Воплощение 19 представляет собой композицию, содержащую:

1. биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 E.coli, ковалентно связанного с обезвреженным экзотоксином A P.aeruginosa (белком-носителем ERA-4), содержащим SEQ ID NO: 3, где гликозилированный полисахаридный антиген O4 E.coli содержит структуру формулы (O4-Glc+);

2. биоконъюгат полисахаридного антигена O1A E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем ERA-4, где полисахаридный антиген O1A E.coli содержит структуру формулы (O1A);

3. биоконъюгат полисахаридного антигена O2 E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем ERA-4, где полисахаридный антиген O2 E.coli содержит структуру формулы (O2);

4. биоконъюгат полисахаридного антигена O6A E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем ERA-4, где полисахаридный антиген O6A E.coli содержит структуру формулы (O6A);

5. биоконъюгат полисахаридного антигена O8 E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем ERA-4, где полисахаридный антиген O8 E.coli содержит структуру формулы (O8);

6. биоконъюгат полисахаридного антигена O15 E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем ERA-4, где полисахаридный антиген O15 E.coli содержит структуру формулы (O15);

7. биоконъюгат полисахаридного антигена O16 E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем ERA-4, где полисахаридный антиген O16 E.coli содержит структуру формулы (O16);

8. биоконъюгат полисахаридного антигена O25B E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем ERA-4, где полисахаридный антиген O25B E.coli содержит структуру формулы (O25B); и

9. биоконъюгат полисахаридного антигена O75 E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем ERA-4, где полисахаридный антиген O75 E.coli содержит структуру формулы (O75);

где каждая из структур формул (O4-Glc+), (O1A), (O2), (O6A), (O8), (O15), (O16), (O25B) и (O75) показана в табл. 1, и каждый n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20.

Воплощение 20 представляет собой композицию по воплощению 19, дополнительно содержащую:

(10) биоконъюгат полисахаридного антигена O18A E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем ERA-4, где полисахаридный антиген O18A E.coli содержит структуру формулы (O18A), показанную в табл. 1, и n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20.

Воплощение 21 представляет собой способ индукции у субъекта антител против гликозилированного антигена O4 E.coli, включающий введение субъекту биоконъюгата по любому из воплощений 1-5 или композиции или иммуногенной композиции по любому из воплощений 6-20.

Воплощение 22 представляет собой способ по воплощению 21, где антитела обладают опсонофагоцитарной активностью.

Воплощение 23 представляет собой способ вакцинации субъекта против E.coli, в частности внекишечной патогенной E.coli (ExPEC), включающий введение субъекту биоконъюгата по любому из воплощений 1-5 или композиции или иммуногенной композиции по любому из воплощений 6-20.

Воплощение 24 представляет собой биоконъюгат по любому из воплощений 1-5 или композицию или иммуногенную композицию по любому из воплощений 6-20 для применения в индукции антител против гликозилированного антигена O4 E.coli.

Воплощение 25 представляет собой биоконъюгат по любому из воплощений 1-5 или композицию или иммуногенную композицию по любому из воплощений 6-20 для применения в вакцинации против внекишечной патогенной E.coli (ExPEC).

Воплощение 26 представляет собой рекомбинантную клетку-хозяина для получения биоконъюгата гликозилированного полисахаридного антигена O4 E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем, где гликозилированный полисахаридный антиген O4 содержит структуру формулы (O4-Glc+), показанную в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, клетка-хозяин содержит:

(1) нуклеотидную последовательность генного кластера gfb для полисахаридного антигена O4 E.coli

(2) нуклеотидную последовательность, кодирующую глюкозилтрансферазу, последовательность которой по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 4, где глюкозилтрансфераза способна модифицировать полисахаридный антиген O4 E.coli с получением гликозилированного полисахаридного антигена O4 E.coli;

(3) нуклеотидные последовательности, кодирующие транслоказу и глюкозилтрансферазу, последовательности которых по меньшей мере на 80% идентичны SEQ ID NO: 7 и 8, соответственно, где транслоказа способна транслоцировать бактопренол-связанную глюкозу, а глюкозилтрансфераза способна гликозилировать бактопренол;

(4) нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-носитель; и

(5) нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу, способную ковалентно связывать гликозилированный полисахаридный антиген O4 E.coli с белком-носителем с получением биоконъюгата.

Воплощение 27 представляет собой рекомбинантную клетку-хозяина по воплощению 26, где: глюкозилтрансфераза имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; олигосахарилтрансфераза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, предпочтительно SEQ ID NO: 6, содер-

жащую аминокислотную мутацию N311V, более предпочтительно SEQ ID NO:6, содержащую аминокислотные мутации Y77H и N311V; и белок-носитель содержит по меньшей мере один сайт гликозилирования, содержащий консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 1, предпочтительно имеющую SEQ ID NO: 2.

Воплощение 28 представляет собой рекомбинантную клетку-хозяина по воплощению 26 или воплощению 27, где белок-носитель выбран из группы, состоящей из обезвреженного экзотоксина A *P. aeruginosa* (EPA), флагеллина *E.coli* (FliC), CRM 197, мальтозосвязывающего белка (MBP), дифтерийного анатоксина, столбнячного анатоксина, обезвреженного гемолизина A *S.aureus*, агглютинирующего фактора A, агглютинирующего фактора B, термолабильного энтеротоксина *E.coli*, обезвреженных вариантов термолабильного энтеротоксина *E.coli*, субъединицы B холерного токсина (СТВ), холерного токсина, обезвреженных вариантов холерного токсина, белка Sat *E.coli*, домена-"пассажира" белка Sat *E.coli*, пневмолизина *Streptococcus pneumoniae*, гемоцианина *Megathura crenulata* (KLH), PcrV *P. aeruginosa*, белка внешней мембраны *Neisseria meningitidis* (OMPC) и белка D из нетипируемого *Haemophilus influenzae*.

Воплощение 29 представляет собой рекомбинантную клетку-хозяина по любому из воплощений 26-28, где белок-носитель представляет собой обезвреженный экзотоксин A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA).

Воплощение 30 представляет собой рекомбинантную клетку-хозяина по воплощению 29, где EPA содержит 1-10, предпочтительно 2-4 сайта гликозилирования, содержащих консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 2.

Воплощение 31 представляет собой рекомбинантную клетку-хозяина по воплощению 30, где белок-носитель представляет собой EPA с четырьмя консенсусными последовательностями гликозилирования (EPA-4), предпочтительно где белок-носитель содержит SEQ ID NO: 3.

Воплощение 32 представляет собой рекомбинантную клетку-хозяина по любому из воплощений 26-31, которая представляет собой клетку *E.coli*, например, штамм *E.coli* K-12, такой как штамм W3110.

Воплощение 33 представляет собой способ получения биоконъюгата гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, где гликозилированный полисахаридный антиген O4 *E.coli* содержит структуру формулы (O4-Glc⁺), показанную в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, способ включает культивирование рекомбинантной клетки-хозяина по любому из пп. 26-32 в условиях для продуцирования биоконъюгата.

Воплощение 34 представляет собой способ по воплощению 33, дополнительно включающий выделение биоконъюгата из рекомбинантной клетки-хозяина.

Воплощение 35 представляет собой биоконъюгат, полученный способом по воплощению 33 или 34.

Воплощение 36 представляет собой композицию, содержащую биоконъюгат по воплощению 35.

Воплощение 37 представляет собой способ получения рекомбинантной клетки-хозяина для получения биоконъюгата гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, где гликозилированный полисахаридный антиген O4 содержит структуру формулы (O4-Glc⁺), показанную в табл. 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, способ включает введение одной или более чем одной молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты в клетку для получения рекомбинантной клетки-хозяина, где рекомбинантная клетка-хозяин содержит:

(1) нуклеотидную последовательность генного кластера *gfb* для полисахаридного антигена O4 *E.coli*;

(2) нуклеотидную последовательность, кодирующую глюкозилтрансферазу, последовательность которой по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 4, где глюкозилтрансфераза способна модифицировать полисахаридный антиген O4 *E.coli* с получением гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli*;

(3) нуклеотидные последовательности, кодирующие транслоказу и глюкозилтрансферазу, последовательности которых по меньшей мере на 80% идентичны SEQ ID NO: 7 и 8, соответственно, где транслоказа способна транслоцировать бактопренол-связанную глюкозу, а глюкозилтрансфераза способна гликозилировать бактопренол;

(4) нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-носитель; и

(5) нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу, способную ковалентно связывать гликозилированный полисахаридный антиген O4 *E.coli* с белком-носителем с получением биоконъюгата.

Воплощение 38 представляет собой способ по воплощению 37, где глюкозилтрансфераза имеет SEQ ID NO: 4; олигосахарилтрансфераза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, предпочтительно SEQ ID NO: 6, содержащую аминокислотную мутацию N311V, и белок-носитель содержит по меньшей мере один сайт гликозилирования, содержащий консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 1, предпочтительно имеющую SEQ ID NO: 2.

Воплощение 39 представляет собой способ по воплощению 37 или воплощению 38, где белок-носитель выбран из группы, состоящей из обезвреженного экзотоксина A *P.aeruginosa* (EPA), флагеллина *E.coli* (FliC), CRM 197, мальтозосвязывающего белка (MBP), дифтерийного анатоксина, столбнячного

анатоксина, обезвреженного гемолизина *A. S.aureus*, агглютинирующего фактора А, агглютинирующего фактора В, термолabileного энтеротоксина *E.coli*, обезвреженных вариантов термолabileного энтеротоксина *E.coli*, субъединицы В холерного токсина (СТВ), холерного токсина, обезвреженных вариантов холерного токсина, белка Sat *E.coli*, домена-"пассажира" белка Sat *E.coli*, пневмолизина *Streptococcus pneumoniae*, гемоцианина *Megathura crenulata* (KLH), PcrV *P. aeruginosa*, белка внешней мембраны *Neisseria meningitidis* (ОМРС) и белка D из нетипируемого *Haemophilus influenzae*.

Воплощение 40 представляет собой способ по любому из воплощений 37-39, где белок-носитель представляет собой обезвреженный экзотоксин А *Pseudomonas aeruginosa* (ЕРА).

Воплощение 41 представляет собой способ по воплощению 40, где ЕРА содержит 1-10, предпочтительно 2-4 сайта гликозилирования, каждый из которых содержит консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 2.

Воплощение 42 представляет собой способ по воплощению 41, где белок-носитель представляет собой ЕРА с четырьмя консенсусными последовательностями гликозилирования (ЕРА-4), предпочтительно где белок-носитель содержит SEQ ID NO:

Воплощение 43 представляет собой способ по любому из воплощений 37-42, где клетка представляет собой клетку *E.coli*, например, штамма-*E.coli* K12, такого как штамм W3110.

Воплощение 44 представляет собой композицию по воплощению 19 или воплощению 20, где биоконъюгат полисахаридного антигена O25B присутствует в композиции в концентрации, которая приблизительно в 1,5-6 раз, например, приблизительно в 2-4 раза выше, чем концентрация любого из других биоконъюгатов.

Воплощение 45 представляет собой композицию по воплощению 44, где биоконъюгаты O1A:O2:гликозилированного O4:O6A:O8:O15:O16:O25B:O75 присутствуют в массовом соотношении полисахаридов 1:1:1:1:1:1:2:1 или 2:1:1:2:1:1:4:1.

Воплощение 46 представляет собой композицию по воплощению 44, где биоконъюгаты O1A:O2:гликозилированного O4:O6A:O8:O15:O16:O18A:O25B:O75 присутствуют в массовом соотношении полисахаридов 1:1:1:1:1:1:1:2:1 или 2:1:1:2:1:1:1:4:1.

Воплощение 47 представляет собой композицию по любому из воплощений 44-46, где концентрация биоконъюгата полисахаридного антигена O25B составляет от 2 до 50 мкг/мл, предпочтительно от 8 до 40 мкг/мл, например, от 16 до 32 мкг/мл.

Описание примеров осуществления изобретения

Следующие примеры предназначены для дополнительной иллюстрации сущности изобретения. Следует понимать, что приведенные ниже примеры не ограничивают объем изобретения и что объем изобретения определяется приведенной ниже формулой изобретения.

Пример 1. Эпидемиологические данные по инфекциям *E.coli*.

Чтобы определить распределение O-серотипов *E.coli*, вызывающих бактериемию, проводили глобальные мониторинговые исследования. В период с 2011 по 2017 год было собрано более 3200 изолятов кишечной палочки из крови пациентов 60 лет и старше, госпитализированных в странах Северной Америки, Европы, Азиатско-Тихоокеанского региона и Южной Америки. У каждого штамма анализировали серотип O-антигена с использованием классических методов агглютинации и проводили генотипирование O-антигена по последовательности. См. табл. 2. Изоляты из образцов крови человека проанализировали для определения патогенов в них и их паттернов устойчивости к антибиотикам. Изоляты *E.coli* были получены из образцов после анализа. Идентификацию *E.coli* подтверждали с помощью MALDI-TOF MS. Дальнейший анализ изолятов *E.coli* выполняли с использованием анализа агглютинации на основе антисыворотки для определения серотипа их O-антигена (DebRoy et al. (2011) *Animal health research reviews/Conference of Research Workers in Animal Diseases* 12, 169-185). Изоляты, не типизируемые методом агглютинации, дополнительно анализировали путем полногеномного секвенирования с последующим генотипированием O-антигена на основе последовательностей генов *wzy* и *wzx*, специфичных для серотипов O-антигена.

Таблица 2. Распределение наиболее распространенных O-серотипов *E.coli*, ассоциированных с бактериемией, из коллекции 3217 изолятов из образцов крови, собранных во всем мире в период с 2011 по 2017 год, на основе O-серотипирования посредством агглютинации и O-генотипирования изолятов, не типизируемых агглютинацией. Субъекты были госпитализированы в следующих странах: США, Канада, Аргентина, Бразилия, Великобритания, Германия, Испания, Италия, Нидерланды, Франция, Япония, Таиланд, Южная Корея и Австралия

О-Серотип	Распространение n (%)
O25	737 (22,9%)
O2	268 (8,3%)
O6	261 (8,1%)
O1	255 (7,9%)

O75	145 (4,5%)
O15	110 (3,4%)
O8	104 (3,2%)
O16	103 (3,2%)
O4	96 (3,0%)
O18	91 (2,8%)

Стратификация по географическому местоположению ассоциированной с бактериемией *E.coli* в мировом масштабе показала преобладание 10 основных O-серотипов независимо от местоположения, что позволяет предположить, что они являются преобладающими в мире O-серотипами, связанными с вызывающей бактериемией *E.coli*.

В мировом масштабе распространенность 10 основных O-серотипов среди изолятов ассоциированных с бактериемией *E.coli* с множественной лекарственной устойчивостью (n=345), то есть тех штаммов, которые устойчивы как минимум к трем классам клинически значимых противомикробных препаратов, составляет 75,4%. По совокупности данных эпидемиологического анализа, преобладающие 10 O-серотипов могут охватывать 60-80% бактериальных инфекций, ассоциированных с *E.coli*, с учетом охвата части нетипируемых штаммов.

Поливалентная вакцина, охватывающая значительную часть серотипов *E.coli*, вызывающих бактерию, была бы очень полезной. Таким образом, O-серотипы из табл. 2 могут быть хорошими кандидатами для поливалентной вакцины на основе O-антигена. Такую вакцину можно с успехом получить с использованием технологии биоконъюгации.

Одним из серотипов среди 10 основных (табл. 2) является O4. Таким образом, было бы полезно получить биоконъюгатную вакцину, которая включает полисахаридный O-антиген *E.coli* серотипа O4, связанный с белком-носителем.

Пример 2. Характеризация современных клинических изолятов O4 по генам, кодирующим ферменты, модифицирующие O-антиген.

Описаны два варианта полисахаридного антигена O4 *E.coli* (см., например, Jann B, et al., 1993, Carbohydr. Res. 248: 241-250), один из которых имеет неразветвленную структуру (структура показана в табл. 1 как (O4-Glc-)), а другой вариант замещен дополнительной боковой ветвью глюкозы (структура показана в табл. 1 как (O4-Glc+)). Доля этих двух вариантов, встречающихся среди современных клинических изолятов, была неизвестна. Хотя оба варианта реагируют с антисывороткой O4, также не было известно, существуют ли иммунологические различия между этими вариантами. Более того, фермент, ответственный за присоединение боковой ветви глюкозы для образования полисахаридного антигена (O4-Glc+), до сих пор не был идентифицирован, и его предполагаемая кодирующая последовательность, вероятно, находится за пределами генного кластера *gfb* O4.

Набор из 32 подтвержденных методом агглютинации клинических изолятов *E.coli* O4, исходно выделенных в период 2011-2012 гг. от субъектов в Соединенных Штатах и Европейском Союзе, проанализировали методом полногеномного секвенирования. Выделенные последовательности генного кластера *gfb* 32 отсеквенированных изолятов O4 выравнивали с последовательностями эталонного штамма и сравнивали на уровне нуклеотидов. За исключением некоторых встречающихся в природе однонуклеотидных полиморфизмов, все охарактеризованные изоляты имели кластер *gfb*, который был идентичен эталонному штамму O4, что указывает на то, что штаммы *E.coli* O4, независимо от их статуса ветвления Glc, несут идентичный кластер генов *gfb*. Таким образом, для создания полисахаридного антигена O4-Glc+ *E.coli*, вероятно, необходим ген с неизвестной последовательностью, который кодирует специфичный для *E.coli* O4 фермент ветвления и который должен находиться где-то за пределами кластера генов *gfb* *E.coli* O4. Последовательность этого неизвестного гена необходимо идентифицировать и использовать, если кто-то хочет получить биоконъюгаты с полисахаридными антигенами O4-Glc+ *E.coli* в штамме, который в противном случае будет продуцировать только биоконъюгаты с полисахаридными антигенами O4-Glc- *E.coli*. Затем данные полногеномного секвенирования анализировали на наличие генов вне кластера генов *gfb*, которые могут кодировать ферменты, модифицирующие O-антиген. Гомологи *gtrAB* у *Shigella flexneri* впервые были идентифицированы у *E.coli* O4. Открытая рамка считывания по ходу транскрипции от *gtrAB* в *E.coli* была предположительно идентифицирована как специфичный для *E.coli* O4 ген *gtrS*, который может кодировать предполагаемый обеспечивающий ветвление фермент *GtrS*, специфический для *E.coli* O4, ответственный за добавление глюкозной ветви к антигену O4 *E.coli*.

Аминокислотная последовательность фермента *GtrS*, специфичного для *E.coli* O4, представлена как SEQ ID NO: 4. Пример нуклеотидной последовательности, кодирующей данный белок, приведен как SEQ ID NO: 5.

Было обнаружено, что из охарактеризованных изолятов *E.coli* O4 примерно 80% несут идентифицированный здесь ген *gtrS* (26 из 32). Распространенность последовательности *gtrS*, специфичной для *E.coli* O4, также определяли с помощью ПЦР с использованием специфичных для последовательности

праймеров, в независимом наборе из 20 подтвержденных методом агглютинации клинических изолятов *E. coli* O4, выделенных в период 2014-2016 гг. от субъектов в Соединенных Штатах и Европейском Союзе. Этот анализ показал, что 17 из 20 изолятов несли последовательность *gtrS* O4, что соответствует распространенности 85%.

Пример 3. Клонирование *gtrS* O4 в *E. coli* W3110, получение и подтверждение структуры биоконъюгатов O4, модифицированных Glc.

Чтобы проверить, могут ли быть получены биоконъюгаты, содержащие полисахаридный антиген O4, модифицированный ответвляющейся глюкозой, сконструировали штаммы *E. coli* с предполагаемым ферментом, обеспечивающим ветвление, продуцирующие биоконъюгат антигена O4 и EPA. Для этого эндогенный ген *gtrS* O16 заменяли предполагаемым геном *gtrS* O4 (SEQ ID NO: 5, см. пример 2), а кластер *rfb* O16 в штамме *E. coli* W3110 Δ*wzzE-wecG* Δ*waaL* Δ*wbbI*-J-K заменяли кластером *rfb* O4 путем гомологичной рекомбинации. В альтернативном варианте в некоторых штаммах кластер *rfb* O4 кодировался плазмидой.

Затем в эти штаммы вводили плазмиды, кодирующие белок-носитель обезвреженный экзотоксин A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) (вариант, имеющий 2 или 4 консенсусных сайта гликозилирования, обозначаемый как "EPA-2" и "EPA-4", соответственно), и олигосахарилтрансферазу PglB. Биоконъюгаты O4-EPA, модифицированные Glc, получали путем культивирования штаммов-продуцентов *E. coli* в биореакторах и индукции экспрессии PglB и EPA с помощью IPTG и арабинозы, соответственно. Биоконъюгаты O4-EPA выделяли из периплазматического экстракта биомассы.

Для подтверждения подробного полисахаридного состава и связывания биоконъюгатов O4-EPA проводили несколько экспериментов ЯМР на биоконъюгатах, имеющих белок-носитель EPA-4 (данные не показаны). Отнесения сигналов согласовались с опубликованными в литературе (Jansson, P.E., et al., 1984, *Carbohydr. Res.* 134(2): 283-291; Jann B, et al., 1993, *Carbohydr. Res.* 248: 241-250). В спектре 1D, записанном при 313K, наблюдался интенсивный сигнал HOD и малоинтенсивные острые сигналы от пентасахаридных повторяющихся единиц (RU) O4 с пятью аномерными, двумя NAc и двумя H6 сигналами (Rha и FucNAc).

Отнесение сигналов протонов в одномерном эксперименте подтверждали с помощью двумерной протон-протонной корреляционной и протон-углеродной корреляционной спектроскопии ЯМР. Во-первых, двумерные эксперименты TOCSY (полная корреляционная спектроскопия) (120 мс) продемонстрировали ожидаемые кросс-пики у H1 и H6 (для Rha и FucNAc) пентасахаридной RU O4 и небольшие пики от концевой RU и EPA. В области метила в спектре TOCSY наблюдались кросс-пики у H6 с H1 для α-Rha и у H6 с H5 для α-FucNAc для RU O4. Другие наблюдавшиеся пики принадлежали аминокислотам EPA и концевой Rha (tRha). Во-вторых, углеродный ЯМР-спектр содержал хорошо рассредоточенные и обеспечивающие идентификацию одиночные пики для RU O4. Углероды были идентифицированы косвенно через присоединенные протоны с помощью эксперимента HSQC (гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия). Эксперимент HSQC-DEPT дал инвертированные пики для групп CH₂. В эксперименте HSQC наблюдались кросс-пики для пентасахаридной RU O4 [5 аномерных, кольцевых, две N-ацетильных и две метильных (Rha и FucNAc)] группы, а также аминокислот EPA в характерных областях. Каждую из пар протон/углерод для O4 оказалось возможным найти на основании отнесений сигналов протонов и данных литературы.

Таким образом, эксперименты по определению структурных характеристик подтвердили, что с применением предполагаемого гена *gtrS* *E. coli* O4, идентифицированного в примере 2, могут быть получены биоконъюгаты O4 с ответвлениями Glc (содержащие полисахаридные антигенные структуры, показанные в формуле (O4-Glc+) в табл. 1).

Пример 4. Иммуногенность биоконъюгата O4 с ответвлением Glc у кроликов.

Биоконъюгаты O4, модифицированного Glc (т.е. имеющие гликаны со структурой формулы (O4-Glc+), как показано в табл. 1) использовали для иммунизации кроликов с применением протокола "speedy-rabbit" (Eurogentec). Сыворотку иммунизированных кроликов анализировали методом ELISA на титры анти-O4 IgG против очищенного липополисахарида O4 (LPS) с (Glc+; т.е. содержащего гликозилированный полисахарид O4) или без ответвления Glc (Glc-; т.е. содержащего негликозилированный полисахарид O4). В результате иммунизации биоконъюгатом у обоих кроликов наблюдались высокие титры IgG (фиг. 1). В обоих случаях титры антител против Glc+ LPS, индуцированные биоконъюгатом O4, были выше, чем против Glc-LPS.

Также, объединяли сыворотки и использовали в исследованиях ELISA с цельными клетками и исследуемыми наборами изолятов *E. coli* O4 с охарактеризованным статусом *gtrS*. Протестировали пять *gtrS*-отрицательных (без ответвления Glc) и шесть *gtrS*-положительных (с ответвлением Glc) изолятов *E. coli* O4 и штамм, служивший отрицательным контролем. Объединенные сыворотки кроликов, иммунизированных биоконъюгатом O4, модифицированным Glc, содержали высокие титры IgG, специфически распознающих исследуемые изоляты O4 (фиг. 2). В соответствии с ELISA на LPS, все протестированные изоляты O4 распознавались антисыворотками. У *gtrS*-положительных изолятов в целом наблюдалось более интенсивное связывание, чем у *gtrS*-отрицательных изолятов (фиг. 2). В частности, следующие

изоляты были *gtrS*-положительными: Y1382, E551, OC24334, stGVXN4983, stGVXN4994 и OC24794, а следующие изоляты были *gtrS*-отрицательными: A2625, stGVXN4988, OC24784, OC24787 и OC24788. Антисыворотки не связывались со штаммом *E.coli* OC9487 неродственного O-серотипа (ATCC 35383), служившим отрицательным контролем.

Профили LPS, выделенного из исследуемого набора *gtrS*-положительных и отрицательных изолятов в окрашенных серебром полиакриламидных гелях, не позволили выявить заметных различий между изолятами, экспрессирующими немодифицированные и модифицированные формы антигена O4, подтверждая, что наблюдаемые различия не объясняются количественными различиями в уровнях экспрессии LPS (данные не показаны).

Вестерн-блоты экстрагированного LPS с использованием объединенной антисыворотки использовали для оценки распознавания O-антигена O4 иммуноглобулинами G, которые вырабатывались в ответ на иммунизацию биоконъюгатом O4, модифицированного Glc. Наблюдалось связывание как модифицированного, так и немодифицированного O4 LPS иммуноглобулинами G от кроликов, иммунизированных модифицированным O4, и включало специфическое распознавание полос LPS большого диапазона размеров, включая полосы LPS с высокой молекулярной массой (фиг. 3).

Если специально не указано иное, в дальнейших экспериментах, описанных ниже, когда упоминается биоконъюгат "O4" или штаммы-продуценты или "EcoO4", подразумевается биоконъюгат или продуцирующий штамм O4 с ответвлениями Glc (имеющий структуру гликана (O4-Glc+) в табл. 1), (таким образом, в этих экспериментах термины "O4" и "O4-Glc+", используются взаимозаменяемо для биоконъюгатов или продуцирующих штаммов).

Пример 5. Иммуногенность биоконъюгата O4 с ответвлением Glc у крыс.

Крыс Спрег-Доули (Sprague Dawley) иммунизировали 3 раза внутримышечно буфером для приготовления композиции или биоконъюгатом (O4-Glc+)-EPA (т.е. биоконъюгатом гликозилированного полисахаридного антигена O4, ковалентно связанного с белком-носителем EPA; белком-носителем был EPA-2, как описано в примере 3 выше) в 3 различных дозах (0,04, 0,40 или 4,0 мкг). Уровни антител в сыворотке измеряли с помощью ELISA на 0, 14 и 42 день после иммунизации. Иммунизация 0,04 мкг, 0,40 мкг и 4,00 мкг биоконъюгата (O4-Glc+)-EPA вызвала значительное повышение уровней антител IgG на 42 день после иммунизации по сравнению с буфером для композиции (фиг. 4A). Антитела, индуцированные (O4-Glc+)-конъюгатом, были функциональными, то есть способны опосредовать уничтожение штамма (O4-Glc+) *E.coli* (фиг. 4B).

Уровни антител, индуцированные 0,04, 0,40 и 4,0 мкг биоконъюгата (O4-Glc+)-EPA, значительно повышались на 42-й день по сравнению с исходным уровнем (42-й день по сравнению с 0-м днем, $P=0,006$ для всех доз) и на 14-й день после иммунизации (42-й день по сравнению с 14-м днем, $P=0,006$ для всех доз) (фиг. 5). В группе, получавшей 4,0 мкг биоконъюгата, титры также значительно повышались на 14-й день по сравнению с 0-м днем, что указывает на то, что однократная доза 4,0 мкг биоконъюгата (O4-Glc+)-EPA вызывает значительное увеличение титров IgG (14-й день по сравнению с 0-м днем, $P=0,012$). Значительное увеличение титров IgG, наблюдаемое между 14 и 42 днями, для всех трех протестированных концентраций биоконъюгата, показало, что третья доза биоконъюгата (O4-Glc+)-EPA способна усиливать гуморальные ответы (фиг. 5).

Функциональность антител, индуцированных конъюгатом O4-Glc+-EPA у крыс, иммунизированных внутримышечно 3 раза буфером для приготовления композиции или биоконъюгатом в дозе 4,00 мкг, определяли по опсонофагоцитарной активности (ОПКА) с использованием штаммов *E.coli* O4(Glu+) и O4(Glu-). Антитела, индуцированные биоконъюгатом (O4-Glc+)-EPA, были функциональными, т.е. способны опосредовать уничтожение штамма *E.coli* (O4-Glc+) (фиг. 4B, Фиг. 6). Примечательно, что антитела, индуцированные биоконъюгатом (O4-Glc+)-EPA, были способны опосредовать уничтожение как (O4-Glc+), так и (O4-Glc-), то есть штаммов *E.coli*, имеющих гликаны со структурой формулы (O4-Glc-) в табл. 1, т.е. O4 без ответвления Glc) (фиг. 6).

В заключение, антитела, индуцированные биоконъюгатом O4-Glc+-EPA, обладают перекрестной реактивностью и способны опосредовать гибель штаммов *E.coli* O4 с ответвлением глюкозы и без него.

Пример 6. Штаммы-продуценты биоконъюгатов O-антигена *E.coli* и полученные продукты биоконъюгатов.

Помимо биоконъюгатов (O4-Glc+)-EPA, полученных, как описано выше, были получены девять (9) других биоконъюгатов. В частности, дополнительно полученные биоконъюгаты включали биоконъюгат *E.coli* O1A-EPA, биоконъюгат O2-EPA, биоконъюгат O6A-EPA, биоконъюгат O8-EPA, биоконъюгат O15-EPA, биоконъюгат O16-EPA, биоконъюгат O18A-EPA, биоконъюгат O25B-EPA и биоконъюгат O75-EPA. Химические структуры гликанов этих конъюгатов можно увидеть в соответствующих формулах в табл. 1. Композиция, содержащая 10 биоконъюгатов, в данном документе обозначена как "ExPEC10V". Композиция, содержащая биоконъюгаты O1A-EPA, O2-EPA, O6A-EPA и O25B-EPA, в данном документе обозначена как "ExPEC4V" (и ранее была описана, например, в WO 2015/124769 и WO 2017/035181).

Родительский штамм *Escherichia coli* W3110.

Непатогенный штамм *E.coli* K12 W3110 использовали в качестве родительского штамма для создания всех десяти штаммов-продуцентов. Штамм *E.coli* K12 W3110 был получен из музея культур *E.coli*

(Yale University, New Haven (CT), USA, номер продукта CGSC#4474). Соответствующий генотип был описан ранее (E.coli W3110, F-, lambda-, IN(rrnD-rrnE)1, rph-1), а его геномная последовательность была опубликована ранее (Hayashi K, et al., 2006, Mol. Syst. Biol. 2006.0007 (doi:10.1038/msb4100049). Штамм E.coli W3110 был генетически модифицирован для обеспечения продукции каждого из биоконъюгатов О-антигена-E.coli (табл. 3).

Штаммы-продуценты биоконъюгатов.

Композиции "ExPEC4V" и "ExPEC10V" содержат биоконъюгаты O2-EPA и O25B-EPA из одних и тех же продуцирующих штаммов. Композиция "ExPEC4V" содержит биоконъюгат O1A-EPA из продуцирующих штаммов stGVXN4411 или stLMTB10217, тогда как композиция "ExPEC10V" содержит биоконъюгат O1A-EPA из продуцирующего штамма stLMTB10217. Композиция "ExPEC4V" содержит биоконъюгат O6A-EPA из продуцирующего штамма stGVXN4112, тогда как композиция "ExPEC10V" содержит биоконъюгат O6A-EPA из продуцирующего штамма stLMTB10923. Кроме того, композиция "ExPEC10V" содержит биоконъюгаты O4-EPA (т.е. (O4-Glc+)-EPA), O8-EPA, O15-EPA, O16-EPA, O18A-EPA и O75-EPA из продуцирующих штаммов, которые не используются для "ExPEC4V". Различные продуцирующие штаммы могут варьироваться в плазмидах для экспрессии белка-носителя EPA и/или олигосахарилтрансферазы PglB, как указано ниже. Обзор нескольких продуцирующих штаммов приведен в табл. 3 ниже.

Таблица 3. Сводные данные по генной инженерии штаммов-продуцентов E.coli для биоконъюгатов О-антигена для вакцинных композиций ExPEC4V и ExPEC10V

Серотип	Название штамма	Генные мутации			Плазмиды	
		Генный кластер <i>rfb</i>	<i>waal</i>	<i>gtrABS</i>	<i>pglB</i>	<i>epa</i>
O1A (ExPEC4V)	stGVXN4411	$\Delta rfb::O1A$ <i>rfb</i> upecGVXN_032	$\Delta waal$	-	pGVXN970	pGVXN1076
O1A (ExPEC4V; ExPEC10V)	stLMTB10217	$\Delta rfb::O1A$ <i>rfb</i> upecGVXN_032	$\Delta waal$	-	pGVXN122 1	pGVXN1076
O2	stGVXN4906	$\Delta rfb::O2$ <i>rfb</i> upecGVXN_116	$\Delta waal$	-	pGVXN971	pGVXN1076
O4	BVEC-L- 00684	$\Delta rfb::O4$ <i>rfb</i> CCUG11450	$\Delta waal$	$\Delta gtrS::gtrS$ O4	pGVXN121 7	pGVXN1076
O6A (ExPEC4V)	stGVXN4112	$\Delta rfb::O6A$ <i>rfb</i> CCUG11309	$\Delta waal$	-	pGVXN114	pGVXN659
O6A (ExPEC10V)	stLMTB10923	$\Delta rfb::O6A$ <i>rfb</i> CCUG11309	$\Delta waal$	-	pGVXN122 1	pGVXN1076
O8	stLMTB11734	$\Delta rfb::O8$ <i>rfb</i> E2420	$\Delta waal$	$\Delta gtrABS$	pGVXN970	pGVXN1076
O15	stLMTB11738	$\Delta rfb::O15$ <i>rfb</i> OC24891	$\Delta waal$	$\Delta gtrABS$	pGVXN122 1	pGVXN1076
O16	stLMTB11739	$\Delta rfb::O16$ <i>rfb</i> OC24208	$\Delta waal$	$\Delta gtrABS$	pGVXN238 1	pGVXN1076
O18A	BVEC-L- 00559	$\Delta rfb::O18A$ <i>rfb</i> OC24255	$\Delta waal$	$\Delta gtrABS$	pGVXN970	pGVXN1076
O25B	stGVXN4459	$\Delta rfb::O25B$ <i>rfb</i> upecGVXN_138	$\Delta waal$	$\Delta gtrABS$	pGVXN970	pGVXN1076
O75	stLMTB11737	$\Delta rfb::O75$ <i>rfb</i> CCUG31	$\Delta waal$	$\Delta gtrABS$	pGVXN121 7	pGVXN1076

Кластер генов биосинтеза О-антигена (*rfb*).

Во всех штаммах E.coli, продуцирующих О-антиген, природный геномный кластер генов биосинтеза O16::IS5 (*rfb*) E.coli W3110 заменяли выбранными кластерами генов специфического биосинтеза О-антигена из штаммов E.coli выбранного серотипа, кодирующих специфичные для серотипа структуры О-антигена (см. табл. 1 для этих структур О-антигена). после полногеномного анализа изолятов крови E.coli отобрали или подтвердили десять донорских кластеров *rfb*. Замена геномного кластера *rfb* O16::IS5 W3110,

который является дефектным по биосинтезу О-антигена, достигалась благодаря единственному акту гомологичной рекомбинации. В случае генных кластеров *gfb* O16 и O18A донорскую ДНК рекомбинировали через фланкирующие гены *gnd* и *rmlCA*, тогда как генный кластер *gfb* для других штаммов рекомбинировали через фланкирующие гены *gnd* и *galF*. Последовательности кластеров *gfb* в штаммах-продуцентах представлены в SEQ ID NO: 9 и 11-19.

Ген лигазы О-антигена (*waalL*).

Все штаммы *E.coli*, продуцирующие О-антиген, несут искусственно введенную делецию лигазы геномного О-антигена *E.coli* W3110, кодируемой геном *waalL*. В штаммах *AwaalL* нарушается перенос О-антигена на липид А, а вместо этого осуществляется перенос О-антигена на белок-носитель для увеличения выхода продукта.

Гены гликозилирования О-антигена (*gtrABS*).

В геномах штаммов-продуцентов *E.coli* O8, O15, O16, O18A, O25B и O75 осуществляли делецию генов *gtrABS* *E.coli* W3110, которые отвечают за гликозилирование О-антигена O16. В то время как гены *gtrA* и *gtrB* в разных серотипах высоко гомологичны и взаимозаменяемы, ген *gtrS* кодирует специфичную для серотипа О-антигена гликозилтрансферазу. В *E.coli* W3110 *GtrS* может переносить остаток глюкозы (Glc) на сахар GlcNAc в мотиве α -L-Rha-(1→3)-D-GlcNAc О-антигена O16 *E.coli*. В штаммах-продуцентах *E.coli* O1A, O2 и O6A делеция или замена гена *gtrABS* отсутствует. В этих О-антигенах отсутствует мотив α -L-Rha-(1→3)-D-GlcNAc, который является естественным субстратом для *gtrS* *E.coli* O16. В продуцирующем штамме *E.coli* O4 ген *gtrS* W3110 был заменен геном *gtrS* *E.coli* O4 для обеспечения правильного гликозилирования О-антигена O4 *E.coli*.

Олигосахарилтрансфераза *pglB*.

Все штаммы, продуцирующие О-антиген *E.coli*, экспрессировали вариант гликозилтрансферазы *PglB* *S. jejuni*, которая может переносить О-антиген на консенсусную аминокислотную последовательность на белке-носителе путем N-гликозилирования. *PglB* распознает широкий спектр субстратов, но из-за низкого выхода продукта были получены несколько продуцирующих штаммов, экспрессирующих вариант *PglB*, имеющий измененную субстратную специфичность, что привело к улучшенному выходу продукта (см., например, WO 2016/107818, WO 2016/107819). Ген *pglB* размещали на плазмиде после промотора, индуцируемого изопропил- β -D-тиогаляктопиранозидом (IPTG). В табл. 4 ниже перечислены варианты *PglB*, кодируемые плазмидами, которые использовали для получения штаммов, продуцирующих О-антиген *E.coli*, для биоконъюгатов для композиций ExPEC4V и ExPEC10V, описанных выше. Другие плазмиды с вариациями скелета вектора, маркера устойчивости к антибиотикам и/или альтернативных вариантов *PglB* также были успешно протестированы на предмет продукции биоконъюгатов.

Таблица 4. Плазмиды *PglB* и EPA, использованные в штаммах-продуцентах О-антигена *E.coli*

Название плазмиды	Ген	Описание ¹
pGVXN114	<i>pglB</i>	Использование кодонов <i>C. jejuni</i> ; SpR
pGVXN970	<i>pglB</i>	Использование кодонов оптимизировано для <i>E. coli</i> ; SpR
pGVXN971	<i>pglB</i> ^{N534Q}	Использование кодонов оптимизировано для <i>E. coli</i> ; природный сайт гликозилирования <i>PglB</i> инактивирован; SpR
pGVXN1217	<i>pglB</i> ^{N311V}	Использование кодонов оптимизировано для <i>E. coli</i> ; <i>PglB</i> с оптимизацией по субстрату; SpR
pGVXN1221	<i>pglB</i> ^{N311V,K482R,D483H,A669V}	Использование кодонов оптимизировано для <i>E. coli</i> ; <i>PglB</i> с оптимизацией по субстрату; SpR
pGVXN2381	<i>pglB</i> ^{Y77H,S80R,Q287P,K289R,N311V}	Использование кодонов оптимизировано для <i>E. coli</i> ; <i>PglB</i> с оптимизацией по субстрату; SpR
pGVXN659	EPA-4	EPA с четырьмя сайтами биоконъюгации; AmpR
pGVXN1076	EPA-4	EPA с четырьмя сайтами биоконъюгации; KanR

SpR - устойчивость к спектиномицину; AmpR - устойчивость к ампициллину; KanR - устойчивость к канамицину.

Белок носитель (ЕРА).

Все штаммы, продуцирующие О-антиген *E.coli*, экспрессировали в качестве белка-носителя для О-антигена генетически обезвреженный анатоксин АДФ-рибозилтрансферазу (ЕРА) *P. aeruginosa*. Анатоксин ЕРА отличается от токсина ЕРА дикого типа двумя остатками: Leu552 заменен на Val и осуществлена делеция Glu553 (в каталитическом домене). Сообщалось, что делеции Glu553 значительно снижают токсичность. В дополнение к мутации, устраняющей токсичность, были введены четыре консенсусных мотива сайта N-гликозилирования (ЕРА-4). Ген ера размещался на плазмиде после индуцибельного промотора L-арабинозы (Ara) (табл. 4). Табл. 4 ограничена плазмидами, использованными в штаммах-продуцентах биоконъюгатов, используемых в композициях "ExPEC4V" и "ExPEC10V", описанных выше. Плазмиды с вариациями остова вектора, маркера устойчивости к антибиотикам и/или вариантов ЕРА, например, различающиеся по количеству консенсусных мотивов сайта N-гликозилирования (например, имеющие два таких мотива, ЕРА-2), также были успешно протестированы на предмет продукции биоконъюгатов.

Пример 7. Оптимизация олигосахарилтрансферазы для создания биоконъюгатов с гликозилированным антигеном O4 (O4-Glc+).

Продукция биоконъюгата может быть оптимизирована путем модификации олигосахарилтрансферазы PglB *S.jejuni*, что может привести к более эффективному или более выраженному N-гликозилированию интересующего О-антигена с белком-носителем ЕРА. В штамме *E.coli* для продукции биоконъюгата с гликозилированным полисахаридным О-антигеном O4 (O4-Glc+) была применена такая стратегия оптимизации, которая позволила получить оптимизированный (O4-Glc+)-специфический вариант PglB, улучшив выход биоконъюгата.

В этом подходе штамм-продуцент полисахаридного О-антигена O4-Glc+, содержащий плазмиду, экспрессирующую ЕРА, трансформировали рядом различных плазмид, экспрессирующих PglB, каждая из которых содержала разные аминокислотные замены в белке PglB, изменяющих субстратную специфичность. Уровень продукции биоконъюгата и профиль каждого штамма оценивали на уровне встряхиваемых колб в экспериментах с осмотическим шоком, иммунологический анализ периплазматических экстрактов проводили методом капиллярного электрофореза с использованием для детекции O4-O1c+-специфических моноклональных антител.

Обнаружили, что один из исследуемых вариантов PglB, содержащий аминокислотную замену N311V, значительно улучшал выход гликозилированных биоконъюгатов O4 (фиг. 7А).

При дальнейшем усовершенствовании, когда вариант N311V PglB модифицировали дополнительно, аминокислотная замена Y77H дополнительно увеличивала O4-O1c+-специфичный выход продукта и повышала уровень ди- и тригликозилированного продукта по сравнению с вариантом N311V PglB, когда другие модификации оказывались нейтральными или оказывали отрицательное влияние на выход продукта (фиг. 7В). Плазида pLMTB4008 (SpR) кодирует вариант PglB с оптимизированной для *E.coli* частотой использования кодонов, оптимизированный по субстрату (O4-Glc+), содержащий мутации Y77H и N311V.

Обнаружили, что вариант PglB с оптимизированной субстратной специфичностью к полисахаридному О-антигену O4-Glc+, содержащий аминокислотные замены N311V и Y77H по сравнению с гликозилтрансферазой *S. jejuni* дикого типа PglB (wt), удваивает выход биоконъюгата по сравнению с вариантом PglB-N311V, оптимизированным в первом цикле.

Аналогичным образом с помощью скрининга также определили наиболее оптимальные по продуктивности варианты PglB для продукции биоконъюгата О-антигена *E.coli* других девяти серотипов в композиции ExPEC10V. Обнаружили, что PglB с аминокислотными мутациями N311V, K482R, D483H и A669V дает самый высокий выход биоконъюгатов, содержащих полисахаридный антиген O1A, O6A или O15.

Обнаружили, что PglB дикого типа (т.е. не имеющий аминокислотных мутаций в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669) дает самый высокий выход биоконъюгатов, содержащих полисахаридный антиген O2, O8, O18A или O25B. Обнаружили, что PglB с аминокислотными мутациями Y77H, S80R, Q287P, K289R и N311V дает самый высокий выход биоконъюгатов, содержащих полисахаридный антиген O16.

Обнаружили, что PglB с аминокислотной мутацией N311V дает самый высокий выход биоконъюгатов, содержащих полисахаридный антиген O75. Эти результаты свидетельствуют, что оптимальный вариант PglB различается для разных О-антигенов, и что невозможно предсказать оптимальный вариант PglB для получения биоконъюгата с заданным полисахаридным О-антигеном.

Пример 8. Биоконъюгаты О-антигенов из 10 серотипов *E.coli* и их качественные характеристики.

О-гликановые остатки О-антигенов-мишеней структурно разнообразны и имеют различные повторяющиеся единицы. Специфичность и аффинность гликозилтрансферазы PglB связана со структурой гликана. Таким образом, создание биоконъюгата с желаемыми качественными характеристиками, например, чистотой, соотношением гликан/белок и т.д., является сложной и непростой задачей. Правиль-

ная комбинация PglB и белка-носителя ЕРА определяет выход и может влиять на эффективность гликозилирования. Благодаря оптимизации PglB и белков-носителей получили биоконъюгаты, имеющие желаемые качественные характеристики. Также может быть важно поддерживать более низкое пороговое значение общего белка-носителя, особенно когда один или несколько биоконъюгатов О-антигена объединяют вместе и вводят в составе одной композиции или вакцины, поскольку очень большое количество белка-носителя может привести к иммунологическому взаимовлиянию. Чтобы избежать такого явления, предпочтительны конъюгаты с более высоким соотношением гликан/белок. Следовательно, для вакцины ExPEC10V были разработаны биоконъюгаты, по меньшей мере, с сопоставимой (с ранее описанной вакциной ExPEC4V, которая была предметом клинических испытаний) степенью гликозилирования. Каждый биоконъюгат получали путем культивирования соответствующих клеток-хозяев (пример 6, табл. 3) в биореакторах (объемом 10 и/или 200 л) и экспрессии биоконъюгатов, согласно ранее описанным способам. Каждое лекарственное вещество производили периодически путем бактериальной периодической ферментации с подпиткой для получения биомассы, содержащей экспрессированные биоконъюгаты полисахаридов соответствующего серотипа. Клетки культивировали и индуцировали IPTG (изопропилтио-галактозид) и арабинозой. Биоконъюгаты выделяли из периплазмы клеток в культурах биореактора путем осмотического шока с последующей хроматографической очисткой. Данный процесс осуществляли для каждого из 10 биоконъюгатов.

Полученные таким образом биоконъюгаты О-антигена E.coli, которые представляют собой лекарственные субстанции (ЛС) для ExPEC10V и ExPEC4V, показали сопоставимые основные показатели качества: (1) чистота, связанная с технологическим процессом (измеренная с помощью RP-HPLC), была выше 95%, (2) соотношение полисахарид/белок варьировало от 0,1 до 0,5, в основном от 0,15 до 0,45, (3) бактериальный эндотоксин (Европейская Фармакопея 2.2.3) составлял менее 0,5 ЕЭ/мкг полисахарида. Средняя длина отдельных полисахаридных цепей обычно составляла примерно 10-20 повторяющихся единиц (измерено с использованием SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия) высокого разрешения).

Было подтверждено, что структуры повторяющихся полисахаридных единиц (посредством ЯМР и тандемной масс-спектрометрии (MS/MS) интактных или расщепленных трипсином конъюгатов) соответствуют приведенным в Формулах для соответствующих серотипов в табл. 1, для всех десяти биоконъюгатов, которые являются ЛС для композиции ExPEC10V, описанной выше.

Среди десяти серотипов, биоконъюгаты которых были получены для композиции ExPEC10V, самый низкий выход биоконъюгата наблюдался у серотипа O18.

Лекарственный продукт (DP) ExPEC10V содержит смесь десяти моновалентных ЛС, описанных выше.

Пример 9. Токсикология вакцины ExPEC10V.

Пилотное исследование токсичности и местной переносимости однократной дозы ExPEC10V (не соответствующее требованиям GLP) проводили на самках кроликов NZW (новозеландские белые кролики). Одна группа (n=2) получала внутримышечную (в/м) инъекцию (в день 0) контроля (физиологический раствор), а вторая группа (n=4) получала внутримышечную инъекцию ExPEC10V в количестве 105,6 мкг общего полисахарида (PS)/дозу (9,6: 9,6: 9,6: 9,6: 9,6: 9,6: 9,6: 9,6: 19,2: 9,6 мкг PS на дозу, для О-серотипов O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75, соответственно), вводимый объем составлял 0,6 мл (176 мкг PS/мл). Некропсию производили на 2-й день. Смертности не наблюдалось. Кроме того, не отмечалось никаких связанных с вакциной явлений, регистрируемых для клинического наблюдения (включая явления в месте инъекции по шкале Дрейза), массы тела, потребления пищи и температуры тела. При гистологическом исследовании не наблюдалось связанных с вакциной патологических изменений в месте введения или дренирующем (подвздошном) лимфатическом узле. У одного из четырех животных, получавших воздействие (день 2) наблюдалось незначительное увеличение образования герминативных центров в селезенке, которое сочли нормальным иммунологическим ответом на введенную вакцину. В целом, введение однократной в/м дозы ExPEC10V самкам кроликов переносилось хорошо.

Пример 10. Иммуногенность смешанной композиции ExPEC10V у кроликов.

Ранее было показано, что вакцина ExPEC4V (содержащая биоконъюгаты E.coli серотипов O1A, O2, O6A и O25B) является иммуногенной для этих четырех серотипов у крыс, кроликов и людей (см., например, WO 2015/124769; WO 2017/035181; Huttner et al, 2017, Lancet Infect Dis, [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30108-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30108-1); RW Frenck Jr., et al., abstract 5587, ASM Microbe 2018). В примерах 4 и 5 выше была показана иммуногенность новых биоконъюгатов по изобретению, имеющих серотип гликозилированного O4 E.coli. Иммуногенность биоконъюгатов E.coli серотипов O8, O15, O16, O18A и O75 (все из которых в данном эксперименте содержат ЕРА-2 в качестве белка-носителя) при отдельном введении (моновалентном) крысам подтвердила, что каждый из этих биоконъюгатов также был иммуногенным, поскольку данные ELISA показали, что на каждый из этих биоконъюгатов могут в большом количестве вырабатываться антитела, специфичные к О-антигену E.coli (не показано). Также, исследовали иммуногенность 10-валентной вакцины, которая содержала смесь 10 биоконъюгатов, описанных выше. Новозеландские белые (NZW) кролики (самки в возрасте 12-16 недель) получали 3 внут-

римышечные иммунизации ExPEC10V или физиологический раствор, которые вводили с интервалом 2 недели (Табл. 5; введение в дни 0, 14 и 27). 10 полисахаридов, которые являются частью вакцины ExPEC10V, использованной в этих экспериментах, были конъюгированы с белком-носителем ЕРА, содержащим 4 сайта гликозилирования (ЕРА-4). Вакцину составляли в 3 различных дозах: Группа 1 ("высокая доза"): 8 мкг/дозу O1A, O2, O6A, O4, O8, O15, O16, O18 и O75 и 16 мкг/дозу O25B; Группа 2 ("средняя доза"): 4 мкг/дозу O2, O4, O8, O15, O16, O18 и O75, 8 мкг/дозу O1A и O6A и 16 мкг/дозу O25B; Группа 3 ("низкая доза"): 0,4 мкг/дозу O2, O4, O8, O15, O16, O18 и O75, 0,8 мкг/дозу O1A и O6A и 1,6 мкг/дозу O25B. Животные из контрольной группы (Группа 4) получали только физиологический раствор (0,9% (мас./об.) раствор хлорида натрия) (табл. 5). Уровни антител оценивали в день 0 (до иммунизации) и на 14, 27 и 42 дни (после иммунизации). Уровни сывороточных антител, индуцированные каждым из биокоъюгатов, включенным в вакцину, и белком-носителем ЕРА, измеряли с помощью ELISA (общий IgG) с использованием типоспецифичного LPS в качестве иммобилизуемого вещества. Титры антител представляли в виде значений ЕС50, которые соответствуют полумаксимальной эффективной концентрации, рассчитанной по кривым титрования, построенным по 12 разведениям в дубликатах с использованием четырехпараметрической логистической нелинейной регрессионной модели. Функциональную активность определяли по ОРК.

Таблица 5. Описание экспериментальных групп

Экспериментальные группы	Введение (мкг/PS) O1A:O2:O6A:O25B:O4:O8:O15:O16:O18A:O75	Размер выборки
Группа 1 (высокая доза)	8:8:8:16:8:8:8:8:8:8	7
Группа 2 (средняя доза)	8:4:8:16:4:4:4:4:4:4	7
Группа 3 (низкая доза)	0,8:0,4:0,8:1,6:0,4:0,4:0,4:0,4:0,4:0,4	7
Группа 4 (контроль)	0,9% (мас./об.) раствор хлорида натрия	7

Результаты показаны на фиг. 8 и обобщены в табл. 6.

Таблица 6. Сводные показатели выработки антител, специфических к O-антигену E.coli, у кроликов NZW в ответ на ExPEC10V

ExPEC10V	Гуморальный ответ на 14 день после вакцинации									
доза	O1A	O2	O6A	O25B	O4	O8	O15 [#]	O16	O18A	O75
высокая	*	**	**	*	**	ns	**	**	*	ns
средняя	*	**	**	**	**	ns	**	**	ns	ns
низкая	*	*	*	*	*	ns	**	**	ns	ns

ExPEC10V	Гуморальный ответ на 27 день после вакцинации									
доза	O1A	O2	O6A	O25B	O4	O8	O15 [#]	O16	O18A	O75
высокая	**	**	**	**	**	*	**	**	**	**
средняя	**	**	**	**	**	*	**	**	*	**
низкая	**	**	**	**	**	*	**	**	**	**

ExPEC10V	Гуморальный ответ на 42 день после вакцинации									
доза	O1A	O2	O6A	O25B	O4	O8	O15 [#]	O16	O18A	O75
высокая	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
средняя	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
низкая	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**

Темно-серыми прямоугольниками показаны серотип-специфические гуморальные ответы, для которых значения p были статистически значимыми. Светло-серыми прямоугольниками показаны серотип-специфические гуморальные ответы, для которых значения p не были статистически значимыми (ns). Критерий суммы рангов Уилкоксона с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. Сравнение животных, вакцинированных ExPEC10V (группы 1, 2 и 3), с контрольной группой, получавшей физиологический раствор (группа 4). *p < 0,05, **p < 0,01. * Значения P были статистически значимыми после исключения из контрольной группы выпадавших показателей одного животного (анализ чувствительности).

ExPEC10V в высокой дозе (группа 1) индуцировала значительно более высокие уровни антител IgG во все исследованные моменты времени (14, 27 и 42 дни после иммунизации) по сравнению с физиологическим раствором, служившим контролем, для O1A, O2, O4, O6A, O16, O18A и O25B (фиг. 8, табл. 6). Значительно более высокие титры антител, индуцированные конъюгатами O8 и O75, по сравнению с физиологическим раствором, служившим контролем, наблюдались на 27 и 42 дни после иммунизации (фиг. 8, табл. 6).

ExPEC10V в средней дозе (группа 2) и низкой дозе (группа 3) индуцировала значительно более вы-

сокие уровни антител IgG во все исследованные моменты времени (14, 27 и 42 дни после иммунизации) по сравнению с физиологическим раствором, служившим контролем, для O1A, O2, O4, O6A, O16 и O25B (фиг. 8, табл. 6). Значительно более высокие титры антител, индуцированные конъюгатами O8, O18A и O75, по сравнению с физиологическим раствором, служившим контролем, наблюдались на 27 и 42 дни после иммунизации, что позволяло предположить, что бустерная доза у кроликов усиливает ответ на эти O-серотипы (фиг. 8, табл. 6).

В случае конъюгатов O15, анализ чувствительности с исключением выпадающих показателей одного животного из контрольной группы показал, что все три дозы вакцины ExPEC10V вызывали существенное усиление гуморального ответа по сравнению с физиологическим раствором, служившим контролем, на 14, 27 и 42 дни после иммунизации (фиг. 8, табл. 6).

Антитела, индуцированные белком-носителем EPA, были значительно выше, чем титры антител EPA в группе, получавшей физиологический раствор (контрольной), для трех исследованных доз ExPEC10V (высокой, средней и низкой) во все исследуемые моменты времени (дни 14, 27 и 42) (фиг. 8).

Сравнение дозировок между собой (не показано) продемонстрировало, что на 14 день после вакцинации высокая доза ExPEC10V вызвала значительно более высокие гуморальные ответы по сравнению с низкой дозой для большинства протестированных конъюгатов (O1A, O2, O4, O6A, O15, O16, O18A и O25B). Средняя доза ExPEC10V также вызвала значительно более высокие гуморальные ответы по сравнению с низкой дозой для O1A, O2, O4, O18A, O25B и O75. Для конъюгата O8 все три композиции ExPEC10V индуцировали аналогичные уровни антител на 14 день после вакцинации.

Низкая доза ExPEC10V вызвала значительное усиление гуморального ответа на 42 день после вакцинации (после первичной и двух бустерных доз) по сравнению с высокой и средней дозами ExPEC10V для конъюгатов O1A, O2, O4, O16, O25B и O75.

Эти результаты согласуются с другим опытом с конъюгированными вакцинами, где, например, не наблюдалось четкой зависимости между дозой и величиной гуморального ответа на первичную вакцинацию у младенцев, вакцинированных пневмококковой конъюгированной вакциной (Poolman JT, et al. *Expert Rev Vaccines*. 2013, 12(12): 1379-94).

Для конъюгатов O6A, O8 и O15 на 42 день после вакцинации значимых различий между тремя исследованными дозами ExPEC10V не наблюдалось. Для конъюгата O18A высокая доза ExPEC10V вызвала значительно более выраженный гуморальный ответ по сравнению со средней дозой на 42 день после вакцинации.

Для белка-носителя (EPA) высокая и средняя доза ExPEC10V вызвала значительно более выраженный гуморальный ответ по сравнению со низкой дозой на 14 день после вакцинации. Высокая доза вакцины также вызвала значительно более выраженный гуморальный ответ по сравнению со низкой дозой на 42 день после вакцинации.

В заключение следует отметить, что три композиции ExPEC10V (высокая, средняя и низкая дозировки), вводимые посредством внутримышечной инъекции на 0, 14, 27 дни, являются иммуногенными для кроликов.

До сих пор функциональные антитела, способные уничтожать штаммы *E.coli*, индуцированные этой вакциной у кроликов, были показаны для серотипов O1A, O2, O4, O6A, O15, O16 и O25B.

В дополнительном эксперименте получали партию вакцины ExPEC10V, соответствующую требованиям GMP (производство см. в примере 8 выше), и вводили кроликам NZW в рамках токсикологического исследования (табл. 7). В этом исследовании кролики NZW (самцы и самки) получали 3 внутримышечные инъекции (0,6 мл) вакцины ExPEC10V (1, 15 и 29 день), а контрольная группа получала 0,9% (мас./об.) раствор хлорида натрия (физиологический раствор). Каждая доза вакцины содержала 9,6 мкг полисахарида (PS) для серотипов O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A и O75 и 19,2 мкг PS для серотипов O25B, что соответствует 105,6 мкг общего PS (176 мкг общего PS/мл) и 382,8 мкг общего EPA (638 мкг EPA/мл). Титры IgG против O-антигенов и белка-носителя (EPA) определяли в образцах, собранных в период до воздействия (день 1), а также на 31 и 50 дни после иммунизации.

Значительное усиление гуморального ответа против всех O-антигенов и белка-носителя EPA наблюдалось на 31 и 50 день после вакцинации в группе, получавшей ExPEC10V, по сравнению с контрольной группой, получавшей только физиологический раствор (фиг. 9, табл. 8). Для серотипа O1A значительно более выраженный гуморальный ответ наблюдался также в день 1 (исходный уровень), когда вакцинированных животных сравнивали с контрольными животными. Эти результаты позволяют предположить, что некоторые животные предварительно подвергались воздействию *E.coli* или имеют антитела, перекрестно реагирующие с O1A-LPS.

Таблица 7. Экспериментальные группы и доза ExPEC10V, использованная у кроликов NZW

Группы	Воздействие	Доза	Дни введения	Основн. (31 день) (самцы/самки)	Восстановление (50 день) (самцы/самки)
1	контроль	0	1, 15, 29	10	10
2	ExPEC10V	105,6 мкг PS*	1, 15, 29	10	10

*Каждая доза (вводимый объем 0,6 мл) содержит 9,6: 9,6: 9,6: 9,6: 9,6: 9,6: 9,6: 9,6: 19,2: 9,6 мкг полисахарида (PS) для серотипов O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B, O75, соответственно (176 мкг общего PS/мл). Каждая доза содержит 382,8 мкг белка ЕРА (638 мкг ЕРА/мл).

Таблица 8. Иммуногенность ExPEC10V у кроликов NZW в рамках токсикологического исследования

Воздействие	Гуморальные ответы на 31 день после вакцинации										
	ExPEC10V	O1A	O2	O6A	O25B	O4	O8	O15	O16	O18A	O75
31 день	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
50 день	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****

Гуморальные ответы, индуцированные ExPEC10V. Светло-серыми прямоугольниками показаны серотипы, для которых наблюдалось значительное усиление гуморальных ответов в вакцинированной группе по сравнению с контролем. Тобит-модель с критерием отношения правдоподобия **** $p \leq 0,0001$.

Пример 11. Исследование 1/2а фазы вакцины ExPEC10V у людей.

В настоящее время вакцин для предотвращения IED не существует. Серотипы, составляющие вакцину ExPEC10V (O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75), отбирали для решения проблемы инвазивных заболеваний, вызываемых большинством клинически значимых штаммов ExPEC, которые также представляют большинство изолятов ExPEC, вызывающих устойчивые к противомикробным препаратам IED, в том числе ST131. Выбранные серотипы являются репрезентативными для десяти преобладающих O-серотипов ExPEC, вызывающих инфекции циркулирующей крови у пожилого населения и отвечающих примерно за 70% инфекций циркулирующей крови, вызываемых ExPEC.

Поскольку не ожидается, что при профилактике инвазивных заболеваний механизм действия конъюгированных вакцин будет зависеть от механизмов устойчивости к антибиотикам, считается, что вакцина ExPEC10V обеспечивает защиту от IED, вызванных лекарственно-устойчивыми и чувствительными к лекарственным средствам серотипами O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75. Имеется предшествующий клинический опыт с ExPEC4V, более ранней вакциной-кандидатом, которая содержала набор из четырех конъюгатов O-антигена E.coli (O1A, O2, O6A и O25B), также присутствующих в ExPEC10V. Основываясь на результатах четырех клинических исследований (два завершённых исследования фазы 1, одно завершённое исследование фазы 2 и текущее исследование фазы 2), ExPEC4V хорошо переносилась участниками исследования, и при дозах до 16 мкг полисахарида (PS) на серотип (O1A, O2, O6A и O25B) никаких связанных с вакцинойстораживающих сигналов по безопасности не отмечалось. Большинство нежелательных явлений (НЯ) относились к 1 и 2 степени, сообщалось об очень небольшом количестве НЯ 3 степени. Полученные по запросу отсроченные местные НЯ (НЯ, которые начинаются после 5-го дня после вакцинации) наблюдались в основном при более высоких дозах ExPEC4V. В каждом исследовании было показано, что вакцина ExPEC4V является иммуногенной, демонстрируя дозозависимый иммунный ответ на вакцину, а титр иммуноглобулинов G (IgG), специфичных к O-антигену, возрастает, о чем свидетельствуют результаты иммуноферментного анализа (ELISA). Анализ опсонофагоцитарной активности (ОРКА), оптимизированный для ExPEC4V, продемонстрировал функциональную активность антител. Совместный анализ результатов ELISA и ОРКА показал корреляцию между результатами этих тестов (коэффициенты корреляции Пирсона $\geq 0,61$ и $\geq 0,48$ для дня 30 и дня 360, соответственно, в клиническом исследовании фазы 2 [исследование 4V-BAC2001]), обосновывая использование ELISA в качестве первичного измерения титров антител к ExPEC4V и для прогнозирования функциональной активности антител. Анализ данных по иммуногенности продемонстрировал стойкость иммунного ответа на протяжении трех лет после вакцинации ExPEC4V. На данный момент также показано, что сыворотки людей, вакцинированных ExPEC4V и имевших высокие титры серотип-специфичных опсонофагоцитарных антител, при пассивном переносе мышам, которых впоследствии внутрибрюшинно заражали штаммами E.coli серотипа O25B или O2, были способны обеспечивать защиту in vivo (не показано). Следовательно, ExPEC4V-специфические опсонофагоцитарные человеческие антитела опосредуют уничтожение бактерий in vivo, что согласуется с данными по другим конъюгированным вакцинам, у которых предложенный механизм защиты заключается в индукции опсонофагоцитарных антител, которые опосредуют уничтожение бактерий.

ExPEC10V включает в общей сложности десять серотипов и увеличивает охват с примерно 50% (ExPEC4V) до примерно 70% инфекций циркулирующей крови, вызываемых ExPEC, у взрослых в возрасте 60 лет и старше. На основании клинического опыта с ExPEC4V и доклинических данных для Ex-

PEC10V, обсуждавшихся в Примерах выше, ожидается, что введение ExPEC10V будет также вызывать иммунные ответы на E.coli серотипов O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75 у людей. Рандомизированное слепое исследование фазы 1/2a, впервые проводящееся у человека для оценки безопасности, реактогенности и иммуногенности трех различных доз вакцины ExPEC10V проводится на людях в возрасте от 60 до 85 лет в стабильном состоянии здоровья (исследование 10V-BAC1001). Схема исследования включает 2 когорты: всего в исследование включены 1004 участника, 404 участника (100 участников/дозу ExPEC10V) в возрасте от 60 (включительно) до 85 (включительно) лет в стабильном состоянии здоровья в когорте 1 и дополнительно 600 участников в возрасте 60 лет и старше в стабильном состоянии здоровья с ИМП в анамнезе за последние 5 лет в когорте 2.

ExPEC10V представляет собой разрабатываемую 10-валентную вакцину-кандидат для профилактики инвазивных заболеваний, вызываемых внекишечной патогенной Escherichia coli (ExPEC) (IED) у взрослых в возрасте 60 лет и старше. ExPEC10V состоит из полисахаридных (PS) O-антигенов серотипов ExPEC O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75, биоконъюгированных по отдельности с белком-носителем, генетически обезвреженной формой экзотоксина А (ЕРА), полученного из Pseudomonas aeruginosa, и его получение было описано выше. PS O4 представляет собой гликозилированную форму, имеющую структуру формулы (O4-Glc+) в табл. 1.

Задачи и конечные точки.

Когорта 1 - Фаза 1/2a, период с маскированием данных для исследователя с открытым периодом долгосрочного наблюдения (N=404)

Задачи	Конечные точки
Основные	
<ul style="list-style-type: none"> Оценка безопасности и реактогенности различных доз ExPEC10V у участников в возрасте ≥ 60 и ≤ 85 лет 	<ul style="list-style-type: none"> Полученные по запросу местные и системные нежелательные явления (НЯ), регистрируемые в течение 14 дней после вакцинации (с 1 дня до 15 дня) Сообщенные спонтанно НЯ, регистрируемые с момента введения исследуемой вакцины до 29 дня после вакцинации (с 1 дня до 30 дня) Серьезные нежелательные явления (НЯ), регистрируемые с момента введения исследуемой вакцины до 181 дня
<ul style="list-style-type: none"> Оценка дозозависимой иммуногенности ExPEC10V на 15 день у участников в возрасте ≥ 60 и ≤ 85 лет 	<ul style="list-style-type: none"> Титры антител к ExPEC10V, измеренные в мультиплексном иммуноанализе на основе электрохемилюминесценции (ECL) и мультиплексном анализе опсонофагоцитарной активности (MOPA) на 15 день
Второстепенные	
<ul style="list-style-type: none"> Оценка корреляции между сывороточными титрами, полученными в мультиплексном иммуноанализе на основе ECL (общие антитела) и MOPA (функциональные антитела) на 15 день 	<ul style="list-style-type: none"> Титры антител к ExPEC10V, измеренные в мультиплексном иммуноанализе на основе ECL и MOPA на 15 день
<ul style="list-style-type: none"> Оценка дозозависимой иммуногенности ExPEC10V на 30 и 181 день у участников в возрасте ≥ 60 и ≤ 85 лет 	<ul style="list-style-type: none"> Титры антител к ExPEC10V, измеренные в мультиплексном иммуноанализе на основе ECL и MOPA на 30 и 181 день

<ul style="list-style-type: none"> Оценка в периоде долгосрочного наблюдения (ДН) безопасности дозы ExPEC10V, выбранной для дальнейших клинических разработок на основе первичного анализа на 30 день у участников в возрасте ≥ 60 и ≤ 85 лет 	<ul style="list-style-type: none"> Серьезные НЯ, связанные с исследуемой вакциной или предусмотренными исследованием процедурами, от 182 дня и до конца исследования
<ul style="list-style-type: none"> Оценка в периоде ДН иммуногенности дозы ExPEC10V, выбранной для дальнейших клинических разработок на основе первичного анализа на 30 день 	<ul style="list-style-type: none"> Титры антител к ExPEC10V, измеренные в мультиплексном иммуноанализе на основе ECL и МОРА через 1 год (366 день), 2 года (731 день) и 3 года (1096 день)

Когорта 2 - двойной слепой период с двойным слепым долгосрочным периодом наблюдения (N=600)

Задачи	Конечные точки
Основные	
<ul style="list-style-type: none"> Оценка безопасности и реактогенности выбранной дозы ExPEC10V у участников в возрасте ≥ 60 лет с ИМП в анамнезе за последние 5 лет 	<ul style="list-style-type: none"> Полученные по запросу местные и системные НЯ, регистрируемые в течение 14 дней после вакцинации (с 1 дня до 15 дня) Сообщенные спонтанно НЯ, регистрируемые с момента введения исследуемой вакцины до 29 дня после вакцинации (с 1 дня до 30 дня) Серьезные НЯ, регистрируемые с момента введения исследуемой вакцины до 181 дня
<ul style="list-style-type: none"> Оценка иммуногенности выбранной дозы ExPEC10V на 30 день у участников в возрасте ≥ 60 лет с ИМП в анамнезе за последние 5 лет 	<ul style="list-style-type: none"> Титры антител к ExPEC10V, измеренные в мультиплексном иммуноанализе на основе ECL и МОРА на 30 день
Второстепенные	

<ul style="list-style-type: none"> Оценка корреляции между сывороточными титрами, полученными в мультиплексном иммуноанализе на основе ECL (общие антитела) и МОРА (функциональные антитела) на 30 день у участников в возрасте ≥ 60 лет с ИМП в анамнезе за последние 5 лет 	<ul style="list-style-type: none"> Титры антител к ExPEC10V, измеренные в мультиплексном иммуноанализе на основе ECL и МОРА на 30 день
<ul style="list-style-type: none"> Оценка иммуногенности выбранной дозы ExPEC10V на 15 и 181 день у участников в возрасте ≥ 60 лет с ИМП в анамнезе за последние 5 лет 	<ul style="list-style-type: none"> Титры антител к ExPEC10V, измеренные в мультиплексном иммуноанализе на основе ECL и МОРА на 15 и 181 день

Задачи	Конечные точки
<ul style="list-style-type: none"> Оценка в периоде ДН безопасности выбранной дозы ExPEC10V у участников в возрасте ≥ 60 лет с ИМП в анамнезе за последние 5 лет 	<ul style="list-style-type: none"> Серьезные НЯ, связанные с исследуемой вакциной или предусмотренными исследованием процедурами, от 182 дня и до конца исследования
<ul style="list-style-type: none"> Оценка в периоде ДН иммуногенности выбранной дозы ExPEC10V у участников в возрасте ≥ 60 лет с ИМП в анамнезе за последние 5 лет 	<ul style="list-style-type: none"> Титры антител к ExPEC10V, измеренные в мультиплексном иммуноанализе на основе ECL и МОРА через 1 год (366 день), 2 года (731 день) и 3 года (1096 день)
Поисковые	
<ul style="list-style-type: none"> Оценка влияния ExPEC10V на кишечный микробиом (стул) по результатам метагеномного анализа 	<ul style="list-style-type: none"> Метагеномный анализ образцов стула у отобранной подгруппы участников для оценки влияния ExPEC10V на: <ul style="list-style-type: none"> Распространенность патогенов (например, <i>Clostridium difficile</i>) в кишечной флоре Распространенность серотипов ExPEC10V в кишечной флоре

Общая схема исследования

Это рандомизированное многоцентровое интервенционное исследование, включающее две когорты.

Для когорты 1 исследование проводится с использованием активного препарата в качестве контроля, с маскированием данных для исследователя и включает в общей сложности 404 взрослых участника в возрасте от 60 и старше и до 85 лет включительно в стабильном состоянии здоровья с или без ИМП в анамнезе. Схема исследования для когорты 1 включает три периода: максимум 28-дневный период скрининга, 181-дневный период последующего наблюдения с маскированием данных для исследователя с вакцинацией в 1-й день и открытый период ДН, который длится со 182-го дня до 3 лет (1096 день) после вакцинации (фиг. 10А). Только участники из группы, получавшей выбранную дозу ExPEC10V (приблизительно 100 участников) и участники из группы Prevna13 переходят в период ДН. Окончание исследования для когорты 1 - это последний визит участника через 3 года (день 1096). Для когорты 2 исследование проводится с использованием плацебо в качестве контроля, с маскированием данных для исследователя и участников и включает в общей сложности 600 взрослых участников в возрасте 60 лет и старше в стабильном состоянии здоровья с ИМП в анамнезе за последние 5 лет. Набор начинается после завершения первичного анализа фазы 1/2а и выбора дозы ExPEC10V на когорте 1. Схема исследования для когорты 2 включает три периода: максимум 28-дневный период скрининга, двойной слепой 181-дневный период последующего наблюдения с вакцинацией в 1-й день и двойной слепой период ДН, который длится со 182-го дня до 3 лет (1096 день) после вакцинации (фиг. 10В). Все участники когорты 2 переходят в период ДН. Окончание исследования - это последний визит участника из когорты 2 через 3 года (день 1096).

Когорта 1. Фаза 1.

В фазе 1 всего к 84 участникам из когорты 1 применяли поэтапный подход с пошаговым увеличением дозы, проводя оценку безопасности перед переходом от одного этапа к другому. Внутреннему комитету по контролю данных (DRC) поручили провести это исследование, чтобы проанализировать дан-

ные объективного осмотра (исходные и целевые), исходные демографические данные и данные по безопасности на 14 день после вакцинации (включая полученные по запросу местные и системные НЯ, сообщаемые спонтанно НЯ, серьезные НЯ, данные клинических лабораторных исследований и показатели жизненно важных функций) этих 84 участников Фазы 1. На этом этапе исследования участников отбирали и рандомизировали в шесть этапов:

Этап 1. Отбирали и рандомизировали первую четверку участников; двоих участников в группу низкой дозы ExPEC10V (табл. 11) и по одному участнику в группы ExPEC4V и Plevnar 13.

Этап 2. Отбирали и рандомизировали 24 участника; 18 участников в группу низкой дозы ExPEC10V (табл. 11) и по три участника в группы ExPEC4V и Plevnar 13.

Этап 3. Отбирали и рандомизировали первую четверку участников; двоих участников в группу средней дозы ExPEC10V (табл. 11) и по одному участнику в группы ExPEC4V и Plevnar 13.

Этап 4. Отбирали и рандомизировали 24 участника; 18 участников в группу средней дозы ExPEC10V (табл. 11) и по три участника в группы ExPEC4V и Plevnar 13.

Этап 5. Отбирали и рандомизировали первую четверку участников; двоих участников в группу высокой дозы ExPEC 10V (табл. 11) и по одному участнику в группы ExPEC4V и Plevnar 13.

Этап 6. Отбирали и рандомизировали 24 участника; 18 участников в группу высокой дозы ExPEC10V (табл. 11) и по три участника в группы ExPEC4V и Plevnar 13.

В 1 день все участники получали однократную внутримышечную (в/м) инъекцию либо ExPEC10V (1 из 3 доз), либо ExPEC4V, либо Plevnar 13 в соответствии с группой вакцинации, в состав которой их включили в рамках исследования. С первой четверкой участников на каждом из этапов 1, 3 и 5 связывались по телефону через 24 ч после вакцинации для сбора информации о безопасности. Замаскированные данные о безопасности через 24 ч после вакцинации для первой четверки участников в каждой группе изучались главным исследователем (PI), ответственным врачом (SRP) и ведущим медицинским специалистом спонсора (SML). Рандомизация дополнительных участников для следующего этапа приостанавливалась до завершения оценки безопасности на 2 день в первых четверках участников.

В отсутствие каких-либо клинически значимых отклонений включали еще 24 участника (для этапов 2, 4 и 6) и рандомизировали в одну из трех исследуемых групп вакцинации (табл. 11) для получения одной в/м инъекции либо ExPEC10V (1 из 3 доз), ExPEC4V или Plevnar 13 в 1 день.

После вакцинации дополнительных 24 участников для каждой величины дозы (низкая доза на этапе 2, средняя доза на этапе 4 и высокая доза на этапе 6), DRC анализировал данные по безопасности на 14 день после вакцинации у всех 28 (4+24) участников для каждой величины дозы перед переходом к следующей величине дозы или к Фазе 2а.

Когорта 1. Фаза 2а.

На основании приемлемой безопасности и реактогенности (при отсутствии каких-либо проблем с безопасностью или каких-либо событий, соответствующих определенным правилам приостановки исследования), установленным DRC после анализа данных по безопасности на 14 день после вакцинации для первых 84 участников, рандомизировали оставшихся 320 участников из когорты 1 были и осуществляли введение в рамках фазы 2а исследования. Эти дополнительные 320 участников включали в исследование и рандомизировали параллельно в соотношении 2:2:2:1:1 в одну из пяти исследуемых групп вакцинации для получения в день 1 однократной внутримышечной инъекции либо ExPEC10V (1 из 3 доз), либо ExPEC4V или Plevnar 13 (табл. 11). Помимо анализа безопасности на 14 день у первых 84 участников DRC также оценивает данные по безопасности в когорте 1 в ходе исследования и рассматривает любые события, которые соответствуют определенному правилу приостановки исследуемой вакцинации или любые другие проблемы с безопасностью, которые могут возникнуть.

Для когорты 1 первичный анализ проводится, когда все участники совершили визит на 30-й день (4 визит) или прервали участие в исследовании раньше. Окончательный анализ проводится, когда все участники совершили визит на 181-й день или прервали участие в исследовании раньше. Для участников, переходящих к открытому периоду долгосрочного наблюдения (ДН) (группа с выбранной дозой ExPEC10V и группа Plevnar 13), ежегодные контрольные анализы включают данные по безопасности и иммуногенности (мультиплексный иммуноанализ на основе ECL и МОРА) во время посещения через 1 год (366 день), 2 года (731 день) и 3 года (1096 день) после вакцинации.

Когорта 2.

В когорте 2 безопасность, реактогенность и иммуногенность выбранной дозы ExPEC10V (на основе результатов первичного анализа когорты 1) оценивали у участников в возрасте 60 лет и старше со стабильным состоянием здоровья и ИМП в анамнезе за последние 5 лет. Для когорты 2 исследование проводится с использованием плацебо в качестве контроля, с маскированием данных для исследователя и участников и включает в общей сложности 600 участников, рандомизированных параллельно в соотношении 2:1 (400 участников в группе ExPEC10V и 200 в группе плацебо).

В 1 день все участники получают однократную в/м инъекцию либо выбранной дозы ExPEC10V, либо плацебо в соответствии с группой вакцинации, в состав которой их включили в рамках исследования (табл. 12).

Для когорты 2 первичный анализ включает данные по безопасности и иммуногенности и проводит-

ся, когда все участники совершили визит на 30-й день (4 визит) или прервали участие в исследовании раньше. Окончательный анализ проводится, когда все участники совершили визит на 181-й день или прервали участие в исследовании раньше. Для участников ежегодные контрольные анализы включают данные по безопасности и иммуногенности (мультиплексный иммуноанализ на основе ECL и МОРА) во время посещения через 1 год (366 день), 2 года (731 день) и 3 года (1096 день) после вакцинации.

Исследование образцов стула проводится у отобранной подгруппы участников для оценки влияния ExPEC10V на распространенность патогенов (например, *Clostridium difficile*) и серотипов ExPEC10V в кишечной флоре с применением метагеномного анализа.

Количество участников.

Всего в исследовании приняли участие 1004 участника; 404 участника в когорте 1 и 600 участников в когорте 2.

Группы воздействия.

Описание воздействия.

ExPEC10V. Биоконъюгированная вакцина *E.coli* в фосфатном буферном растворе, содержащая PS O-антиген серотипов ExPEC O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75, биоконъюгированных по-отдельности с белком-носителем ERA.

Однократная в/м (в дельтовидную мышцу) инъекция 0,5 мл одной из трех доз ExPEC10V в день 1.

ExPEC4V. Биоконъюгированная вакцина *E.coli* в физиологическом буферном растворе, содержащая PS O-антиген серотипов ExPEC O1A, O2, O6A, O25B (4:4:4:8 мкг PS/серотипы ExPEC), биоконъюгированных по-отдельности с белком-носителем ERA.

Однократная в/м (в дельтовидную мышцу) инъекция 0,5 мл ExPEC4V в день 1.

Pnevna 13. Стерильная суспензия сахаридов капсульных антигенов *Streptococcus pneumoniae* серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F, по-отдельности связанных с нетоксичным дифтерийным белком CRM197. Однократная в/м (в дельтовидную мышцу) инъекция 0,5 мл, поставляемая в предварительно заполненном шприце, содержащем одну дозу.

Плацебо: физиологический раствор. Однократная в/м (в дельтовидную мышцу) инъекция 0,5 мл плацебо в день 1.

Материалы исследования ExPEC описаны в табл. 9.

Таблица 9. Исследуемые вакцины BAC1001MV (ExPEC4V)

Группа воздействия	O1A (мкг)	O2 (мкг)	O4 (мкг)	O6A (мкг)	O8 (мкг)	O15 (мкг)	O16 (мкг)	O18A (мкг)	O25B (мкг)	O75 (мкг)	ERA (мкг)	PS (сумма -рно) (мкг)
Низкая доза ExPEC10V	4	4	4	4	4	4	4	4	8	4	160	44
Средняя доза ExPEC10V	8	4	4	8	4	4	4	4	16	4	221	60
Высокая доза ExPEC10V	8	8	8	8	8	8	8	8	16	8	320	88
ExPEC4V	4	4	-	4	-	-	-	-	8	-	72	20

ERA - генетически обезвреженная форма экзотоксина A, полученная из *Pseudomonas aeruginosa*; PS-полисахарид;

ExPEC4V состоит из полисахаридных (PS) O-антигенов серотипов ExPEC O1A, O2, O6A и O25B, по-отдельности биоконъюгированных с белком-носителем ERA;

ExPEC10V состоит из полисахаридных (PS) O-антигенов серотипов ExPEC O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75, по-отдельности биоконъюгированных с белком-носителем ERA. Доза определяется только PS. ERA (мкг) - измеренные значения;

ExPEC10V состоит из 10 одновалентных лекарственных субстанций (ЛС). Для этого клинического исследования производятся 2 различные концентрации (средняя и высокая) лекарственного препарата (DP) (табл. 10). Третью (низкую) концентрацию получают в клинике путем разбавления высокой концентрации 1:1 буфером для разведения, который совпадает с буфером для приготовления композиции. Каждый DP готовят в натрий-калиевом фосфатном буфере с pH 7,0 (0,02% [мас./мас.] Полисорбата 80, 5% [мас./мас.] сорбита, 10 мМ метионина).

Таблица 10. Состав вакцины ExPEC10V для клинического исследования фазы 1/2a

Ингредиент	Количество (мкг/мл) ^a		
Активный ^a	Низкая концентрация ^b	Средняя концентрация	Высокая концентрация
<i>Полисахаридный антиген</i>	<i>O-</i>		
EcoO1A	8	16	16
EcoO2	8	8	16
EcoO4	8	8	16
EcoO6A	8	16	16
EcoO8	8	8	16
EcoO15	8	8	16
EcoO16	8	8	16
EcoO18A	8	8	16
EcoO25B	16	32	32
EcoO75	8	8	16
<i>Белок-носитель</i>			
ЕРА	320	441	640
<i>Экципиенты</i>			
КН ₂ РО ₄		6,19 мМ	
Na ₂ НРО ₄		3,81 мМ	
Сорбит		5% (масс./масс.)	
Метионин		10 мМ	
Полisorбат 80		0,02% (масс./масс.)	

ЕРА - генетически обезвреженный экзотоксин *A. P.aeruginosa*, используемый в качестве белка-носителя;

^a активный ингредиент представляет собой биологически синтезированный конъюгат, состоящий из PS антигена и белка-носителя (ЕРА); доза рассчитывается только по PS группировке;

^b "низкую концентрацию" получают в клинике путем разбавления "высокой концентрации" 1:1 буфером для разведения.

Оценка безопасности

Ключевые оценки безопасности включают полученные по запросу местные и системные НЯ, сообщаемые спонтанно НЯ, серьезные НЯ, данные объективного осмотра, показатели жизненно важных функций и клинических лабораторных исследований.

Оценка иммуногенности

Ключевые оценки иммуногенности собранных сывороток включают оценку уровней общих антител IgG, специфичных для серотипов ExPEC10V и ExPEC4V, вызванных вакциной, при измерении с помощью мультиплексного иммуноанализа на основе ECL, и функциональных антител, специфичных для серотипов ExPEC10V и ExPEC4V, при измерении с помощью анализа опсонофагоцитарной активности (ОРКА) в мультиплексном формате (МОРА). Оценка иммуногенности титров антител к пневмококку, вызванных Pnevpar 13, не производится.

Уровни сывороточных антител, индуцированных ExPEC10V, измеряют с помощью мультиплексного иммуноанализа на основе электрохемилюминесценции (ECL). Этот анализ выполняют в 96-луночных микропланшетах, где в каждой лунке находятся угольные электроды с высоким связыванием, на поверхности которых в виде отдельных пятен иммобилизованы различные антигены O-LPS *E.coli* или белок-носитель ЕРА. Уровни антиген-специфических антител, присутствующих в образцах сыворотки, определяют с помощью вторичного антитела (против IgG человека), меченного SULFO-TAG. При электрической стимуляции SULFO-TAG излучает свет, интенсивность которого возрастает пропорционально количеству связанных антител IgG. Данный анализ отвечает требованиям, указанным в рекомендациях Международной конференции по гармонизации (ICH).

Уровни функциональных антител, индуцированных ExPEC10V, измеряют с помощью мультиплексного анализа опсонофагоцитарной активности (МОРА). Вкратце, готовят серию разведений инактивированных нагреванием образцов сыворотки и инкубируют с различными штаммами *E.coli*, которые специфически устойчивы к различным типам антибиотиков. После этого в реакцию добавляют человеческий комплемент и фагоцитарные клетки (HL60) и после второго периода инкубации переносят аликвоту реакционной смеси в различные фильтровальные планшеты с гидрофильной мембраной PVDF, содер-

жащие среду, в которую добавлен определенный антибиотик, который избирательно способствует росту штамма, устойчивого к данному антибиотику. После выращивания в течение ночи подсчитывают колониеобразующие единицы (КОЕ), чтобы определить количество выживших бактерий. Данный анализ отвечает требованиям, указанным в рекомендациях ICH.

Для антител к серотипам ExPEC10V, измеренным с помощью мультиплексного иммуноанализа на основе ECL и MORA, а также к EPA, измеренным только с помощью мультиплексного иммуноанализа на основе ECL, оценивают следующие показатели иммуногенности и заносят в таблицы по исследуемым группам вакцинации для всех моментов времени, в которых определяют иммуногенность:

доля участников с ≥ 2 -кратным и ≥ 4 -кратным увеличением титров сывороточных антител с 1-го дня (до вакцинации);

средний геометрический титр (GMT);

GMR: кратность изменения от базового уровня, рассчитанное по отношению значений после базового уровня к значениям базового уровня.

Для периода ДН для каждого серотипа представляют обобщенный описательный анализ иммуногенности.

При выборе дозы для более поздних фаз учитывают совокупность данных, имеющихся на момент первичного анализа когорты 1 (результаты 30-го дня).

Таблица 11. Когорта 1: схема вакцинации

		Фаза 1						Фаза 2а	Суммарно
		Этап 1	Этап 2	Этап 3	Этап 4	Этап 5	Этап 6	Этап 7	
Исследуемая группа вакцинации	Вакцинация в 1-й день	Первые участники (низкая доза)	Дополнительные участники (низкая доза)	Первые участники (средняя доза)	Дополнительные участники (средняя доза)	Первые участники (высокая доза)	Дополнительные участники (высокая доза)	Дополнительные участники фазы 2а	
G1	Низкая доза ExPEC 10V*	2	18					80	100
G2	Средняя доза ExPEC 10V*			2	18			80	100
G3	Высокая доза ExPEC 10V*					2	18	80	100
G4	ExPEC 4V**	1	3	1	3	1	3	40	52
G5	Prevnar 13***	1	3	1	3	1	3	40	52
Суммарно		4	24	4	24	4	24	320	404

* ExPEC10V состоит из полисахаридных (PS) O-антигенов серотипов ExPEC O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75, биоконъюгированных по-отдельности с белком-носителем, генетически обезвреженной формой экзотоксина А (EPA), полученного из *Pseudomonas aeruginosa*.

** ExPEC4V состоит из полисахаридных (PS) O-антигенов серотипов ExPEC O1A, O2, O6A и O25B, биоконъюгированных по-отдельности с белком-носителем, генетически обезвреженной формой экзотоксина А (EPA), полученного из *Pseudomonas aeruginosa*.

*** Prevnar 13, пневмококковая 13-валентная конъюгированная вакцина (дифтерийный белок CRM197) представляет собой стерильную суспензию сахаридов капсульных антигенов *Streptococcus pneumoniae* серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F, по-отдельности связанных с не-токсичным дифтерийным белком CRM197.

Таблица 12. Когорта 2: схема вакцинации

Исследуемая группа вакцинации	Вакцинация в 1-й день	Суммарно
G6	ExPEC10V ^a	400
G7	Плацебо	200
Суммарно		600

* ExPEC10V состоит из полисахаридных (PS) O-антигенов серотипов ExPEC O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75, биоконъюгированных по-отдельности с белком-носителем, генетически обезвреженной формой экзотоксина A (EPA), полученного из *Pseudomonas aeruginosa*.

Участников, включенных в когорту 2 исследования, рандомизировали в соотношении 2:1 (ExPEC10V:плацебо). Доза ExPEC10V, используемая в когорте 2, основана на результатах первичного анализа (день 30) когорты 1.

Статус.

Набор и вакцинация когорты 1 описанного выше исследования завершены.

Исследование проводится с маскированием данных. На основании текущего анализа данных о безопасности серьезных проблем с безопасностью выявлено не было, и вакцина ExPEC10V имеет приемлемый профиль безопасности.

Анализ иммуногенности клинических образцов когорты 1 проводится с маскированием данных. Данные ECL на 100% прошли проверку на соответствие приемлемому уровню качества (AQL) и были загружены для обработки данных. Анализ образцов МОРА продолжается. Демаскирование данных и статистический анализ выполняются с привлечением организации по клиническим исследованиям (CRO). Вакцинация Когорты 2 начинается после определения дозы ExPEC10V для этой Когорты на основании окончательного первичного анализа результатов 30-го дня для Когорты 1.

Специалистам в данной области техники понятно, что воплощения, описанные выше, могут быть модифицированы без изменения сущности изобретения. Поэтому понятно, что это изобретение не ограничивается конкретными раскрытыми воплощениями, но также охватывает модификации, которые соответствуют сущности данного изобретения, изложенного в данном описании, и входят в объем данного изобретения.

Последовательности**SEQ ID NO: 1** (Консенсусная последовательность гликозилирования)

Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой, за исключением Pro

SEQ ID NO: 2 (оптимизированная консенсусная последовательность гликозилирования)

Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой аминокислоты, за исключением Pro

SEQ ID NO: 3 (белок-носитель EPA, содержащий 4 консенсусные последовательности гликозилирования (EPA-4))

G SGGG**DQ**NATG SGGGKLAEEA FDLWNECAKA CVLDLKDGVV SSRMSVDPAI ADTNGQGVVH YSMVLEGGND
 ALKLAIDNAL SITSDGLTIR LEGGVEPNKP VRYSYTRQAR GSWSLNWLVP IGHEKPSNIK VFIHELNAGN
 QLSHMSPIYT IEMGDELLAK LARDATFFVR AHESNEMQPT LAISHAGVSV VMAQAQPRRE KRWSEWASGK
 VLCLLDPLDG VYNYLAQQRC NLDDTWEGKI YRVLAGNPAK HDLDIK**DNN** **ST**PVTIVISHRL HFPEGGSLAA
 LTAHQACHLP LEAFTRHRQP RGWEQLEQCG YPVQRLVALY LAARLSWNQV DQVIRNALAS PGSGGDLGEA
 IREQPEQARL ALTLAAAESE RFVRQGTGND EAGAASADV SLTCPVAK**DQ** **NRT**KGECAGP ADSGDALLER
 NYPTGAFLG DGGDVSFSTR GTQNWTVVERL LQAHRLQLEER GYFVGYHGT FLEAAQSIVF GGVRRASQDL
 DAIWRGFYIA GDPALAYGYA QDQEPDARGR IRNGALLRVY VPRWSLPGFY RTGLTLAAPE AAGEVERLIG
 HPLFLRLDAI TGPEEEGGRV TILGWPLAER TVVIPSAPT DPRNVGGDLD PSSIPDKEQA ISALPDYASQ
 PGKPPREDLK LGGGG**DQ**NA T

SEQ ID NO: 4 (аминокислотная последовательность GtrS O4)

MNNLIMNWCCKLSIFIIAIFILLWLRDPDILTNAQFWAEDSVFWYKDAYENGFLLSLLTTPRNGYFQTVSTFIVGLT
 ALLNPDYAPFVSNFFGIMIRSVI IWFLFTEFNFLLTTRIFLSIYFLCMPGLDEVHANITNAHWYLSLYVSMIL
 IARNPSSKSWRFHDI FFILLSGLSGPFI IFILAASCFFINCKDHSVRSFINFYLRQPYALMIVCALIQGTSI
 ILTFNGTRSSAPLGFSDVSISSIISSNIFLFTFVPWDIAKAGWDNLLLSYFLSVSILSCAAAFVVKGTWRMKVFA
 TPLLLIIIFSMAPQLTDSAPQLPTLINGQGSRYFVNIHIAIFSLLCVYLLECVRGKVATLFSKIYLTILLFVMG
 CLNFVITPLPNMNWREGATLINNAKTGDVISIQVLPPLTLELRKK

SEQ ID NO: 5 (Пример нуклеотидной последовательности *gtrS* O4)

ATGAATAATTTAATTATGAATAACTGGTGTAATTTATCTATAATTTATATTGCATTTATTTTGCSTATGGCTTAGA
 AGGCCGGATATACTCACAACGCACAATTTTGGGCAGAAGATTCGGTTTTCTGGTATAAGGACGCCTATGAGAAC
 GGATCTTAAGTTCACSTAACAACGCCTAGGAATGGGTATTTCCAGACTGTTTCTACATTTATAGTTGGTCTGACT
 GCTTTATTAATCCAGATTATGCACCTTTTGTCTTAATTTTTTGGCATAATGATTCGCTCAGTAATATATATGG
 TTTTTATTTACAGAAAGATTCAACTTCTCACAATTGACTACTAGGATTTTCTTATCTATTTATTTCTATGCATG
 CCTGGATTGGATGAAGTTCATGCAAATATAACAATGCACATTTGGTATTTGTCAATTATATGTATCAATGATCCTG
 ATAGCTCGCAATCCAAGTTCAAAATCATGGAGGTTTCATGATATATCTTTATCTTGCTATCCGGGCTCAGTGGC
 CCATTTATAATTTTCAATTTAGCAGCTTCATGCTTTAAATTTATAAATAATTGTAAAGATCATATAGTGAAGA
 TCTTTCATAAATTTCTACTTGCCTCAGCCATACGCATTAATGATTGTTTGCCTTTAATTCAAGGAACCTCTATA
 ATTCTAACTTTCAATGGCACACGTTCTCAGCACCGCTAGGATTCAGTTTTGATGTGATTTTCGCTATATATCA
 TCGAATATTTTTTTATTTACATTTGTCCCATGGGATATGCAAAGGCTGGGTGGGATAATTTACTGTTATCTTAT
 TTTTTGTCTGTTTCGATTTTGTCTGTGCGGCTTTGTTTTGTAAAGGTACGTGGCGAATGAAAGTATTTGCA
 ACTTTACCATTGCTAATATAATTTTTCAATGGCAAACCAATGACAGACTCGGCACCTCAATGGCCAACA

CTTATTAATGGGCAAGGTTCAAGATACTTCGTAAATATACATATTGCGATATTCTCTTTGCTATGTGTTACTTA
 CTTGAGTGCGTCAGGGGAAAGTGGCAACTTTATTTTCCAAAATATACTTAACAATTTTGGCTATTTCGTGATGGGA
 TGTTTGAATTTTGTATACACCCCACTCCCAAACATGAACTGGAGGGGAGGTGCTACTTTGATTAATAATGCAAAA
 ACTGGTGATGTCATTTGATTCAGTCAAGTCTACCACCTGGCCTAACACTTGAACSTAAGGAAAAATAA

SEQ ID NO: 6 (Пример последовательности PglB («дикого типа»))

MLKKEYLKNPYLVLFAMII LAYVFSVFCRFYVWWASEFNEYFFNNQLMII SNDGYAFAEGARDMIAGFHQPNDL
 SYYGSSLSALTYWLYKITPFSFESI ILYMSTFLSSLVVIPTILLANEYKRPLMGFVAALLASIANSYNRTMSGY
 YDMDMLVIVLPMFILFFMVRMILKKDFSLIALPLFIGIYLWYPPSSYTLNVALIGLFLIYTLIFHRKEKIFYIA
 VILSSLTLSNIAWFYQSAII VILFALFALEQKRLNFMII GILGSATLIFLILSGGVDPILYQLKFIYIFRSDSAN
 LTQGFMYFNVNQTIQEVENVLSEFMRRISGSEIVFLFSLFGFVWLLRKHKSMIMALPIVLVGLFALKGGLRFTI
 YSVPVMALGFGLLSEFKAIMVKKYSQLTSNVCIVFATILTLAPVFIHIYNYKAPT VFSQNEASLLNQLKNIANR
 EDYVVTWWDYGYPVRYSDVKTLVDGGKHLGKDNFFPSFALS KDEQAANMARLSVEYTEKSFYAPQNDILKTDI
 LQAMMKDYNQSNVDLFLASLSKPDFKIDTPKTRDIYLYMPARMSLI FSTVASFSFINLDTGVLDKPFSTAYPL
 DVKNGEIIYLSNGVLSDDFRSFKIGDNVVSNSIVEINSIKQGEYKITPIDDKAQFYIFYLKDSAI PYAQFILMD
 KTMFNSAYVQMFFLGNVDKDLVINSRDAKVFKLKI

SEQ ID NO: 7 (пример аминокислотной последовательности *gtrA*; *E. coli* W3110 yfdG,

GenBank: BAA16209.1)

MLKLFAKYTSIGVLNLTLIHWVFGVCIYVAHTNQALANFAGFVVAVSFSFFANAKFTFKASTTMMRYMLYVGFMG
 TLSATVGAADRCALPPMITLVTFSAISLVCGFVYSKFIVFRDAK

SEQ ID NO: 8 (пример аминокислотной последовательности *gtrB*–*E. coli* W3110 yfdH,

GenBank: BAA16210.1)

MKISLVVPVFNEEEAIPIFYKTVREFEELKSYEVEIVFINDGSKDATESIINALAVSDPLVVPVLSFTRNFGKEPA
 LFAGLDHATGDALIPIDVDLQDPIEVI PHLIEKWQAGADMVLAKRSDRSTDGRLKRKTAEFWFKLHNKISNPKIE
 ENVGDFRLMSRDVVENIKLMPERNLFMKGILSWVGGKTDIVEYVRAERIAAGDTKFNGWKLWNLALEGITSFSTFP
 LRIWTYI GLVVASVAFIYGAWMLDITIFGNAVRGYPSSLVSI LFLGGIQMIGI GVLGEYI GRTYIETKKRPKYI
 IKRVKK

SEQ ID NO: 9 (пример нуклеотидной последовательности локуса *rfb* O4 – штамм-
 продуцент O4-EPA BVEC-L-00684f)

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGCGGATACCC
 AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTGAGTACATTTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAA
 GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTGAAAACCACTTCGACACCTTTATGAGTTAGAATCA
 CTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGCGTGACCATTATG
 AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTTGTTGACAACCCA
 TTTGTGCTGTTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATG
 ATTGACGTTTCAACGAAACGGGCCGAGCCAGGTGCTGGCAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCC
 GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAAGCCGATTTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGAT
 CAGCCCGAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGATAGTTCGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGAACTG
 GAACGTA CT CAGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAACAATCC

GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG
TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCGGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA
TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAAATTTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAA
TCTTCTGCGGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA
GGATTTTCTTGTTCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA
ACGCTCGTCACATCATAGGCATGCATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC
CTCTATTAATCAAACCTGAGAGCCGCTTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGTAAAATA
CTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATGGTTCAGCTGTAGTTCGTACATTATAAATAATACGCAGGATAGTGT
GTTAATGTCGATAAATTAACGTACGCCGAAACCGGGAATCACTTGCTGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATGTT
TTTGAACATGCGGATATTTGCGATGCACCTGCAATGGCACGGATTTTTGCTCAGCATCAGCCGGATGCAGTGATG
CACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTTGGT
ACTTATGTCCTTTTGAAGCCGCTCGCAATTACTGGTCTGCTCTTGATAGCGACAAGAAAAATAGCTTCCGTTTT
CATCATATTTCTACTGACGAAGTATATGGTGATTTGCCTCATCTGACGAGGTAATAATACAGAAGAATTACCC
TTAATTTACTGAGACAACAGCTTACGCGCCAAGCAGCCCTTAATTCGGCATCCAAAGCATCCAGCGATCAITTTAGTC
CGCGCGTGGAAACGTACCTATGGTTTACCGACCATTTGTACTAATTGCTCTAACAAATATGGTCTTATCATTTTC
CCGAAAAATGATTCATTTGGTTATTTCTCAATGCTCTGGAAGGTAAAGCATTACCTATTTATGGTAAAGGGGAT
CAAATTCGCGACTGGCTGTATGTTGAAGATCATGCGCGTGCCTTATATACCGTGTAAACCGAAGGTAAAGCGGGT
GAACTTATAACATTTGGTGGGCACAACGAAAAGAAAAACATAGATGTAGTGCTCACTATTTGTGATTTGCTGGAT
GAGATTGTACCGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAAATCACTTATGTTGCCGATCGTCCGGGACACGATCGCCGT
TATGCGATTGATGCTGAGAATATTGGTGCAGAAATGGGATGAAACCACAGGAAACGTTTGAGAGCGGGATTGCG
AAGACAGTGAATGGTATCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAATGTGAAAAGTGGTGCCTATCAATCGTGGATT
GAAGAGAATGAGGGCCCGCAGTAATGAATATCCTCCTTTTTGGCAAAACAGGGCAGGTAGTTGGGAACTAC
AGCGTGCTCTGGCACCTCTGGGTAACCTGATTGCTCTTGATGTTTCCACTGATTATTGTGGCGATTTTCAGTA
ACCCGAAGGTGTGGCTGAAACCGTCAAAAAAATTCGCCAGATGTTATTGTTAATGCTGCTGCTCATAACCGCGG
TAGATAAGGCTGAGTCAGAACCAGAAATTTGCACAATTACTCAATGCGACCAGCGTTGAAGCAATTGCAAAAGCGG
CTAATGAAGTTGGGGCTTGGGTAATTCATTACTCAACTGACTACGTCTTCCCTGGAAATGGCGACATGCCATGGC
TCGAGACTGATGTAACCGTCCGCTCAATGTTTATGGCAAAACCAAATTTGGCTGGAGAAAGAGCATTACAAGAAC
ATTGCGCAAAGCATCTTATTTCCGTACCAGCTGGGTATATGCAGGTAAGGAAATAACTTTGCCAAAACAATGT
TACGTCTGGCAAAAGAGCGCGAAGAACTGGCTGTGATAAACGATCAGTTTGGCGCACCAACAGGTGCTGAATTGC
TGGTGATTGCACCGCTCATGCCATTCGCGTGGCATTAAAAAAACAGAAAGTTGCTGGCTTGACCATCTGGTAG
CAAATGGCACAACAACCTGGCACGATTACGCCGCGCTAGTATTCGAAGAAGCCCGTAAAGCAGGGATTGACCTTG
CACTTAACAAACTCAACCGGTACCAACAACGGCTTATCCTACTCCAGCCCGCTCCTCATAAATCTCGCCTCA
ATACCGAAAAGTTTCAGCAGAATTTGCGCTTGCTTGCCTGACTGGCAGGTGGGCGTAAACGATGCTCAACG
AATATTTACGACTACGGCAATTTAACAAATTTTTGCATCTCGCTCATGATGCCAGAGCGGGATGAATAAAAGG
AATGGTGAAATGAAACCGGTAAAGGTATTATCTGGCTGGTGGTTCCGGCACTCGTCTTTATCCTGTGACGATG
GCAGTGAGTAAACAACCTGCTGCCGATTTATGATAAGCCGATGATTTATATCCGCTTTCAACGCTTATGTTAGCG
GGTATTGCGGATATCTTATATCAGTACGCCACAGGATACACCGCGTTTCCAACAATTTGTTGGGGACGGGAGT
CAGTGGGGCTTAATCTACAGTATAAAGTACAACCGAGTCCGGATGGCCTGGCGCAAGCGTTTATTATTGGTGAA
GACTTTATTTGGTGGTGATGATTGTGCACTCGTACTTGGCGATAATATCTTCTATGGACACGACTTGC CGAAATTA
ATGGAAGCTGCTGTTAACAAAGAAATCGGTGCAACGGTATTTGCTTATCACGTCAATGATCCTGAACGTTATGGT

GTCGTGGAGTTTGATAATAACGGTACTGCAATTAGCCTGGAAGAAAAACCGCTGGAACAAAAAGTAACTATGCC
GTTACTGGGCTTTATTTCTATGACAATGATGTTGTAGAAAATGGCGAAAAACCTTAAGCCTTCTGCCCGTGGCGAA
CTGGAAATTACCGATATTAACCGTATTTATATGGAGCAGGGACGTTTGTCTGTGCTATGATGGGGCGTGGTTAT
GCCTGGTTGGATACTGGTACACATCAAAGTCTTATTGAAGCAAGTAACTTCATTGCCACCATTGAAGAGCGTCAG
GGATTAAAGGTATCTTGCCCGGAAGAGATTGCTTACCCTAAAGGGTTTATTGATGCTGAGCAGGTGAAAGTATTA
GCCGAACCGCTGAAGAAAAATGATTATGGTCAGTATCTGCTAAAAATGATTAAAGGTTATTAATAAAATGAACGT
AATTAAACTGAAATTCCTGATGTGCTGATTTTTGAACCAAAAGTTTTTGGTGATGAACGTGGCTTCTTTTTTGA
GAGTTTAACCAAGAAAGTATTTGAAGAAGCTGTAGGACGGAAGGTTGAATTTGTTTCAAGGATAACCATTCTAAGTC
TAAAAATAATGTATTGCGTGGGATGCATTATCAAACACAAAATACTCAAGGAAAACTGGTTCGGGTAATTTCTGG
TTCAGTATATGATGTTGCCGTAGATTTAAGAGAAAAATCAAAGACATTTGGCAAATGGTGGGTGTAGAATTATC
TGGGAATAATAAAGACAATTGTGGATCCCCGAAGGTTTTGCCCATGGTTTTTATGTGTTGGAGGAGAATACCGA
ATTTGTTTATAAATGTACCGATACTTATAACCTGCTCATGAACACACATTGCTATGGAATGATCCAACATATCAA
TATAAGTTGGCCAATCATACAAAACGCAAGCAATATTTCTGAAAAAGATGCTAATGGACATCTTTTTTTCACA
TAAACCTATTTCTGAAATGCAATATATGAGTTTAAATAGAAACAGTTTCTATAATATTGCTGGTTTTGCTGTG
CCGACATTAGTTGCAGTCCCTGCTTTGGGGATTCTTGCCAGGCTGCTTGGACCGGAGAATTTTGGACTTTTCACA
CTAGCATTGCTTTGATAGGATATGCAAGTATTTTCGACGCCGGGATTAGTTCGAGCTGTAATCAGAGAAATCGCT
CTTTATCGAGAAAAGTAAAAAGAGCAAATACAAATTTTCGACAGCAAGTGAATCGTACTATTTCTAGGGGTG
GTTGCAGCTTTGTTACTTTATTTTAGTAGTAATAAAGTTGTTGAGTTATTGAATGTTAGTTCCGTTTATATTGAA
ACAGCAGTGCCTGCATTCTCTGTTATTTTATTATAACCTGTGTATCTGATTAACCAGATTTGGCTTGGTTAT
CTGGAAGGGCTAGAAAAATTTGCAAATATAAATGTTTCAAGAAATGATTTCTAGCACAAGCTTGGCTATATTACCA
GTGATATTTTGTATTACAATCCCTCGTTGCTTTATGCTATGTATGGGTTGGTGGTTGGGCGTGTGATTTCAATTT
TTGATTAGCGCAATAAATTTGTGAGATATTTCTTAAAGTAACTTTACTTTAATGTGGCAACTTGCATTCGT
CTTATCTCTTTTGGTGGATGGATAACAGTTAGTAATATCATAAGCCCAATCATGGCATATTTTCGACCGCTTTATC
ATCTCTCATATTATGGGGGCTTCGAGAATTGCATTTTATACAGCGCCCTCAGAGGGTGTATCAAGGTTAATTAAT
ATCCCATATGCTTTGGCAAGAGCTCTATTTCCATAAATGGCATATAGCAATAATGATGATGAACAAAAAATTA
CAACTACAGAGCTACGCAATTATAAGCATTGTATGTCTACCCATAGTTGTTATTTGGTGTCAATTTTGCCTCATTC
ATAATGACAACATGGATGGGACCTGATTATGCCTTAGAAGCAGCAACTATCATGAAAAACTTCTTGTGGTTTTT
TTCTTTAACTCTTTAGCGCAAATACCTTATGCATACCTTGAATCTATCGGAAAGTCAAAAATACCGCATTTGTG
CATCTCATAGAACTTGCGCCATACTTATTATTATTGATTACTTCACAATGCATTTCCGCATAATTTGGCACGGCA
ATCGCTTGGTCACTTAGAACATTTTGTGATTTTGTATACTACTTTTCGATATCGAGAAGAAAATGATTGGCGTTG
ATATTGCGCTTGCAACCTACAATGGTGTAAATTTTATTCGGCAACAGATTGAATCTATCCAGAAACAACTTATA
GAAATTGGCGTCTTATAAATAAGTGATGATAACTCGAGTGATGATACTGTTGATATTATTAAGGATATGATGTCTA
ACGACAGTCGTATCTATTTGGTAGGAAATAAAGACAAGGAGGGTTATTCAAGAACTTTAATTATGCTCTTTTAC
AACTACATCTGAAATTGTGTTACTATGTGACCAGGATGACATTTGGCCGGAGGAGCGTCTGGAAATTTCTTATAG
ATAAATTTAAGGCCTTGACAGCTAATGATTTTGTCCGGCAATGATGTTTACTGATTTGAAATTAGTAGACGAAA
ATAATTGTTTATTGATGCAAGAAAGTTTTTATCGAACGAATAATTAATCCACAAGATAATCTGAAAAATAAATC
TTCTCTGGCGTTCAACGGTATATGGCTGTACTTGCATCATGAATAAGAACTTGTGATATTGCATTGCCTATAC
CTACATATGCACATATGCATGATCAATGGTTGGCATTTATTAGCGAAGCAATATGGTAACATTTTTTATTTGACT
ATGCGTCTGTTGTTATAGGCAACATTTCTACAAATGTTGTTGGTGGTAGAAAATAAACGCCATTTCAAAAATTTA
ATTCCATACAAAAAACCTAAAAAGGATTAATTTGCTAGTGGATAGAAGTGTGCTTTAATTAATCAAATAACG

ATTTCTATCCAGGGAATAAAATGGAAAATAAAATTGATTACTTAAAATTTGGAGTGAATGAAGTATTACCTTATC
TTTTTAAAGGAAACAAGAAAGTTTTTTCACCTTGTGTATTAATAGTTTGGCATTACAAAAATGATATATTTATT
ATTTTTTTTTGCACTGTTTATGATCTGTACGTTTTTAAACACACAGGCGACAGGCATTATATGTTGATCTGCGTT
AGTATTTCTTTTTTTGGCTTTAACCTATCCATCAGGAGGGGACTGGATAGGTTATTTTCTCCATTATGACTGCAT
GGTAAATGAGCAGTGTAAATAATGGTTTTATAATGTTTGAACCTGGATATGAATTAATTGTTTCCTTATTTGGATA
TTTGGGATTTGAGACAATTATATTTTTATAGCCGCTGTAATGTAATTCATAATTAATTTTGCAAAGCATT
TGAAAACGGAAGTTTTGTTATGTTGCGATAATGTGCATGTTCCCTTTGGAGTGTATGTTGAGGCGATTAGACA
GGCTCTGGCCTTATCTATAGTTATATTTGGGATTCATCTCTTTTTTTGGGTAGAAAAAGGAAATTTATAACATT
AGTATTTATTTGCGTCAACTTTCCATATAACTGCTTTGATTTGTTTTCTTCTAATGACTCCTCTATTTTCAAAGAA
ATTAAGCAAGATAATAAGTTATAGCCTATTAATTTTTCAGTAGCTTCTTTTTCGCTTTTTTCTGAAACCATATTAAG
TGCACTCCTTGCAATTTTGCCAGAAGGATCCATTGCCAGTGAAAAATTAAGTTTTTACTTAGCAACCGAGCAATA
CAGGCCACAGTTATCTATTGGGAGTGGCACTATTCTTGACATTATACTTATTTTTCTGATATGTGAAGTTTTAA
ACGAATAAAGAAATATATGCTCGCTAATATAATGCTGCAATGAGATATTGCTTATTTGGTTGCTGTCTTTATAT
TTCTTTTCGGTATTTTTATTCGGGAAAAATGATGCCAGTTATGACTTCGCAATTTGGTTTGGTATTTTCCATTTTGT
AGTACTTCTTTATATTAACCTTGGGTTATTCAGAATATTTTAAAGAGGTATATAAATAAAAGAGGGTGTGGGTATAG
CAAATTTAATTTGCTTTTTATTTTTTGTCTACAAATTTTGGCACCATTAACATATGATTATAGCTATTTATAATAT
AATGCACCAGGATACTTTGCTGAATAGGTTTGTATGCATTAGATGATGCATCATTAAAGACAATCAGCGAAGAGAAA
ATGTTTCGATTTGGGAAAGATAGGATATGGTTTCTTATGTAGTATATAAATATCCTGCATTCATTTCGGATAATTC
CTATGGAAGTGTCTTTGCTCTGTCTGTCTCATTTGTTGAAATTTTATGTTAATAAGAAGCTTTAGATAACCCAC
TTAGGAACTGTATGTTTGTCTGTCCAAAAATATAATTTGTAAGTGCACGCGCCTGGCTTCCGGAGGTGCAT
TAACTATATTAAGCAATTTATAAAACATGCATCACAAAATCAAATGACTATATTTGTTTGTATCTGCGGGAT
TGGAGTTGCCGGTCTGTGATAACATCATTTACATAGAAAACACACCAAAGGATGGTTGAAAAGAATATATTTGG
ATTGGTTTCGGTGTGCGGAAGTTTATCTCGGAACATAAGATTAACTTAAGAAAGTAATTTCTCTACAAAATTTCCA
GTTTGAATGTTCTTACGAACAGATTATTTACTTGCACCAGCCAATTCCTTTTAGTAAAGTTGATTTCTTTTTTAA
AAAATATCACATCCGATAACGTAAAGCTTTTTTATATAAAAAAGTTTTATTTCTATTTTATATTTAAATATGTGA
ATGCCAATACAAACATCGTAGTGCAACGAATTTGGATGAAAAAAGGAGTGCTGGAGCAATGTGATAAAATTAGTA
CCGAAAGGGTCTTGTATAAAACCTGATATCAAAGCATTTAATAATACTAATTTTGTAGTATGATATGGATGTAT
CTGCAAAAACACTCTTATATCCAGCGACACCACTTACCTATAAAAAATCATTGGTCATCTGAAGGCGTTGGTTA
TTTTAAAGAAAAGTATTTTATAGATGATCTGAAATTTCAAGTGACTTTTGAAGAAGTAAAGTACAAAAATTTTG
ATAAGTTTGTGCAATTAATAACTTAAGCAAAAACGTTGATTATCTCGGCGTCTTTTCATACTCGAAGCTTGCAAA
AAAAATATATGGCGGCATCTTTAATCGTTTTTCTAGCTATATCGAATCATATGGGTTACCACTCATCGAAGCTG
CTAGTTTAGGAAAAAAATCATTAGTAGTGATCTTCTTATGCCCGGATGTTTTAAAGGATTATAGCGGCGTAG
ATTTTGTAAATTTACAATAATGAAGATGGCTGGGCTAAGGCGTTGTTTAAATGTTTTAAATGGCAATTCGAAGCTCA
ATTTTAGGCCTTATGAAAAGATAGTCGTTTCATCTTGGCCACAGTTCTTCTCTATTTTGAATAAGGTGTATTAT
GTTTAAATGGTAAATATTTGTTAATTACTGGTGGTACGGGGTCTTTTCGGTAAATGCTGTTCTAAGACGTTTTCTTGA
CACTGATATCAAAGAAATACGTATTTTTTCCCGGATGAAAAAAACAAGATGACATGAGGAAAAATATAATAA
TCCGAAACTTAAGTTCTATATAGGTGATGTTTCGCGACTATTTCGAGTATCCTCAATGCTTCTCGAGGTGTTGATTT
TATTTATCATGCTGCAGCTCTGAAGCAAGTACCTTCTGCGAATCCACCCAATGGAAGCTGTAAAAACGAATGT
TTTAGGTACGGAACGTAAGGAGCGCAATAGCTAATGGAGTTAGGCGAATTTGTATGTTTGTAGTACAGATAA
AGCTGTATATCCTATCAATGCAATGGGTATTTTCAAAGCGATGATGGAAAAAGTAATGGTAGCAAAATCGCGCAA

TGTTGACTGCTCTAAAACGGTTATTTGCGGTACACGTTATGGCAATGTAATGGCATCTCGTGGTTCAGTTATCCC
ATTATTTGTCGATCTGATTAATCAGGTAGACCAATGACGATAACAGACCCTAATATGACTCGTTTCATGATGAC
TCTCGAAGACCGTGTGATTTGGTTCCTTACGCATTTGAACATGGCAATAATGGTGATATTTTGTCCAAAAGGC
ACCTGCGGCTACCATCGAAACGTTGGCTATTGCACTCAAAGAATTACTTAATGTAACCAACACCCCTGTAAATAT
AATCGGCACCCGACACGGGGAAAACTGTACGAAGCGTTATTGAGCCGAGAGGAAATGATTGCAGCGGAGGATAT
GGGTGATTATTATCGTGTCCACCAGATCTCCGCGATTTGAACTATGGAAAATATGTGGAACATGGTGACCGTCG
TATCTCGGAAGTGAAGATTATAACTCTCATAACTGATAGGTTAGATGTTGAGGGAATGAAAAAATTAAGTCT
AAAACCTCCTTTTATCCGGGCACCTTCGGTCTGGTGAAGATTATGAGTTGGATTCATAATATGAAAATTTTAGTTA
CTGGCGCTGCAGGGTTTATCGGTCGAAATTTGGTATTCCGGCTTAAGGAAGCTGGATATAACGAACTCATTACGA
TAGATCGTAACTCTTCTTTGGCGGATTTAGAGCAGGGACTTAAGCAGGCAGATTTTATTTTTCACCTTGCTGGGG
TAAATCGTCCCGTGAAGGAGTGTGAATTTGAAGAGGGAATAGTAATCTAACTCAACAGATTGTTGATATCCTGA
AAAAAACAATAAAAATACTCCTATCATGCTGAGTTCCTCCATCCAGGCTGAATGTGATAACGCTTATGGAAAGA
GTAAAGCAGCTGCGGAAAAAATCATTACGAGTATGGGAAAACGACAAACGCTAAATATTTATTTATCGCTTGC
CGAATGTATTCCGTAAGTGGTGTGACCAAATTTATAACTCCTTTATAGCAACTTCTGCCATCGCATTGCAAATG
ATGAAGCTATTACAATTAATGATCCTTCAGCAGTTGTAATCTGGTGTATATAGATGACTTTTGTTCGACATAT
TAAAGCTATTAGAAGGAGCGAACGAACTGGTTACAGGACATTTGGTCCAATTTATTCTGTTACTGTTGGTGAAG
TGGCACAATTAATTTACCGGTTTAAAGAAAGTCGCCAAACATTAATCACCGAAGATGTAGGTAATGGATTACAC
GTGCATTGTACTCAACATGGTTAAGTTACCTGTCTCCTGAACAGTTTGCGTATACGGTTCCTTCTTATAGTGATG
ACAGAGGGGTATCTGTGAAGTATTGAAAACGAAAAACGCGGGCCAGTTTTCGTTCTTTACTGCGCATCCAGGAA
TTACTCGGGTGGTCAATTATCATCATTCAAAAATGAGAAATTTATTGTATCCGAGGAAGTGCCTGTTTCAAAT
TTGAAAATATTGTACGAGTGAACGATATGAACTTAATGTTTCTCTGATGATTTTAAAAATGTTGAAACAGTTC
CGGGATGGACGCATAACATTACTAATAATGGCTCGGATGAGCTAGTTGTTATGCTTTGGGCAAATGAAATATTTA
ATCGTTCTGAACCAGATACTATAGCGAGAGTTTATCGTGAAAAAATGAAAGTCATGTCCGTTGTTGGGACTCG
TCCAGAAATTTATCGACTCTCGCGTGTCTTGCAAAATTAGATGAATATTGTGACCACCTTATTGTTCCATACCGG
GCAAACTACGATTTAACTGAATGAAGTTTCTTCAAAGATTTGGGTGTTGCGAAACCTGATTATTTCTTAA
TGCCCGCAGGTAAAAATGCAGCAGAGACTATTGGACAAGTTATCATTAAAGTTGATGAGGTCCTTGAACAGGAAAA
ACCAGAAGCCATGTTAGTACTTGGCGATACTAACTCCTGTATTTGAGCAATACCAGCAAAGCGTCGAAGAATTC
GATCTTCCATATGGAGGCTGGGAATCGTTGTTTTGACCAACCGGTACCGGAAGAACTAACAGAAAAATAGTTGA
TCATACCCTGATATCAATATGACATATAGTATATCGCGCTGAATATCTTCTGGCTGAAGGTGATACCAGCCGA
TAGAATTATTAACCGGTAGCCCAATGTTTGAAGTACTCACTCATTATATGCCCGAGATTGATGGTTCGGATGT
ACTTTCTCGCCTGAATTTAACACCTGGGAATTTCTTTGTGGTAAAGTCCCACAGAGAAGAAAAATGTTGATACCC
TAAACAACCTGTGAACTGGCGAATATACTTAATACCGTGGCTGAAAAATATGATGTCCCGGTAGTTGTTTCTAC
TCATCCTCGCACTCGTAAACCGCATCAACGAAAACGGTATTCAATTCATAAAAAATATCTTGCTTCTTAAAGCCATT
AGGATTTACGATTACAACCATGTGCAAAAAAATGCACGTGCTGTTTTATCGGATAGTGGACTATTACAGAAGA
GTCCTCCATTATGAACTTCCCTGCACTCAATATACGAGAAGCGCACGAACGCCCGGAAGGCTTCGAAGAAGGGGC
AGTAATGATGGTCCGTTGAACTGATCGCGTTTTACAGGCATTAGAAAATATTGCAACACAGCCCTCGTGGAGA
AGTACGCTTACTTCGTGAGGTTAGTGACTATAGCATGCCAAATGTTTCAGATAAAGTTCTGCGTATTATCCATTC
ATATACTGACTACGTTAAACGGGTTGTCTGGAAGCAATACTAATGAACTTGCATTAATCATTGATGATATTTG
CCCCATAGCACACGCGTTGGGGCTAAAATGTTTCATGAGTTAGGCCTTGAATTAAGTACTGAGCAGAGGCCATGATGTA
ACTGTAATTACGCTGACATCTCATTACAAGCAATTTATTCTATTAGTATGATTGATGGTATAAAGGTTTGGCGT

TTCAAAAGTGGACCTTTAAAGGATGTAGGTAAGGCTAAACGTGCCATAAATGAAACTCTTTTATCTTTTCGCGCA
 TGGCGCGCATTAAAGCACCTCATTCAACATGATACATTTGATGGTATCGTTTATTATTTCCCCCTCTATTTTTGG
 GCGACTTGGTTAAAAAATAAAACAACGATGCCAGTGCCCAAGCTATCTGATCCTAAGGGATATGTTTCCACAG
 TGGGTCAATTGATGCAGGTATGTTGAAAGCCGGTTCACCAATTGAAAAATATTTAGGTATTTGAAAAAAGTCA
 TATCAGCAGGCTGGCCGGATAGGGTAATGTCTGATAAGAATCTTGAGATATTTGCCAGACCAATAAAGGTTAT
 CCGTGTGAAGTTTACGTAATTTGGCCCTCAATGACTCCTGTGTCTGCCAGCGATGATTATCATTCACTTCGTCAA
 AAATACGATCTAAAAGATAAAGTCATTTTTTCTATGGCGGTAATATGCGCATGCTCAGGATATGGCAAACCTTA
 ATGCGCCTTGGCGTAATATGATGCGTTATCATGATGCTCATTTCTGTTTATAGGGCAGGGTATGAAGTTGAG
 CTGATAAAATCTCTTGTGCAGAATGGAATTTAACTAATTTCACTCATCTACCTTCAGTGAACCAGGAAGAGTTT
 AAATTAATTTTATCTGAAGTTGATGTCGGCCTGTTCTCCCTTTCATCTCGCCATCTTTCACATAAATTTCCCGGA
 AAATTAAGGATATAGGTTCAATCAATCCCGATCCTTGGGAGTGTGAATGGCGCAATGATTTAATGGATGTA
 ATTAATAAGCACAGAGCCGGTTTCATTCATGTTAATGGTGAAGATGATAAACTGTTTGAATCTGCACAATTGCTT
 CTTAGTGATTCAGTTTAAAGAAAACAGCTAGGTGAGAACGCTAATGTGTTGTTAAAGTCTCAATTTTCGGTTGAA
 TCGGCGGCACATACTATCGAAGTCCGACTGGAGGCTGGAGAATGCGTTTAGTTGATGACAATATCTGGATGAAC
 TTTTTCGCACTGCAGCAAATCTGAACGTTTTCGCGCTCATTTATTTATGCACGCATCTCATCAGGAGAAGGTTT
 AACGTTTACTTATTGCAATTTGTACGCGACAGCTATGTTGAACCCATTTGGCATGAGTTACCGCATCAGTGGGAAA
 TGTTTGTGTCATGCAAGGGCAATTAGAAGTTTGTGTTGATGAGCAAAATGGTGAATCCAAAAACAGTTTGTG
 TTGGAGACGGTACGGGAATAAGCGTCTGGAATTTTCCCGAGGATATACATAGTGTCAAATGCCTGTCAACAA
 AAGCCCTTATGTTGGAGATAAAGGAGGGCCATTTGACCCACTCAAAGCTAAGGCTTTTTCTAAGTGGTTATAGG
 GCGATACACCACCGTTTATCTTCTATCTTATTCTATACATGCTGGGTTACCATCTTAGCTTCTCAAGCCGCGC
 AACCCCGCGGTGACCAACCCCTGACAGGAGTAGCTAGCATTTGACCACCCCTGACAGGATTAGCTAGCATATGAGC
 TCGAGGATATCTACTGTGGGTACCCGGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGA
 ATAGGAACTTCGGAATAGGAATAAGGAGGATATTCATAT

SEQ ID NO: 10 (пример сигнальной последовательности белка-носителя EPA)

MKKIWLALAG LVLAFSASA

SEQ ID NO: 11 (пример нуклеотидной последовательности локуса *rfb* O1A – штамм-продуцент O1A-EPA stGVXN4411 и stLMTB10217)

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCGATACCC
 AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTTGTTGACGAGATTTGGCTGCAGGGATCAAA
 GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA
 CTCCTTGAGCAGCGCTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCGGGCGTGACCATTATG
 AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTTGGTGACAACCCA
 TTTGTGCTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATG
 ATTGCACGTTTCAACGAAACGGGCCGAGCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCC
 GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAAGGTAAGTCAAGCGCATTTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGAT
 CAGCCGACAGCGTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAAGT
 GAACGTAATCAGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAGCTGACTGATGCTATTTGCCGAGCTGGCGAAAAACAATCC
 GTTGATGCAATGCTGATGACCGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG
 TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGCGAAGTTCCTGTAAGGATATGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA

TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAA
TCTTCTGCCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA
GGATTTTCTTGTTCAGAGCGGATGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTCGGGTTAGCGCGAGTGGGTA
ACGCTCGTCACATCATAGGCATGCATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC
CTCTATTAATCAAACCTGAGAGCCGCTTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGCTAGCGTG
AAGATACTTGTACTAGGGGCGCAGGATTTATTGGTCTGCTGTAGTTCGTACATTATAAATAATACGCAGGAT
AGTGTGTTAATGTCGATAAAATTAACGTACGCCGAAACCTGGAATCACTTGTGATGTTTCTGACTCTGAACGC
TATGTTTTTGAACATGCGGATATTTGCGATGCTGCTGCAATGGCGCGGATTTTGTCTCAGCATCAGCCGGATGCA
GTGATGCACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTGGATCGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATT
GTTGGTACTTATGTCTTTTGAAGCGGCTCGCAATTACTGGTCTGCTCTTATGATGGCGACAAGAAAAATAGCTTC
CGTTTTCATCATATTTCTACTGACGAAGTCTATGGTGATTTGCCTCATCCTGACGAAGTAAATAATAAAGAACAA
TTACCCCTCTTACTGAGACGACAGCTTACGCGCCTAGTAGTCTTATTCGCATCAAAGCATCCAGCGATCAT
TTAGTCCGCGCGTGGAAACGTACCTATGGTTTACCGACTATTGTGACTAACTGTTGCAATAACTACGGTCTTAT
CACTTTCGGAAAAATGATTCCACTAGTAATCTTAATGCTCTGGAAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAAA
GGGATCAAATTCGTACTGGCTGTATGTTGAAGATCATGCGCGTGCCTTATATACCGTAGTTACTGAAGGTCAA
CGGGTGAAACCTATAACATTGGCGGACACAACGAAAAGAAAAACATCGATGTTGTGCTGACTATTTGTGATTTG
TTGGACGAGATAGTCCCGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAAATTACTTATGTTGCTGATCGCCAGGGCATGAT
CGCCGTTATGCGATTGATGCTGAGAAGATTGGTCGCGAATTGGGATGGAAACCACAGGAAACGTTTGGAGTGGG
ATTCGTAACCGGTGGAATGGTATTTGGCTAATGCAAAATGGGTTGATAATGTGAAAAGTGGTGCCTATCAATCG
TGGATTGAACAGAACTATGAGGGCCGCGCAGTAATGAATATCCTCCTTTTGGCAAAACAGGGCAGGTAGGTTGGG
AACTACAGCGTCTCTGGCACCTCTGGTAATTTGATTGCTCTTATGTTCACTCCACTGATTACTGTGGTGATT
TTAGTAACCTGAAGTGTGGCTGAAACAGTCAAAGAATTGACCTGATGTTATTGTTAATGCTGCGGCTCACA
CCGCGTAGATAAGGCTGAGTCAGAACCCTAATTTGCACAATTACTCAATGCGACTAGCGTTGAATCAATTGCAA
AAGCGGCAAATGAAGTTGGGGCTTGGTAATTCATTACTCAACTGACTACGTATTCCTGGAATGGCGACACGC
CATGGCTGGAGATGGATGCAACCGCACCGCTAAATGTTTACGGTGAACCAAGTTAGCTGGAGAAAAGCATTAC
AAGAGCATTGTGCGAAGCACCTAATTTCCGTACCAGCTGGGTCTATGCAGGTAAGGAAATAATTTCCGCAAAA
CGATGTTGCGTCTGGCAAAAGAGCGTGAAGAACTAGCCGTTATTAATGATCAGTTTGGTGCGCCAACAGGTGCTG
AACTGCTGGCTGATTGTACGGCACATGCCATTGCTGTGCACTGAATAAACCGGATGTGCGAGGCTTGTACCATT
TGGTAGCCAGTGGTACCACAACCTGGTACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAATGCAGGCATTC
CTCTTGCACTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAACAACCTGCCTATCCTACACCAGCTCGTCTCCACATAACTCTC
GCCTTAATACAGAAAAATTTACGAGAATTTTGCCTTGTATTGCCTGACTGGCAGGTTGGTGTGAAACGCATGC
TCAACGAATTTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTGATGGTGGAGCAAGATGAATTA
AAAGGAATGATGAAATGAAAACGCGTAAAGGTATTATTTAGCGGGTGGTTCTGGTACTCGTCTTATCTGTGA
CTA'TGGT'CGT'GAGTAAACAGC'IA'TACCTA'IA'AT'GA'IAAACCGAT'GA'CTA'IA'AT'CCGCT'IT'CTACAC'IGAT'G'
TAGCGGGTATTTCGCGATATCTGATTATTAGTACGCCACAGGATACTCCTCGTTTTCAACAACCTGCTGGGTGACG
GTAGCCAGTGGGGCCTGAATCTTACGTACAAAGTGCAACCGAGTCCGGATGGTCTTGGCAGGCATTTATATCG
GTGAAGAGTTTATTGGTGGTATGATGTTGTGCTTTGGTACTTGGTGATAATATCTTCTACGGTACAGACCTGCCTA
AGTTAATGGATGCCGCTGTTAACAAAGAAAGTGGTGAACGGTATTTGCCTATCACGTTAATGATCCTGAACGCT
ATGGTGTGCTTGTGTTTTGATAAAAACGGTACGGCGATCAGCCTGGAAGAAAAACCGCTACAACCAAAAAGTAATT
ATGCGGTAACCGGGCTTTATTTTTATGATAACGACGTTGTGCAAAATGGCGAAAAATCTTAAGCCTTCTGCCCGCG

GTGAACTGGAAATTACCGATATTAACCGTATCTATATGGAACAAGGGCGTTTATCTGTTGCCATGATGGGGCGTG
GTTATGCGTGGTTAGACACGGGGACACATCAGAGCCTGATTGAGGCAAGCAACTTTATTGCAACAATTGAAGAGC
GTCAGGGGCTGAAAGTTTCCCTGCCGGGAAGAAATTGCTTACCCTAAAGGGTTTGTGATGCTGAGCAGGTGAAAG
TATTAGCTGAACCTCTGAAAAAAATGCTTATGGTCAGTATCTGCTGAAAATGATTAAAGGTTATTAATAAAATG
AACGTAATTAACAGAAATTCCTGATGACTGATTTTTGAACCGAAAGTTTTTGGTGATGAGCGTGGTTTCTTT
TTTGAGAGCTTTAACCAGAAGTTTTTGGAGAGCTGAGGCCGAAAGTTGAATTTGTTTCCAGGATAACCATTCG
AAGTCTAGTAAAGGTGTTTTACGCGGGCTGCATTATCAGTTGGAACCTTATGCACAAGGAAAATGGTGCGTTGC
GTTGTCGGTGAAGTTTTTACGCTAGCTGTTGATATTGTAATCGTCAATCGACTTTTGGCAAATGGGTTGGGGTG
AATTTATCTGCTGAGAATAAGCGGCAATTGTGGATTCTGAGGGATTTGCACATGGTTTTTTAGTCTGAGTGAG
ACGGCGGAGTTTTTGTATAAGACGACAAATTTATATCATCCTCAGAGTGATAGAGGAATAAAATGGGATGATCCA
AGCATCAATATTTTATGCGCCAGTTCGATTACCAAGTGTCTATCAGCTAAAGATAATAAGCATCCTCCATTAACA
AAGATTGAAATGTATAGTTAAGATCACGATAAATCTTGAAGGGTTGCAAAATGAATAAAATAGTGAGCAAAG
TGAAATAAGGAACGTAATCCACAATGCTGGCTATATGATGATTACTCAGATAGCTTTATATGTTGCACCATATTT
TATACTGAGTTATCTGTTAAAAACACTGGGGGTTGCACAGTTTTGGTAATATGCCTTAATACTATCAATCGTTGC
ATATTTACAGATTATAACGGATTATGGTTTTTCTTTTGTAGTGAAGTCTGCGATCTCACAGAATAGAGAGGACAA
AGAATATATATCAAAAATTTATCTGTCAACTATGACTATCAAGTTGGCGATATGCGCTTCTTATTCTTATTGCT
CATGCTATTTTTAAATCTTTTGCCTGTGCAAGCTGAATTAACAAGGAATTTATATGGATATCTTCTTGAAT
AGGAAATACTTTTCAACCACAATGGTTTTTCCAAGGTATCGAAAAATTAATAATCATAGCCCTTTCTAATGTTAT
ATCAAGATGCGCCGCTGTTTACTTGTATTTATCTATGTGAGGAATAGCGAGGATTTACAAAAAGCACTTTTAGT
ACAGTCACTTCCATTAGTAATTTCTGCGATTGGATTAATATATTTATATTGAAATATATCAATATATTTTTTCC
GGAAAAAAATTTATTAAGGTAATTTTAAAAGAAGGTAAGGATTTTTTCTTGCCATCACTTTATTTCTGTTATTCT
CAATAATAGTGGCATTTTTCTATTAGGGATTTTTACTAATCCTGTTATTGTTGGTGTATATGCCGCCGCTGAAAA
GATAGTCAAGGCCGATTTGTGCTATTTACACCCTGACGCAAGCTATATATCCTTATAATTGTGTAAGTTTTTCT
ACTATCCGATTTTACGGCATTGAGGCGCAAAAAAACTGGTATACCAATTATAATTTTAGCATTTATAGCTGC
TGTTATCGTTGCAATTACCTTACCTGTTGCAATCGACTATCTTAATTTTCCAAAAGAAACAATTTTTGTAGGTCA
AATATTAAGTGCATGGATCTTTTTTGGTGTCTTAATAATGTATTGCGCATTCAGATATTGAGTGCATCAGGAAG
AAGTAAAATATATAGTAGGATGGTATTCGTATCAGCGCTTATAACATTACTTTTGATTACTCTATTATTGCAGTT
TTGTAAACGCCACTGGAGTGGCATGTGCAATATTATGGGTGAAATGTTCTTATCAATATTGTTACTTAAGCGATA
TAAAAAAATAATTTAAGGAATAGTTATGAAGAAGTTATTATTAGTGTTCGGTACTAGGCCTGAAGCAATAAAGAT
GGCCTCTATCATTGAATTTTAAAAAAGATTGTAGATTGCAATATAAAATATGTGTGACAGGCCAACATAAAGA
GATGCTTGATCAAGTTATGCAAGTATTTGATGTTAAACCTGATTATAATTTACGGATTATGCAGCCTGGGCAAC
ATTAGTATCTATAGCAACAAATATACTCTCACGGTTAAGTGAAGTTTTAATTATAGAAAAGCCAGATATTATACT
TGTGATGGGGATACAACGACTACCTTGTCTACTTTAGCTGGGTATTACCACCAAATAAAAGTTTTGTCATGT
GGAAGCAGGATTAAGAACAGGGGATTTACTCTCCTTGGCCTGAAGAGGGCAATCGTAAAGTTACAGGGGCATT
AGCATGTATTCATTTCCGCCCCAAGAGAGATCAAAAGATAATCTCCTGAGGGAGGGGGTCAAAGTAAATAATAT
ATTTGTAACGGGTAATACCGTCATCGACTCTTTATTTATTGCAAAAAGATATCATAGATAATGACCCTAATATAAA
GAACGCTTTACATAATAAATTTAATTTTCTTGATAAAAGCCGACGAGTAGTACTTATAACAGGTATCGAAGAGA
AAATTTGCGGAAAGGTTTTGAAGATATATGCTTTGCAATAAAGGAATTAGCTTTTATTTATCCTAATGTAGATTT
TATTATCCGGTGCATCTTAATCCCAATGTAATGGAACAGTACATCGTATATTAGATAATATATGTAATATTTA
CCTTATTGAGCCCTGGATTATTTGCCTTTTTGTTATTTAATGAATGAGTCATATTTAATATTGACTGATTCAGG

GGGGATACAAGAAGAAGCGCCTTCGTTAGGTAACCGGTTTTGGTTATGCGTGATACTACTGAACGCCCTGAGGC
GGTTGAGGCTGGTACTGTTGTATTAGTGGGACTTCTAAGATAAAAAATAGTAAATAAAGTAACGGAGCTATTA
CAATGCTGATATCTACAATGCTATGTCTCTGTTACATAATCCATATGGCGATGGAACAGCTGCTCAAAAAATTCT
TAATGTGCTCGCCCAAGAGCTAATTTAATTTAAGCTAAAAATATGTTATTAATTATTGCTGATTATCCAACGAA
ATGAATATGCGCGAGGGAGCTATGCAACGAATAGATGCGATAGACTCTCTCATTGAGATCGCAAGCGAGTGTAT
TTGAATATTTCAATCAAAAAGCATCTAGTTCGCTCAAATAGTTCCTTTAATAATGTTATAGTTGAAAACTAAAT
GCAATTATTCACAGAAACATCATAAAACAGTACATGCAAAAATCAACAACATATATATGTTTCATTCTGTTTATAAT
TTATTAAGGTTATAACGCTCATTGATCTAAAAAAACAATTTCTTGATATACATGGTGTGTACCGGAAGAACTT
TTGGCAGATAATAAAAAATTACTTAGTAAAGTATATAACATGGTGGAAAAAAAAGGTGTCCTTGGATGCAAAAA
TTAATACACGTCAGTACAGAAATGCAAAAACACTATGAAGCAAAAATATGGAGTAAACTTGGCTGAAAGGTCAATA
GTGCTCCCGATTTTTGAATATAAAAAATAACCCAATCGCAAAACAAATGGACAGAAAATAAAATACGAAGTATC
TATCTTGGAGGATTACAAACATGGCAAAATATTGATAAAATGATCAAGTTTGTGATGACACAGTGATAAACAAT
GAAGCAGGTAAGTATGAATCAACTTTTTCATCCCACAGAGTAACTTGGAAAGGTTTATAGATAAAATATTCGTTA
AAATTACATAATATCAATGCTAATGCATCTACGCTATCACGTGATGAAGTAATCCCTTTCTAAAAGAATGTCAT
ATTGGTTTTGTATTGCGCGATGATATAATAGTAAACAGAGTTGCGTGCCCTACAAAATGGTTGAATATTTAGAG
TGTGGTGTGCTCCAGTTGTGCTCTCCCACCTATAGGTGATTTTTATTCGATGGGATATCAATACATTTACTACA
GAGGAAATGGCTAACAGAGTATAAGTTTGTGGATCTTGAAAAAATGGCTGCACATAATTTACAAATTTTGACT
TCTTATCAGAAGAGAACCTACAAGGCACAGAAAGAACTTATTGCTCAACTGTGCTGAATTTTTTACATATATAAA
ATTATGTAAGCATATCGCGGTCAGGTAATTGTATGCGTATCAAATATAAAGATAACGGTTATATATTATGTTTT
CTATTATGTTTCATTTGAGCTACTTAGTTTTACTCAAATCTGACTACTTTCCCTGCTGATTTTCTGCCATATACA
GAAATATACGATGGGACATACGGAGAAATCAATAATATTGAGCCTGCCTTTTTATATTTAACACGGTTGTTTCAT
TATTTAAATTTCCCTATATATTTTTGCAATGTTAGTTTGTGCTTATGTTTAAAGTTGGAAAATAAAATATGCA
AGAAAATAAATTAAGATAGTTATATATATTTGTTCTTGTATGTATATGTATCATTATATGTTTTTTGCATGAA
ATGACTCAATTGCGCATAGCAATTGCGTCACTATGTGCTATGTGCTGTTTATTACTTTTTATAAAAATTTGT
ATTAACATGCACTGCCATGGATGGTGTGGCTATTTTGTTCATTACAGCGCCTTGCTTTTATTTATGTCATTA
TTTATATACAGTTATAGGAGTTATTAATAGTAATTATAGGGTTTGTAAATATGTATGAGCTTTTTAAACGTGTAT
GCAGATACAATGCACTATATTTGCCAAATGAAAAAATAGTAAATATTTATATAGTATTTTCATCATCATTAGAC
AATAGAAATGATTTGGCAATATTTCAACCTGAATAATATAATATTTTTATCAATATTTATTTTGATCTTTTATCTT
AGCCGATATATAAAATTAATGATAATGAGGCGAAGTTTATTAAGTATGTGCAATGTTTCAGGAATATTAGCCTTT
TGTATTTTCTTCTGGCTAGTGGAGTCCCGTCATTGCTTATCGAACTGCAGAGTTGCTGCGAATATTTTATCCG
ATGGCTTTAGTATTAATCCTTTTCGCATATAAAAAATAATAATATGCGTTATTTTATTGCAAGTATTATAGTTATC
CTTTCAGGCTTAATGTTGTTTATAACACTAAGGGCTGTATCAATAGTTGGTCAAGGATTATAAAATGAATGTTGC
TATTTTGTGCTACGTATAATGGCGAAAAATATTTAGAGGAACAACCTGGATTATTGCTGCTTCAAAGTTATCA
GGATTTTGTAGTGTATATCCGTGATGACGGATCATCTGATAGAACTGTAATATAATAAACCAATACGTAATGAA
AGATAACAGATTTATTAACGTGGGTAATTCAGAAAATCTTGGTTGTGCTGCTTCGTTTATTAATTTATTAAGAAA
TGCTTCAGCCGATATTTATATGTTTTGTGACCAAGATGATTATTGGCTTCCGAATAAATTACAGCGTGTGTTGGA
TTATTTTTCGGCTATTGATCCTTTACAACCTACCTTGTATCATTGCGATCTAAGCGTTGTTGATGAAAACTTAA
TATTATACAAAATTCATTTTTGCAGCATCAGAAAATGTGAGCGTATGATTCAATGAGAAAAAATAATCTTTTCAT
ACAAAATTTTGTGTTGGTTGTTTGTGCTGTTAATGCTTCACTTGCAGAAATTTGTTCTTTTCGCGAATTTGGAGA
GCAGCATGAAAAATGATAGCTATGCATGACTGGTGGTTAGCCGTGACTGCAAACTTTTTGGTCAATCCATTT

TGATAATACTCAAACGATTCTTTATCGACAACATCAGGGCAATGTATTAGGTGCAAAATCATCAGGTATGATGCG
TTTTATTGATTAGGATTAATGGGCAAGGGATTTCCGCGAGTAGTATCTTTTAGAAAAAAGTTTGTGCGCAAAA
TAAGCTTCTTTTAGATGTCTATGATAAAGATTTAAATCTTGAGCAAAAAAATCTATCAGGCTTGTAAATTGAGGG
CCTTAAAGAGAAGCTCTCAATGCTGACCTTTTAAATGTTTCTATCATGGTAGCTATATGCAAGGTTTTAAACG
TAATCTTGCCTTAATATATTCAGTCTTTACACAAAAAAGAAGATAGTGTATCCTTATGAAAAAATGCTAT
TATCGGTACTGTTGGCATAACCAGCATCATATGGCGGATTTGAAACATTAGTTGAAAAATTAACAAGATACAATTC
CTCGGGAGTTGAATATAATGTTTTTTGTTTCATCGTTTTCACTACAAATCCCACCAAAAAAACAATAATGGGGCCCC
TTTAAATTTATATTCGCTTAAAGCCAATGGATGGCAGAGCATTGCGTATGACATAATTTGTTAGCATATTTCTAT
TTTTTTGAAGCCTGATGTGATTCTGATTTTAGGGTTTCTGGTTGTTTCAATTTTTGCCTTTCTTCAAACCTCTTAAC
ACGCGCTAAGTTTATTACTAATATTGATGGCCTGGAATGGCGAAGAGATAAATGGAATTCAAAAGTGAAACGTTT
CTTAAATTTTTCAGAAAAATCGCAGTTCAATATTGCGATGTCGTTATTACGGATAATGAGGCAATTTCTGAGTA
CGTTTTTAACGAGTATAATAAAGATAGCCGAGTTATTGCTATGGAGGGGATCATGCATGGTTAAATACTGAGGA
TGTATTTACAACAAGAAATTAATAAAGCGATTACTACCTTTCTGTATGTCGTATCGAACCCGAAAAACAATGTAGA
ATTAATTTTAAAAACATTTTCAAAGCTAAAAATAAAAATAAATTTTATGGAAATGGAAATGGCAGCGAGTTTGG
AAAGAACTTAGGCTGCATTATCTAACTATCCAAATATTGAAATGATTGATCCGATTTATGATCTTCAACAATT
ATTTCACTTACGAAATAATTGCATAGGATATATACATGGTCATTGCGCTGGAGGAACAAACCTTCTTTAGTCGA
GGCAATGCATTTTAGTAAACCTATATTTGCATATGATTGTAAGTTAATAGGTACTACTGAAAATGAAGCATG
TTATTTTCTAATGAATCTGACCTCGCAGAGAAAATCATAATGCATTGTGAGCTATCATAGGTGTCTCTGGCAC
GAAAATGAAAGAAATGCTAACCCAGAAATACACTTGGAGACGAATAGCAGAAATGTATGAGGATTGCTATTAAC
CTGTAAACTTCAAATCTTTTACAATATATGGCATGACTATAAGCGCATTAATGTTTTTCAAGCCGCTCTCGCG
GTGACCACCCCTGACAGGGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCTTATACTTTCTAGAGAATAGGAA
CTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATA
CTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTCAGGCCGCGAGCATTACAGCGGGTGATCACACCTGAC
AGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGCGTAGTCGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCCTCAACA
TCGAAAGCCGTGGTTATACCCTCTCTATTTTCAACCGTCCCGTGAGAAGACGGAAGAAGTATTGCCGAAAATC
CAGGCAAGAACTGGTTCCTTACTATACGGTGAAAGAGTTTGTGCAATCTCTGAAACGCCTCGTCGCATCCTGT
TAATGGTGAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCA
TCATTGATGGTGGTAAACCTTCTTCCAGGACACTATTCGTGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTTAACT
TCATCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAG
AAGCCTATGAATTGGTAGCACCGATCCTGACCAAATCGCCGCTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCT
ATATTGGTGGCGATGGCGCAGGTCATATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGA
TTGCTGAAGCCTATTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCACGAAGAAGTGGCGCAGACCTTTACCGAGT
GGAATAACGGTGAAGTGAAGCAGTTACCTGATCGACATCACCAGATATCTTACCAAAAAAGATGAAGACGGTA
ACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACCGGTAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGG
ATCTCGGCGAACCCGCTGTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTTGACGTTATATCTTCTCTGAAAGATCAGCGTG
TTGCCGCATCTAAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCGACAAGGCTGAGTTTCATGAAAAAGTTC
GTCGTGCGCTGATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGTGCTGCTGAAGAGT
ACAACCTGGGATCTGAACTACGGCGAAATCGCGAAGATTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCTCTGC
AGAAAATCACCGATGCTTATGCCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAAATTG
CCGATGACTACCAGCAGGGCCTGCGTGATGTCGTTGCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCCGGTTCAGACCTTCT

CCGCAGCGGTTGCCTATTACGACAGCTACCGTGCTGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTGACT
 ATTTTGGTGCGCATACTTATAAGCGTATCGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

SEQ ID NO: 12 (пример нуклеотидной последовательности локуса *rfb O2* – штамм-
 продуцент O2-EPA stGVXN4906)

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCGATACCC
 AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAA
 GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACCGGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA
 CTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG
 AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCA
 TTTGTGCGTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATG
 ATTGACAGTTTCAACGAAACGGGCCGACGCGAGGTGCTGGCAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCC
 GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGATGTTGAATTTATCGAAAACCGGAT
 CAGCCGACAGCGTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAAGT
 GAACGTAAGTCAAGCGTGGTGCATGGGGACGTATTCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAACAATCC
 GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTCGGCCAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG
 TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGCGAAGTTCGTAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA
 TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTAAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCCAA
 TCTTCTCGCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA
 GGATTTTCTTGTTCAGAGCGGATGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA
 ACGCTCGTCACATCATAGGCATGCATGCAGTCTGCTGGTAGCTGTAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC
 CTCTATTAATCAAAGTGAAGCGCTTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGTGAATAA
 CTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTGGTTTCAAGTCTGAGTTCGTCACATTATAAATAATACGCAGGATAGTGT
 GTTAATGTCGATAAATTAACGTACGCCGAAACCGGGAATCACTTGCTGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATGTT
 TTTGAACATGCGGATATTTGCGATGCACCTGCAATGGCACGGATTTTGTCTCAGCATCAGCCGATGCAGTGATG
 CACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTTGGT
 ACTTATGTCCTTTTGGAGCCGCTCGCAATTACTGGTCTGCTCTTGATAGCGACAAGAAAAATAGCTTCCGTTTT
 CATCATATTTCTACTGACGAAGTCTATGGTGAATTTGCCTCATCCAGATGAAGTAAATAATACAGAAGAATTACCC
 TTATTTACTGAGACGACAGCTTACGCGCAAGCAGCCCTTATTCGCATCCAAAGCATCCAGCGATCATTTAGTC
 CGCGCATGAAACGTACGTATGGTTTACCGACCATGTTGACTAATGCTCGAACAATATGGTCCGATCACTTC
 CCGGAAAGCTTATTCATGGTTATTTCTTAATGCACTGGAAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAAAGGGGAT
 CAAATTCGCGACTGGTTGTATGTAGAGGATCATGCTGCTGCGTTATATACCGTCTAACCAGGTAAGCGGGT
 GAACTTATAACATTTGGCGGACACAACGAAAAGAAAAACATCGATGTTGTGCTGACTATTTGTGATTTGTTGGAT
 GAGATTGTACCGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAAATTAATTATGTTGCTGATCGCCAGGGCATGATCGCCGT
 TATGCAATTGATGCCGATAAAATTAGCCGCAATTTGGCTGGAACCACAGGAAACGTTTGAAGCGGGATTCGC
 AAAACGGTGGAAATGGTATCTGGCTAATACAAATTTGGTTGAGAATGTGAAAAGCGGTGCTTATCAGTCATGGATC
 GAACAAAATATGAGGGCCGTCAGTAATGAATATCCTGCTTTTCGGCAAAACAGGGCAGGTGGGTTGGAACTGC
 AGCGTGCTCTGGCGCCGCTGGGTAATCTGATCGCTCTTGATGTTCACTCCACTAATATTGTGGAGATTTACGCA
 ACCCGAAGGTGTGGCAGAAACCGTCAAAAAATTCGTCCTGACGTTATTGTTAATGCTGCTGCTCACACTGCAG
 TAGATAAAGCAGAATCAGAACCGGATTTTCGACAATTAACGCGACAAGCGTCAAGCGATTGCAAAAGCTG
 CTAATGAAGTCGGGGCTGGGTTATACACTACTCTACTGATTATGTTTTCCAGGCAGTGGTGACGCGCCATGGC

TGGAACGGATGCAACAGCACCGCTAAATGTTTACGGTGAACAAAATTAGCTGGGGAAAAGGCATTACAAGAAC
ATTGCGCAAAGCATCTTATTTTCCGTACCAGCTGGGTATACGCTGGTAAAGGAAATAACTTTGCTAAAACGATGT
TGCGTTTGGCAAAGAACCGGAAGAACTGGCTGTGATAAACGATCAGTTTGGCGCACCAACAGGTGCTGAATTGC
TGGCTGATTGCACCGCTCATGCCATTGCGGTGGCATTAAAAAACAGAGTCGCTGGCTTGTACCATCTGGTAG
CAAGTGGCACAACAACCTGGCACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGGATTAATCTTG
CACTTAACAAACTTAACGCCGTGCCAACACGGCCTATCCCACACCAGCCCCTGACCCCATAACTCTCGCCTCA
ATACAGAAAAGTTTCAGCAGAACTTTGCGCTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTGGGCGTAAAACGTATGCTCAACG
AATTATTTACGACTACGGCAATTTAACAAATTTTGCATCTCGCTCATGATGCCAGAGCGGGATGAATTTAAAGG
AATGGTGAATGAAAACGCGTAAAGGTATTATTCTGGCTGGTGGTTCCGGCACTCGTCTTTATCTGTGACGATG
GCAGTGAATAACAATTGCTGCCGATTTATGATAAGCCGATGATTTATTATCCGCTTCAACGCTTATGTTAGCG
GGTATTCGCGATATTCTTATTATTAGTACGCCACAGGATACACCGCGTTTCCAACAATTATTGGGGGACGGGAGC
CAGTGGGGCTTAATCTACAGTATAAAGTACAACCGAGTCCGGATGGCCTGGCGCAAGCGTTTATTATTGGCGAA
GACTTTATTGGTGGTGAATGTGCACTCGTACTTGGCGATAATATCTTCTATGGACACGACTTGGCGAAATG
ATGGAAGCTGCTGTTAACAAAGAAAGCGGTGCAACGGTATTTGCTTATCACGTTAATGATCCTGAACGCTATGGT
GTCGTGGAGTTTGATAATAACGGTACGGCAATTAGCCTGGAAGAAAAACCGCTGGAGCCAAAAGCAACTATGCG
GTTACTGGGCTTTATTTCTATGACAATGACGTTGTGGAATGGCTAAAAACCTTAAGCCTTCTGCCCGTGGCGAA
CTGGAAATTACCGATATTAACCGTATTTATATGGAACAAGGACGTTTGTCTGTAGCCATGATGGGGCGTGGCTAT
GCATGGTTGGATACAGGGACGCATCAAAGCCTTATTGAAGCAAGTAACTTCATGCAACAATTGAAGAGCGTCAG
GGATTAAGGTATCTTGGCCGAAGAGATTGCTTACCGTAAAGGGTTTATTGATGCCGAGCAGGTGAAAGTATTA
GCCGAACCGCTTATCAAGAATCAATATGGTCAATATTTGCTGAAAATGATCAGCGAATAGTATATGGGAACCAA
TGATGGATATTAATAATCTCTTTGCAAAAACATGGGGATGAGCGCGGTGCATTAATTGCTCTTGAAGAGCAAC
GAAATATACCTTTGCAAGTCAAAGAATATATTACATACTTGAGACTCTTAATGGAGTAAAGACCGCGATTTCATG
CGCACAAAGTTACTCGTCAGTTAGCTATTGTAGTCAAGGGAGCTTGTAAATTTTCATCTGGATAATGGTAAAGAAA
CAAAGCAGGTGGAACCTAATGATCCAACAATTGCGTTGCTGATAGAACCCTATATATGGCATGAAATGTATGATT
TTAGTGATGATGTGTGCTGCTTGTAAATTGCGGATGATTTCTATAAAGAGTCTGATTATATCCGCAATTATGATG
ATTTTATTAGAAGAGTAAATCAATTGAGAATTCATAAGCTAAGTACGCTCCAGACAACATCAATTGGTGAATGGA
ACAACATCTGGCAGTTTGTGTGATACTAAAAGGTGCTGTAATTGGTAATAATTGCAACATCTGTGCAAAATACC
TTAATTGAAAATAACGTTGTAATTGGTAACAATGTCACAGTCAAAGCGGTGTGTATATTTGGGATGGCGTTAAA
ATAGAGGATAATGTTTTATTGGTCTTGTGTAGCATTACAAATGATAAGTATCCTCGCTCTAAAGTCTATCCT
GATGAATTTTTGCAACAATAATACGCAAGGAGCATCAATAGGTGCTAACGCAACCATCCTGCCAGGAATTGAA
ATTGGTGA AAAAGCAATCGTTGGTGGCGGGGAGTGTGTAACCAAAAATGTACCGCCATGCGCAATAGTAGTGGT
AATCCAGCTCGATTTATTAATGGGTAGAGGATAATGAATAAAAATTGATTTTTTTAGATCTTTTTGCAATTAACCA
GCGACAGCACAAAGAATTAGTCTCTGCTTTAGTAGGGTGTAGATTCTGGTTGGTATATCATGGGCGAAGAACT
TGAGCAGTTCGAGAAAGAGTTCGAGAATACTGTGGAGTTAAGTATTGCATTGGTGTAGCAAATGGCCTTGATGC
GTTGATACTAGTATTGAGGGCATGAAAAGAACTTGGCTATCTTGAAGACGGTGACGAGGTATTAGTACCGGCAAA
TACATATATTGCTTCTATTCTTGCTATAACAGAGAACAACCTTGTTCCTGTTCTTGTGAACCAGATATAGAAAC
TTATAATATTAATCCTGCTTTAATTGAAAATTACATTACGGAAAAACTAAAGCAATATTACCGGTTCACTTATA
TGGTCTATTGTGCAATATGCCAGAAATTAGTGAATCGCCAGAAAATATAATCTGTTGATTCTTGAAGATTGTGC
ACAAGCACATGGTGAATACGTGATGGTCGCAAAGCTGGAGCTTGGGGGGATGCTGCAGGATTTAGTTTTTATCC
AGGAAAAACCTTGGAGCTTTGGGGGATGCGGGAGCTGTTACTACAAATAATGCAGAATTATCCTCAACTATAAA

AGCTTTGCGAAATTATGGGTCACATAAGAAATATGAAAATATTTATCAGGGATTGAATAGTCGATTGGATGAACT
GCAAGCAGCCTTATTGCGTGTAAAAATCCATACATTACCGGAAGATACTGCGATTTCGGCAAAGGATTGCTGAAAA
ATATATTCGTGAAATAAAAAACCCTGCGATTACGTTACCAGTGTACGAAGGCCAAGGTGCGCATGTTTGGCATT
ATTTGTAGTAAGAATCGCTAATCGTGAAAAATCCAGTCATACTTATTAGAGAAGGGTATCAAACCTTAATTCA
CTATCCATTACCACCCATAAGCAGCAAGCATATCAAATATGTCTAGCCTTAGCCTTCCAATTACTGAGCAAAT
TCATGATGAAGTCATTTCTTTACCTATAAGTCCGGTAAAGTGAAGATGATGTCAATTATGTAATCAAATGGT
CAATGATTACAAGTAATGAAAAATTTCTTCAGGTAACATATATATCCGCTATCTATACATTCATTAATAATGATT
GCGGGTTTTATCATCGGTAAGGTAGTAGCAATTTATACAGGGCCATCAGGGGTAGCAATGCTTGGCCAAGTGCAA
AGTTTAAATCACAATAGTTGCAGGTACTACCTCTGCACCTGTAAGCACAGGCCCTTGTTCGATATACTGCGGAAAT
TGGCAAGAAGGACAAGAAGCATGCGCGCCATGGTGGCGCATGCTTAAGGGTTACTCTGTTTTTATTCTTGCTT
ATTATCCCCTGTTATTATATTTGTCGAAAAATATTAGTGAGTTACTTTTTAGCGATGGACAATACACATGGTTA
ATCATTTTCGCATGTTGTATATTGCCATTCTCCATTATAAATACATTGATCGCTTCAGTTTTAAATGGTCAACAA
TTTTATAAGCAATATATATTGGTTGGGATGTTTTCTGTATTCAATTTCTACTATGTTTTGATTTTTGTTGATTGTA
GCTTATAATCTTAAAGGTGCATTGATTGCCACAGCTATAAATAGTGCTATTGCTGGTCTGTATTGGTTTTATTT
TGTCTCAATAAATCTTGGTTTAGATTTAAATATTGGTGGGGTAAAACGGATAAAGACAAAATTTAAAAATTTATT
CATTATACTCTGATGGCTCTGGTTCTGTTATCTCCATGCCTACAGCATTGATGTGTATTAGAAAAATATTGATT
GCTAAAACCTGGTTGGGAGGATGCAGGGCAATGGCAGGCCGTATGGAAGATATCTGAGGTTTATCTTGGTGTGTG
ACAATTGCTTTGTCAACATATTTCTTACCAAGATTGACAATTATAAAAAACAAGTTTCTTATAAAAAAAGAAGTA
AATAGTACTATATTATACATAATATCTATTACTTCATTCATGGCGTTGAGTATCTATTTATCCGCGATTGGTA
ATAACAGTTTTATTTACTGAACAGTTTTGCGTCAGCTCGTGAATTTTTTTATTACAACCTATAGGGGATGTAATA
AAAATTGCTGGTTTTCTTTATGCATACCCTCTTCAAAGTCAGGGGCATACTAACTATTCATCAGTTCAGAAGTG
ATTTTTCTATGCTCTTTATCATTACCACCTATATTTTTGTTGTAAATTTATGGAGTACATGGTCTAACATAAGT
TATGTCATTACATATAGTTTATATTTTTGTGTTGCATTTGTGTTACTAATTTTATTAATGTTAGAAGAAATAAT
TAAAAACAGAGTTGAATTTTTGAAAATAATTATACCTGTCTTAGGATTTGGCAGGGCTGGTGGTGAAAGAGTTCT
TTCTAAGCTGGCAACTGAATTGATGAATTATGGACATGATGTAAGTTTTGTTGTTCCAGATAATAGAATAATCC
ATATTATGCTACCACAGCAAAAATTTGTCACGAGTAAATCTAGTCAAACCGTGTAATAATTTGAGAATCATTAA
AAATTAATAATCTGTGGCGTAAATGCATAGAGTTAAATCCTGATGCTGTAGTTGCTAGTTTTCATTTGACTGC
CTATCTTGTGCGATTATACCAATCACCCGTCGTAAGAAATATTTATATATTCAGGCGTATGAAGTTAATTTTTT
TGATAATATAATATGGAAATTAATAGCGGGTTAACATATTTTACCCTTAAAAAATACTAAATAGTCCTAA
TTTGCTTCCTCATAAACATGATGATTTTATAGGAGTAGTTCCTGCAGGAGTAGATTTAAACGTTTTCTATCCGAA
ACCATCAAATAGGTTATTAATGGTCACACATCAATAGGGATTATTGGTAGAAAAGAGAAGCACAAAGGAACTAG
CGAAATTTTTAGTATTGTGTTCACTGGAAAATAAGCTGGAATTATAATCAATATTGCGATCTATCTGAAGA
AGTTGATAAGCAGCGTTAATCGCTGCCGGGTTTCAAGTTAATTTTTTTCCGATTACTTCTGATTTAGAATTGGC
ATCCTTTTATCGAAGCAATGACATCATGATTGCTGTTGGGTTAATTGAAGATGGCGCTTCCATTATCCTTGTGC
TGAATCAATGGCTTGTGGTGTCTTGTATTTCAAATTATGCGCCACTTACTGAACTAACAGTGTACTTAAATT
AGTCAAGTTTGATGCTTGCAAACCTGGTGAAGCAATTAATCTTGTCTCAATCTTGACCTAGAAGAAAAAGCAA
AGAAATCCAATCTAATATTTCTGTGTTGAATAAATATGACTGGAAAATTTGTTGGTGAACCTTCAATAGTTTATT
GTTAGATGCAATAAATAGTATACGTTGATGGGAAAATATGAATATTGTTAAAACCTGATATCCAGATCTGATC
GTTCTTGAACCAAAAGTGTTTAGTGATGAACGCGGCTTTTTTATGGAGAGTTATAATCAGATTGAATTTGAGAAG
GCAATAGGAAGGCACGTAAATTTTTGTTGAGATAATCATTCAAATCTAGTAAAGGCGTACTACGTGGGTTGCAT

TATCAATTAGCACCGTATGCACAGGCTAAATTAGTTCGATGTGTTGTAGGTGAGGTATTTGATGTTGCTGTTGAT
 CTTAGAAAAAATTCACCAACGTTCAAAAAATGGTTTGGAAATAACCCTTCCGCAGAAAAATAAACGACAATTATGG
 ATACCCGAAGGATTTGCTCATGGTTTCTGGTGACCAGTGATGAAGCTGAGTTCATTTATAAGACAACCTAACTAC
 TATGCTCCTGGTCATCAGCAAGCAATTATTTACAATGATCCTATTTTAAACATCGATTGGCCTTCTGCAGTAGT
 GCTCTGTCAATTATCACAAAAAGATCAAGAAGCAAAATATTTTTCAGAATTATTGGACAGTGAACCTGTTCTAATAA
 AGTGTGCCACCTTATCCGTCTGAAGGATAGGTGGTTGCTTATATTTTTTTGAGTATGTTTGTATAATGACAGAAA
 ATAGTCCGAAATATAAACACGATAAAAAGCTTAATAAGTTTTATCTACTTATTTTTTATATTTACACTTATTTGTAG
 GCTTTATATCGCAAATACCCAGTTTTTGGGGCGAAGTAGAGACTATGATAATTATATACAGATCTTTTCTGGTA
 AAGAAGGGGAGGGGGTTCTGAATTATTTATCGCGGATTGATGTTAATAACGACCAGCTATGAAACTATCATTT
 TTATAATTTTAAACATGTTCTTTTTTTATAAAGGCAAGGTTTCTCGCTAACTATTCGCGTAATTTTTTCAGGCTTGA
 CCTTATCTTTATTTATTTATGCAAGCGTTGCACCTTTGGGTTTTAGATTATACTCAATTCAGAAATGGTCTATGTA
 TTTCCATTTTAAATGTTTTCCGTATACATTTTATTTATAAATAAACCGACTTATTTTTATTTCTCGGTATTATGTG
 CAATTGCAACTCATGGTCTGCTTTGGCCTTTTTGCTTTTATATCCTTTTGTCTATTCAACAAAAATAAGACGCC
 TTGGTTATTTTTGTTTTCAGTATCTTGTGTTTATTGCGATCTCAGGAGAAGGAAAAGAGATCATATCTTTTATAA
 GAAATTTTGGAGTGGGACAAAAATAGGAAATGAAGCTGGTGTAAATTTAATAAATTCATTATCCCTTACCGCTA
 TTTCTGGTTTTATTATTAGTTACATATCAAGCATTGGAAATGAAAGGAGAAATTTAAGGCTTTTCTTTTGTATG
 GTGTATGCAATACGTGACTTTTAGCCTTTTCTCTACCTGTTATGGCTTTCCGTATTTTGGAAATGTATTTTT
 TCCTTATGCTAACCATTGGGGTGTTTATTAAGCAAAAAAGAATTATTATTTTTATTTTTTGCAAAGTGTAAATTT
 TATTGTATCTAACATACTATTATCATATGGTCTTTGGAGTGATTAATGTGTAAGGCTAAGGTGTTGGCTATAATT
 GTTACTTACAACCCGAAATTTATCGATTGACGGAATGATTAACCTTTAGCCCCACAAGTTGAGAGAATAATT
 CTTGTAGATAATGGCTCAAATAATAGTGATTTGATAAAAAATATCAGTATTAATAACCTTGAAATTTATTTACTT
 TCGGAAAAACAAGGCATTGCATTTGCTCAGAACCATTGGTGAAGAGGGCCTGGAAGCAAAGAGTTTGACTAT
 TTATTTTTCTCAGATCAGGATACTTGCCTTCTAGCGATGTTATTGAAAACTTAAGAGTACATTTACGAAAAAT
 AATAAAAAAGGTAAAAATGTTGCTTGTGCTTCTCCTTTTTTTAAAGACCATTGTTCAAATTTATATGCATCCGTCA
 GTCAGCCTAAATATTTTTACGAGTACAAAAGTTATATGATGAGTGAAGTAGACGATGATCTTTATCCCTCGCATGTT
 ATTGCTTCTGGGATGTTAATGTCTCGTGAAGCATGGCGCGTCTCGGACCATTTTGTGAAAACTCTTTATAGAC
 TGGGTTGATACAGAATGGTGTGGCGTGCATTAGCTAATAATATGATTTATTGTTTCAGACACCATCAGTCATCATT
 TCTCATGAACTTGGGTATGGGCAGAAAAATTTTTGCTGGTGCATCTGTTACAATACATAATTCTTTTCAGAAATTTT
 TATAAATAACGCAATGCAATATACTTAATGCTGCATTCAAATTTATAGCTTCAAGTATCGTTATCATGCTTTTTTT
 CATGCGACAAAGAATGTTGTATTTGAAATTTTATATTCGAAAGAAAAATTAATTCACCTGAAGGTTTGTTTTAA
 GCTGTACGTGATGGTATGTTCAATAATTTTTAATACGAAAATAGTTAGGCTCAAGGTGTTTAAATGGAAGAAAAAT
 AATATGAAGACGGTCTGCTGATGTTGGCACAGTGGGTGTTCTGCTTGTATGGTGGGTTGCAATCACTTGTTTCAG
 AATCTAATTGATTATCAATCTGATGGTATACAATATCAGATATTTTGTCTTCAAAAAATATGATAAAAAATTT
 AAAAAATATAAATGCAGAAATTAATCTATTTGCCGATAAATGCCAATGGCGTCTCTAGCATAATTTATGATATT
 ATGTGTTAATTTATTTGTTTATTTCAAAGGCCAGATGTTGTTTAAATATTGGGGGTGCTGGTTGTTTATTTCTA
 CCAATTTATAAATCTATTTCAAATCAAAGATTATTGCAATATTGATGGGCTTGAATGGCGTAGAAATAAATGG
 GGAACGTTTGTAAAGAAATTTCTTAAAAATCTGAGGCGATATCTATTAGAATAGCTGATATTATCATTTTCAGAT
 AATCAAGCAATAGCTGATTATGTGAAAATAAGTACAAGAAAAAAGTGTAGTTATAGCTTATGGCGGAGATCAT
 GCCACTAATCTTAGTACCCGATAGACAATGATCAAAAAAAGAAGGTTATTTTGGGGCTTTGTAGGATAGAG
 CCTGAGAATAATATAGAAATGATTCTGAATGCCTTCATTAATACAGATAAAAAAATTAATTTTATGGGTAATTGG

GATAACAGCGAGTATGGACGCCAGCTAAAAAATATTATTCAAACATCCAAATATCACCCCTACTAGAACCTAAC
TATAATATTGAAGAGCTTTATAAACTAAGAAAAAATGTCTTGCATACATTATCATGGACACTCGGCTGGTGGAACA
AACCCCTCTTTAGTTGAAGCGATGCATTTTAAATATTCCTATTTTGGCTTTCGATTGTGACTTTAATCGTTACACA
ACTAACAAATTTAGCTCATTACTTTAATGATTTCTGAACAACCTAGCTTATTAGCAGAAAAGTTTGTCTTTTGGAAAT
CTTAAATGTGAGTATTAGATTTAAAAAATATGCTGAAGATATGTATAACTGGAGGCATATAGCTGCTATGTAT
GAATCTATTTATTAACGCATTAACAATAATATAATTGACCTTATATAGCAGGGAAAGATCACGTAACCGTGCAGG
CGCGCCGATCCCATATGAATATCCTCCTTAGTTTCTTATCCGAAGTTCCTATTTCTTAGAGAATAGGAACCTT
CGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTT
TAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTCCAGGCCGCGAGCATTAGCGCGGTGATCACACCTGACAGG
AGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCCTCAACATCG
AAAGCCGTGGTTATACCGTCTTATTTTCAACCGTTCCCGTGAAGACGGAAGAAGTATTGCCGAAAATCCAG
GCAAGAACTGGTTCTTACTATACGGTGAAGAGTTTGTGCAATCTCTGGAACGCCTCGTGCATCCTGTTAA
TGGTGAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCA
TTGATGGTGGTAAACCTTCTTCCAGGACACTATTCGTCGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTTAACTTCA
TCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGTTCCTTCTATATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAG
CCTATGAATTGGTAGCACCGATCCTGACCAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATA
TTGGTGGCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTG
CTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGA
ATAACGGTGAAGTGAAGTACCTGATCGACATCACCAAGATATCTTACCAAAAAGATGAAGACGGTAACT
ACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACCGGTAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATC
TCGGCGAACCGCTGTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTTTGCACGTTATATCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTG
CCGCATCTAAAGTCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAGTTCGTC
GTGCGCTGATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGTGCTGCTGTAAGAGTACA
ACTGGGATCTGAAGTACGGCGAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCTGCGAGA
AAATCACCGATGCTTATGCCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTAAGCAAATGGCCG
ATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGATGTCGTTGCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCCGGTCCGACCTTCTCCG
CAGCGGTTGCCTATTACGACAGCTACCGTGTGCTGTTCTGCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTACTATT
TTGGTGGCATACTTATAAGCGTATCGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

**SEQ ID NO: 13 (пример нуклеотидной последовательности локуса *rfb* ОбА – штамм-
произцент ОбА-ЕРА stGVXN4112 и stLMTB10923)**

ATGACGAAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCGATACCC
AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTAGTACATTTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAA
GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA
CTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATTTGCCCGCCGGCGTGACAATATG
AACGTGCGTCAAGGCGAACCTTTAGGTTTGGGCCACTCCATTTTATGTGCAGACCTGCCATTTGGTGACAATCCA
TTTGTGCTGGTGTGCTGCGAGACGTTGTGATCGACGACGCCAGCGCCGACCCGCTGCGCTACAACCTTGTGCCATG
ATTGCGCGCTTCAACGAAACGGGCCGAGCCAGGTGCTGGCAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCT
GTCATCCAGACCAAAGAGCCGCTGGACCGCAAGGTAAAGTCAAGCCGATTTGTAATTCATCGAAAACCGGAT
CAGCCGACAGCGTGGACTCAGACATCATGGCCGTTGGTGCATGTGCTTTCTGCCGATATTGGCCGGAACCTT
GAACGCACTCAGCCTGGTGCATGGGGCGTATTCAGCTGACTGATGCCATTGCCGAAGTGGCGAAAAACAGTCC

GTTGATGCCATGCTGATGACCGGCGACAGCTACGACTGCGGTAATAAATGGGTTATATGCAAGCGTTCGTGAAG
TATGGACTACGCAACCTCAAAGAAGGGGCGAAGTTCGGTAAAGGGATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA
TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAGATTAGCGGCGAAAAGTAATTTGTTGCGAA
TTTTTCCTGCCGTTGTTTTATATAACAATCAGAATAACAACGACTTAGCAATAGGATTTTCGTCAAAGTTTTCCA
GGATTTTCCTTGTTCCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCATTTGAATTTTACGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA
ACGCTCGTCACATCGTAGACATGCATGCAGTGTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGTGAAATTA
TAAAGTCATTCTTATAGAACATCGCATTTCAATAATATAAATTACACCTAAATGAATAGGATACAACGTGTGCACA
ATTATTTAAGGCTTAAAGATAAAAATAAAAAACGTATTTTTAGGGTTGTATATATGTCAGTTATTTAATTATATCG
CGCCATTGGTAATTATCCCTATCCTGATAAAAATATATTGGGTTGGGGGAATATGGGGAATTGGTCTATATTACAT
CTATTTATCAAATAGTGGCTTTGATTATTGATTTTGGCTTTACTTACACAGGACCTGTGGTTGCTGCGAGACATA
GATGTGAGACCCAAAATTACAGCGCTATTACTCAATAGTTGTTCTTTTAAAATCATTGCTTTTTATAATTGCAT
TAACATGTGATTTTTATTGTGCAGATTAAATATAGTCCACTTGTCATTTTTTGGGTTTTTGTCAATTTTTCTAT
GCCTATTGGTAATATATATCGCCCAATTGGTTTTGCGAGGGATTGGTGATTTTAAAAACTTTCATACTCAC
AAGTAATAGTGAGAATAACATTGTTTATCATACTTCTTGTATTGTCTGTAGTGGCGGAGATAATGTTTTTATCC
TAAGTTTTTTGCAAAATGCAACATTACTCATATGCTGTATATACTTATGGCCAAATATTCATATTAGCCATGTTG
TTCATCTTAAACCTAATGAATGCATTGTGGAATTTAAGAAGGCAGGAAATGTTTTTATTGGCGTAATAGGTACGA
TTGGTTACAATGGTCTAATTCCCTGTGTTAATTGGAACCTTTGCGGTAATACGAGTCTTGGTGTTTTTTCAATCG
TTCAAAAAATGACAACAGCATGTCAAAGTCTAATTAATCCAATATCACAGTATATGTTATCTCAAGTTTCAGAAA
TTAAACCTCAAGATAAAGTTTTTATTATAGAATTAAAAAAGTTTTTTTGTGCATTTAACAATTAGCATAATTG
CATGTTTATGTTATATGGGGTTAGGGCAATATGTGGCGACTTTTATAGGTAAGTTGACGTTTCATTTGTTATTA
TTTTATTTGCGTCAATAATTACCATTTTTTTCATCTTTAAATAATGTCCTTGGTATACAGTTTCTTATACCGGACAG
ATAATGTAATAACTACGAAGTATAAATGTTATGGCGGGAATTATTGTTGTTAGTTTGTCTGGCTGTTAATAT
CACGCTTTGACATTCTGGGGGGGTTTTATTAACCTAATGGTGAGTTTCTTGTATTAGTATGCTAGCTTTTA
TTGCCCATCGAAAGTGGGGAGCGAGAGTATAATGAAAGTGAAGCGGTTTCTGCTATTACATTTCTATTTAAGTTT
AATGCTGACAATTTTAGTGTTACTGTTTGGTAATGAACCAATAAATCACAATATATCCTTGTATAGCAACGAT
AACAGTTTTTTATATCGCATATATCACTAATAAAAATAACTTCTCCGGCCAGCCTTCTCGTTATATCATTTTTGT
GTTTTTAGGTTGTCGCCCTTTATATCTTTGTTTGCAACTATGATTATAGGATTGCCGATTGGTTTATTGAAGG
ATATATGGATGACGATGTGATTTTGGCTAACTATGCTATAACACTAATGTATTATGGTTATACATTGGGACTAAT
TCTATGCAAAAATACTGAAAAATTTTATCCGCATGGTCTTATCCTGAAAAACAATTGCTAAAAATAAAGTTTCT
TTTGACTTTATTTTTCTGGGTTGATAGGATGGTTGTAAGGGGATATTCTTTTTTAACTTTATAGAATCTAA
TAGTTATGTTGATTTTATCAATCAAATATAACAACGCCAATAGGTTATGATTTTCTATCTTATTTATTTATTG
TTCTTTTTTCTTATATGTGCGTTTCATATACAGTTCAGAACAATAAAAAATTTCTTTTTATTGCGATATGCAT
TGCTGCATTTAGCACCTTGAAGGGTAGTCGTAGTGAAGCTATAACGTTTCTTTTAAACGGTTACATGTATATATT
TAATGAAGTAAAGACAAGAACTTACGTCTGCTGATTACAATGATTTTTGTTTTTAGCGTCATTTTTGTGATTAG
TGAATTTATCTCAATGTGGCGCACTGGAGGGAGTTTTTTTCAATTAATGCAGGTAATAATCCTGTTATAAACTT
TGTATACGGCATGGGAGTATCATATCTTCCATTTATCAATCAGTAAACTACAACCTATGTCAGGGGGATATAA
TGTTACCTATCTATTAGCCAGTTAATAATAAATGCTCGTCAATATTTAATGTCAAATTGAGCTTGGCGGAAAT
AAGCTATAGCCATTTGGCCTCATACACAGCAAACCCAGAACTATATAATCTTGGGTTGCGACTTGGGGGAGTTA
TTTAGCAGAATCGTTTTTAGCATTTGGTCTGATGGATGTTTCATTATACCCTTTTTACTTTTACTTAAFTTAA
TGTATTGGAAAAATATACAAAAACAACCAATTATATATTTTGTATTATAGTGTGTTGCCACCTATATTATT

CACACCAAGAGAGACTTTGTTCTATTTCTTCCCCTATCTTGTCAAAGTATATTTGTTGCTTTTTTAGTTACATT
ATACATCCAGTATAAAAAGGATTGACCAAAATGTCAGAAAAAATGTCAGCATAATAATCCCAAGTTATAACAGG
GCTCATATTTCTTAAGGAGGTCATACCAAGTTATTTTCAGGATGAGACTTTAGAGGTTATAGTTATCAATGATGGA
TCAACAGATAATACAAATAGTGTATTAGCTGAACTGAAGGAAAAATATCTCAGTTAGTTATTTTAGAAAAATGAA
ACGAATAAAAAACAGATGTATTCTAAAAACCGAGGGATTGAAATAGCCAAAGGAAATATATTTTTTTGGTGAT
GATGACTCTTACCTCTTACCCGGTGTATATCTCGGTTATTGGCTACAAAATATGAGACAGCCGCTGATGTAATC
GGCGCAAGAATACTTTATATGAATAATAACGAGAAAACAATTGAAGATTGCATAAATCGACATAAAAAAGAGGGG
CGTTTTGTTAGTGATCTAAATAGATTGGATTTTAGTTATACATGTGATTTGGACCATCCGATTGAATGTTTTTAT
GCACAGCCTTTTGTCTAGCTGAAAGGGAACATAATCGAAATATCGATTTGATATATCTTATACGGGAACTGC
TATCGTGAGGAACTGATTTTCATGCTATCTCTATTTTATAAAAAATAAAAAATTTATATATGATTCAAAGGCTTTG
TTAATAAATTTACCTCCAAGAAAAGCGACGGGAGGGGCAAGAACAGCTAATCGATTAAAAATATCATTACGAAAGT
TGCATAAATAATTATAGATTTTAAAAAATAATAATGATAATTTGAATCTTCTTCAGGACAAAAGCATGCTATA
TTTTACCGACAGTGTCAATTCGTTCTGCTAAAAATGAAGTCGTTTATCGGGAAGTTTTTAAAAATGATTATATATA
TCGCCCGGTATAATGGTTTCAGGAGGGCAAGGTGGGGTGGAAAGGGTTGTTGCCCAACAATGTAACATTTCTAAAA
ATTTGGGGGTTAAAGTCATTATACTTGATAAAACATACTTCAAATTTCTAACAAAATTCGTAACAAAAAATAC
AAGTAGCACTTTATCCAATATTAGTTTCTCTTTATTTAACCTTACAAAATTCAGTGGCGTGACGTTTTAAAGTTA
TTGCACATGGCTATTGTTCTCCTTTTTATAGGAATGACATCTTAATAGCTCATGGCAATATGAAATGTTATTTTC
AAACAGTCATGAATAAAAAACCTAATCGGTTGTCTGGCAGTGGTCTTTTATCTTTCTATGAGCGTTGGGCTGGAG
CATTTTTCAAAAAATATCTGGGCTGTTTCAAATAAGGTTAAAGTGAATGGAATGAGCTTTACAATATTAATTCAC
ATAAAATCAAAGTTGTTGCAAATTTTATAAATCTTGCACAATTTGATTACACTGATGTTAATGAAGCAGAATATG
TGACATTTGTCGGGCGATTGGAAAAAGGAAAAGGAATAGATGATCTGTATTACATATGTA AAAATCTGCCAGATA
CTTCTTCCATTTAGTTTCAAGTATTTCCCGCCACAAAATTTGCTTCGCTAAATAATGTTCTGACCAGCATTTG
CTGTCCCTATGCGAAAATGCCAGAAATATTTAAGAAATCCAGAGTACTTATTTTACCCTTATTATGAAGGAT
ATGAGCTGGTTACTATTTGAAGCGCTATGCTGTGGTTGCCCTGTGATAGGCTATAATGTTGGTGAATTAGAGAGT
TGATATGCAAGAAATTTTCTGGCGTATTTATTTGCCAATAATAAAGAAGATTTAGCACAAAGTAGCCTACAAATTA
TTAGTCTTGATAATGAAAAATATATCATTTGAGACAACTATTTATAGCAAGCGTGAGCTTTTTTCTGAAGAGA
GATATGCGGAAATTTTAAACGGCGGCATTTAATGAAAAAATAAGAACTCTGTCTCATTTCAATTAACTCATAT
AATGAACCTTACCGGAGGAGGATATATTTACGTACGCTTGTAGTTTCTACAAAACAGAATGTTAATTTAACA
CTTATTTGATAAAAAATCCTCAGGTAACTATTCGAAGACAATACTTTTCAACATATATCATTTATTAAGGTAAA
CGTCAGGATATAATATCCAGGCTTTTTTTTATACCATCATTTTATGTCCCTTATATTTTCTCAATAATTA AAT
TTACGGGAGCAAGATATTTCTGCTTTTCACTCTCGGCTTGGATTGTTATGTCTGCTTTTTAGAACTACTCATG
CCCCACAAAAGATCATATTTGTTTACGGATAACTTCGAATATGACTTAATAAGACAAAAGATAAAAACATAACT
ACTTTTATTGAAAAATTAATTTGTTTATCTCAATGAATTTATCGGGCTTAAGAATTCAGATTTAGTTAGCTATATT
ACCCGGCAAGATAAAAAATGCAATGGATAAATTTTATGGGATTAAAAAAAGCAGAAATTTAATTTCTCCCTGTGATA
TTTAGTAGAGAAAAACCAACTGATGTATTGTGAGCTCACTTTATTAATGAGTATAATCGATTGAATAATGATAAT
AGGAAAAAGTAGTATTTACTGCATCTTTGATTTTTTCCAATATAGATGCTGCCAACTATGTTTTAAATGCA
GCAAAGTCTAATAATGATTATTGCTATATTTTGGCAGGTAGGAAAAGTACTACTTTGAATCTTCTCTGATTTGGAT
AATTTATTTTTTTTTCGATAATCTATCTAATAGTGAATGTCATATTTATATCTGCTTGTGATGTTTTTATTCT
CCTATAGTTTTAGGAAGTGAATGAAAACAAAATTCGAGAAGCACTATCATATGGATTATATATTTATGCGACA
GAGCATTCCTTAATCGGCTATGATGAAATTATACACAATAAGGAGTGTGTTAAAAAATCTCACATTTGGATGAG

GAATTCCTAAAGATTTCAAGATGAAAAGTATCAATAAACAGCTAATAATGCTTATCAGCAAAAATATTATTCA
 CATTATCGGTTTAAATGGCCATGAACTTGATATAATAAATTTTGACGATTAGTTAGTGGAGATATAATATGAACAT
 ATTAGTAACTGGTGGTCTGGATATATCGGATCTCATACGGCTATTGAATTACTGAATGCAGGTGATGAGATTAT
 CGTTCTGGACAATTTAGTAATGCTTCATACAAGTGTATCGAAAAATAAAAGAAATTAAGTCTGACGTGATTTTAT
 AACAACTACTGGAGATGCTGGGTGTAGGAAGACACTCTCCGCTATTTTCGAGAAACACGCCATAGATATAGTTAT
 TCATTTTGCTGGCTTTAAATCTGTTTCAGAGTCTAAAAGTGAACCCTTAAAGTATACCAGAATAATGTTGGAGT
 GACCATTACTTTATTACAGGTAATGGAAGAGTACAGAATTAATAAATTTATCTTTAGTTTATCTGCGACAGTCTA
 TGGTGAACCAGAGATAATTTCAATTCAGAAACAGCTAAAATTTGGAGGAACACGAATCCATATGGCACATCGAA
 GTATTTTGTGAAAAAATTTAGAGGATGTTAGTTCCACGGGAAAACGGATATAAATTTGCTTGAGATATTTTAA
 TCCTGTGGTCTCATTTAGTGGTAAAATAGGTGAGGCTCCATCTGGTATCCCTAATAATCTTGTTCCTTATTT
 ATTGGATGTTGCGAGTGGTAAACGTGATAAATTTATTTATTTATGGCAATGATTACCCTACTAATGATGGAACAGG
 TGTAAGGGATTTTATTCATGTTGTTGACTTAGCGAAAGGTCATTTGGCTGCAATGAATTTAAGTATCAATTC
 GGGATATAATATCTTTAATCTTGGTACAGGAAAAGGTTATTCGGTACTTGAATTAATCACTACATTTGAAAAAT
 AACAAACATTAAGGTCATAAATCTTTTATAGAGAGAAGGGCAGGGGATGTTGCGCTCTTGTGGGCTGATGCAGA
 TAAAGCTAATTTTATTTGACTGGCAAGCCGAACAACTCTAGAACAGATGTTATTGGACTCGTGGCGTTGGAA
 AAAAAATTTCCAGACGGATTCTGAATATAAAAGGTTTCAGTTTTATGAATCAATCAGAGCAGAGAAAAAATA
 CTGGTTCTTACACCTCGCTTTCCCTACCTGTATTGGAGGGGATAGATTAAGAGTCTATATGTTATGTAAGAA
 CTTTCCAAAAATATGATCTTATTCTTCTGAGCTTATGTGATCAACCACTAGAACTTGAATAAATAAATGAC
 TCGGTCTTCAAAGAAATTCATCGTGTCTATCTACCAAAATATAAATCATATTATAATGTATTAAAAGCTTTGGTT
 ACGCAAAACCCTTGCAAATGCTTATTATCAATCGGACACATTTAAGAATAAATAACAATAAATTAATTAACAA
 TGCGATGCAGTATTTTGTCTGATAAGAGTTGCTGATTATGTTAAGGATACAGACAAGTTCAAATTCCTGAT
 ATGACAGATGCAATATCTTTGAATTACAGTTCGCTTAAAAAATAGCAAGTAAAAAAGTTTGCCTGCAATTTAT
 TATTCTCTGGAACAAAAAGATTAGAATCATATGAACGTTCTGTGGCGAATCTTTTTGATTTGACCACTTTTATT
 TCATCCGTAGACCGTACTATCTTACCTAATCTGGGCAGTAATATCCATATAGTCAATAATGGGGTTGATACA
 TCAGCCTTGAGATATATAAAAGAGAAATAAATAAATCGATAAGCCTGTGGAACCTTATTTTATCGGAAATATGAT
 TCTTTACAAAAATATGGATGCTGCAAAACATTTTGTCTAAGAATATTTTACCTTGCTTGTATGATGAGTTTAAATTT
 ATTTTTAAAGTGATTGGTAAGATCTCAGAACTAATAAATAAATAAATTAATTAATTTAAAAATACAATGCTTTA
 GGTACTGTTGATGATCAATTCCTCCGCTTCTACAGGCATATAGGTATATGTCCTGTTGCTTGGAGCAGGC
 GTACAAAAATAAATCTTGAATACATGGCTTTAGGTTTACCATGTATTACATCTAGCATGGTTATGAAGGTATT
 AATGCAAAATCAGGTAGCGAAATTTTTGTTGCAGATACAGTAGAGCAATATAAAAACGTAAGAGAAATAATT
 TACGATTATAATCGTTACTGAAGTGGCTGAAAATGCCCGTAGTTTTGTAGAAAATAATTTTTCTTGGGAATCA
 AAAGTTGCCAATTTAATGAATACATTAGATGAGAAATATATGAACAATAAATAAATTTATACACCTATCATTAT
 GGCTGGTGGTTTAGGCGAGTGGTGTGGCCACTATCAAGAATTTCTATCCGAAACAATTTCTTAGCCTAATCGG
 TAGTCATACCATGCTTCAAACAACGGCTAATCGTCTGGATGGTTTGGATTGTACCAACCTTATGTCATTTGTAA
 TGAACAATACCGCTTTATAGTTGCTGAACAGCTTAGAAAAATCGATAGATTGACTTCAAAGAATATCATCCTTGA
 GCCTGTTGGGCGTAACACTGCCCTGCAATGCAATTAGCGGCTTGTGATGTCTAAGTCTGATAAAAGTGCAGA
 TGATCTTATGCTCGTACTGGCTGCAGATCACGTTATACACGATGAAGAAAAATTTGTAAACGCTGTTAGATCGGC
 AATTCATACGCTGCTGATGGGAAATTTGTAACATTTGGTATAATTCAGACAAAGCAGAACTGGTTATGGTTA
 TATACATCGAGGACAATATAAATCAGGAAGATTGGATGCATTTATAGTGTATCATTTGTTGAAAAGCCAAA
 TCATGAGACAGCCACTAAATATCTTGTCTCCGGTGGTATTATTTGGAATAGCGGTATGTTTTGTTTAGTGCAAA

TCGTTATATAGAGGAACTTAAACAATTTTCGGCCTGATATTTTATCCGCTTGTGAAAAAGCAATTGCTTCAGCGAA
CTTTGACCTTGATTTTGTGCGTTTAGATGAAAGTTCTTTCTCTAAGTGCCCTGAAGAATCAATTGATTACGCTGT
AATGAAAAAACAAGACGCAATTGTTATTCCAATGGATGCTGGCTGGAGTGATGTCGGTTCATGGTCTTCTCT
TTGGGAAATTAATGATAAAGACTCAGACGGCAACGTAATAGTTGGGGATATTTCTCTCATGAAACAAAGAATTC
TTTCATATATGCCGAATCGGGAATTGTTGCTACAGTTGGAGTGGAAAAATTTAGTTGTTGTCCAAACAAAGGATGC
TGTTCCTGTCTCAGAGAGAAATAAAGTTCAGGATGTAAGAAAAATAGTAGAACAAATTAATAATTCAGGTCGTAG
CGAGCATTATGTTTCATCGCGAAGTATATCGTCCTTGGGGTAAATATGATTCCATTGACACAGGGGAGCGTTATCA
GGTCAAACGTATAACAGTAAATCCTGGTGAAGGACTTTCTTTACAAATGCACCATCATAGGGCAGAACATTGGAT
CATAGTTTCTGGAAGTGAAGGGTACTATAGGTTCTGAAACTAAGATTCTTAGCGAAAAATGAATCTGTTTACAT
ACCTCTTGGTGTAAATACACTGCTTGGAAAAATCCAGGAAAAATTCCTCTTGATTTAATTGAAGTTCGTTCTGGATC
TTATTTAGAAAGACGATGTTATCCGTTTTTCAGGACCGATATGGTCGTAGCTAAATTTTTGATAATGTAACGTT
AGTAGAAGAGCGCTAATATTTTTAGTTAATCTGTAATAAGTATATTTGTTTAAAGGTATATCATGTGCGAGTTTAC
CCTGCTTTAAAGCCTATGATATTCGCGGGAATTAGCGGAAGAACTGAATGAAGATATTCCTGGCGCATTTGGTC
GCGCTTATGGCGAATTTCTCAAACCGAAAACCATTTGTGTTAGGCGGTGACGTCGACTCACCAGCGAAACCTTAA
AACTGGCGTGGCGAAGGGTTACAGGATGCGGGCGTCGATGTGCTGGATATTTGGCATGTCCGGCACCAGAGAGA
TCTATTTCCGCCAGTTCCATCTCGGCGTGGATGGCGGCATCGAAGTTACCGCCAGCCATAACCCGATGGATTACA
ACGGCATGAACTGGTGCAGGAGGGCTCGCCGATCAGCGGTGATACCGGACTGCGCGACATCCAGCGTCTGG
CAGAAGCCAACGACTTTCCTCCCGTTGATGAAACCAAACGCGGTGCTATCAGCAAATCAATCTGCGTGACGCTT
ACGTTGATCACCTGTTTCGTTTATATCAACGTCAAAAACCTCACGCGCTCAAGCTGGTGATTAATCCGGGAACG
GCGGGCGGGTCCGTTGGTGGACGCCATTGAAGCCCGCTTTAAAGCCCTCGGCGCACCCGTGGAATTAATCAAAG
TGCAACAACAGCCGGACGGCAATTTCCCAACGGTATTCCTAACCCGCTACTGCCGGAATGTCGGGACGACACCC
GCAATGCGGTGATCAAACAGCGCGGATATGGGCATTGCCTTTGATGGCGATTTTGACCGCTGTTTCTGTTTG
ACGAAAAAGGGCAGTTTATTGAGGGTACTACATTGTGCGCCTGCTGGCAGAAGCGTTCTCGAAAAAATCCCG
GCGGAAGATCATCCAGATCCACGTCTCTCTGGAACACCGTTGATGTGGTACTGCCGAGGGCGCACCCCGG
TAATGTCGAAAACCGACACGCTTTATTAAGAACGATGCGCAAGGAAGACGCTATCTACGGTGGCGAAATGA
GCGCCACCATTAATCTCCGTGATTTTCGTTACTGCGACAGCGGCATGATCCCGTGGCTGCTGGTCCGCGAACTGG
TGTGCTGAAAGGAAAAACGCTGGGCGAACTGGTGCAGCGGATGGCAGCGTTTCCGCAAGCGGTGAGATCA
ACAGCAAATGGCACACCCCGTTGAGGCGATTAACCGGTGGAACAGCACTTTAGCCGCGAGGGCTGGCGGTGG
ATCGCACCGATGGCATCAGCATGACCTTTGCCGACTGGCGCTTTAACCTGCGCTCCTTAACACCGAACCGGTGG
TGCGGTTGAATGTGGAATCGCGCGGCATGTACCGCTGATGGAAGAAAAGACAAAATTTATCCTTGAGTTACTGA
ACAAGTAATTCAGTAATTTATATAAATGGGTTTTAAAAAACGAAAAGATGAGATATCCGGTGTGGTATATCCA
AGGTAATGCTATTCAGTATCTCTATGAGTGAGTTAACATCTATACCACATTTAAGCCGCACACTTCGGGATCCCC
ATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCGAAGTTCCTATTTCTTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACT
AAGGAGGATATTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTT
GTATACTTATTTGCGAACATTCAGGCCCGGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTC
CAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGGCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTA
TACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAAGACGGAAGAAGTATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAACTGGT
TCCTTACTATACGGTGAAGAGTTTGTGCAATCTCTGGAACGCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAGCAGG
TGCAAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATGATGGTGGTAA
CACCTTCTCCAGGACACTATTCGTGTAATCGTGAGCTTTTCAGCAGAGGGCTTTAACTTCATCGGTACCCGGTGT

TTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCATGAATTGGT
 AGCACCGATCCTGACCAAAATCGCCGCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGGCGATGG
 CGCAGGTCCTATGTGAAGATGGTTCAACACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTC
 TCTGCTTAAAGGTGGCTGAACCTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTACCAGTGAATAACGGTGAAC
 GAGCAGTTACCTGATCGACATCACCAAGATATCTTACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGT
 GATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACCGGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGCT
 GTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTTTGCACGTTATATCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTGCCGCATCTAAAGT
 TCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGGCGACAAGGCTGAGTTTCATCGAAAAAGTTGCTGCTGCGCTGTATCT
 GGGCAAAATCGTTTCTTACGCCCAGGGCTTCTCTCAGTTCGCTGCTGCGTCTGAAGAGTACAACGGGATCTGAA
 CTACGGCGAAAATCGCGAAGATTTTCCGCTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCTGCAGAAAATCACCGATGC
 TTATGCCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAATGCGCGATGACTACCAGCA
 GGGCTGCGTGATGTCGTTGCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCGGTTCGGACCTTCTCCGCGAGCGGTTGCCTA
 TTACGACAGCTACCGTGTCTGTTCTGCCTGCGAACSTGATCCAGGCACAGCGTGACTATTTTGGTGGCGATAC
 TTATAAGCGTATCGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

SEQ ID NO: 14 (пример нуклеотидной последовательности локуса *rfb* O8 – штамм-продуцент O8-EPA stLMTB11734)

ATGACGAATTTAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCGATACCC
 AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTACGTACATGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAA
 GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACCGGGTCAAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAAATCA
 CTCCTTGAGCAGCGGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTTATG
 AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTTGGTGACAACCCA
 TTTGTGCTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATG
 ATTGACAGTTTCAACGAAACGGGCGCAGCCAGGTGCTGGCAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCC
 GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGATGTTGAATTTATCGAAAAACCGGAT
 CAGCCCGACAGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGAACTG
 GAACGTACTCAGCCTGGTGCATGGGGACGATTCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAACAAATCC
 GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG
 TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCGTAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA
 TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTAAAAATTCGACGAAAAGTAATTTGTTGCGAA
 TCTTCTGCCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA
 GGATTTTCTTGTTCAGAGCGGATTTGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA
 ACGCTCGTCACATCATAGGCATGCATGCAGTCTGTTAGCTGTAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC
 CTCTATTAATCAAACCTGAGAGCCGCTTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGCTAGCGAT
 CGCTTAAGATCTAGGATTTTATTATGTTACTTCTGTAATTATGGCTGGTGGTACCGGCAGTCTGCTCTGGCCGA
 TGTCACGCGAGCTTTATCCGAAACAGTTCCTCCGCTGTTCCGGCAGAACTCCATGCTGCAGGAAACCATCACCC
 GACTCTCGGGCCTTGAATCCATGAACCGATGGTCATCTGTAACGAAGAGCACCGCTTCTGGTGGCTGAACAGC
 TACGCCAGCTCAATAAGCTGTGAATAATATTATTCTTGAGCCGGTCCGGCGCAACACCGCCCGCCATCGCCC
 TGGCAGCCCTTACGGCACCCGCGACGGCGACCCGCTGATGCTGGTTCTCGCCGCTGACCATATCATCAATA
 ACCAGTCGGCCTTCCACGACGCCATCCGGGTCGCCGAGCAGTATGCTGATGAAGGTCACTGGTCACTTCGGTA
 TCGTGCCGAATGCCCCGAAACTGGCTACGGTTACATTCAGCGCGGCTGGCGCTCACCGATAGTGCCCATTCGG

CGTACCAGGTGGCCCGCTTTGTGGAGAAGCCGGATCGCGAGCGCGCCGAGGCTTACCTCGCCTCCGGGGAGTACT
ACTGGAACAGCGGCATGTTTATGTTCCGCGCCAAGAAATACCTCATCGAGCTGGCCAAATACCGTCCGGATATCC
TGGAAGCCTGCCAGGCTGCGGTGAATGCCGCCGATAATGGCAGCGATTTCATCAATATCCCGCATGATATTTTCT
GCGAGTGCCCGGATGAGTCCGTGGACTATGCCGTTATGGAGAAAACCGCCGATGCGGTGGTGGTCCGTCTCGATG
CTGACTGGAGCGACGTCCGGCTCCTGGTCCGCACTATGGGAGGTCAGCCGAAAGACGAGCAGGGCAATGTCCTCA
GCGGTGACCGGTGGGTACACAACAGCGAAAACCTGCTACATCAACAGCGACGAGAAGCTAGTGGCGGCCATTTGGCG
TAGAGAATCTGGTGATGTGCAGCACTAAGGACGCCGTGCTGGTGATGAATCGCGAGCGTTCCAGGACGTGAAGA
AGGCGGTGCGATTCTCAAGCAGAACCAGCGCAGCGAGTACAAGCGCCACCGTGAGATTTACCGCCCTGGGGCC
GTTGCGACGTAGTGGTCCAGACCCCGCGCTTCAACGTCAACCGCATCACGGTGAACCAGGGCGTGCCTTCTCGA
TGCAGATGCACCACCATCGCGCCGAGCATTGGGTTATTTCTCGCCGGCACCAGGTCAGGTGACTGTCAACGGTAAGC
AGTTCTGTTGTCCGAGAACCAGTCCACCTTTATTCGATTGGCGCCGAGCACTGCCTGGAAAACCTGGCTGTA
TTCCGCTGGAAGTGTGGAGATCCAGTCCGGGGCGTACCTTGGCGAGGACGACATTATTCGTATTAAGACCAGT
ATGGTCGTTGCTAATATTTTTCGGGACAAGACGCAGAATGACACAGTTAACTTGTTTTAAAGCTTATGACATCCG
TGGTGAACCTGGGTGAGGAACTGAACGAGGACATCGCCTACCGTATCGGTGCGCCCTACGGCGAATTTCTGAAACC
CGGGAAGATAGTGGTGGGGGGCGATGTGCGCCTCACAAAGCGAGTTCGCTGAAGCTGGCGCTGGCCCGCGGGTTAAT
GGACCCGGTACCAGCTGCTGGACATCGGCCTGAGCGGTACCGAAGAGATTTACTTTGCCACCTTCCACCTTGG
GGTAGATGGTGGCATCGAGGTGACCGCGAGCCACAATCCTATGAACTACAACGGCATGAAGCTGGTGCAGGAGAA
TGCGAAGCCCATCAGCGCGACACCGGCCTGCGGGATATCCAGCGCCTGGCGGAGGAAAACAGTTCCCGCCAGT
GGACCCGGCGCTCGCGGGACCTGAGCAAGATATCGGTAAGAGGATATGTTGACCATCTGATGAGCTACGT
GGACTTCTCGAACTTACCCGTCCACTGAAGTTGGTGGTGAACCTCCGAAACGGGGCTGCGGGGCACGTATTGA
TGAGGTGGAGAAACGCTTCCGCGCGGCTGGGGTCCCGGTAACCTTTATCAAGGTGCATCACCAGCCGGATGGCCA
TTTCCCTAACGGTATCCCGAATCCGCTGCTGCCGGAGTGCAGCCAGGATACCGCCGACGCGGTGCGCGAGCATCA
GGCCGACATGGGGATTGCCTTTGACGGCGACTTCGATCGCTGCTTCTGTTTCGATGACGAAGCTTCGTTTATCGA
GGGGTATTACATTGTCCGCCCTGCTGGCTGAGGCGTTCCTGCAGAAGCAGCCGGGAGCGAAAATCATTACGACCC
GCGCTTGACGTGGAACACGGTAGACATCGTGACCCGCAACGGCGGCCAGCCGGTATGTCGAAGACGGGGCATGC
GTTTCATCAAGGAGCGGATGCGTCAAGAACGCTATCTACGGCGGGGAGATGAGTGCACACCATTAACCTCCGCGA
TTTCGCTACTGCGATAGCGGGATGATCCCGTGGCTGCTGGTGGCGGAGCTGCTGTGTCTGAAGAACAGCTCGCT
GAAATCGCTGGTGGCGGACCGCCAGAAGGCGTTCCCTGCGTCCGGGAGAGATCAACCGCAAGCTAAGTAATGCTGC
TGAGGCGATCGCCCGCATCCGGGCGCAGTATGAGCCGGCGGCTGCACACATCGACACAACGGACGGGATCAGTAT
TGAATACCCTGAATGGCGCTTAACTGCGCACGTCTAACCCGAGCCGGTGGTGCCTCTGAACGTTGAGTCCAG
AGCTGATGTGGCGCTTATGAATGAAAAACGACCGAGCTGTTACACCTGTTAAGCGGGGAATAAGGTGAGAGATT
TACTAACGACGATTTATCGTTATCGGGGATTTATCTGGAGCAGTGTAAACGTGATTTTCAGGCACGCTATCAAA
CTAGTATGCTGGGCGCACTATGGCTCGTTTTACAACCGCTCTCTATGATTCTGGTCTATACCCTGGTTTTTTCCG
AGGTGATGAAGCAAGAATGCCCCGATAATACCGGGTGGTTGCTTATAGTATTTATCTGTTCCGGGGTACTGA
CCTGGGGATTTATTTACTGAGATGCTGGATAAAGGTGAGAGCTATTTATTAACAATGCTAATCTGATCAAGAAAC
TCAGTTTTCCGAAAATCTGTCTGCCGATCATCGTGACGTTATCGGCGGTGCTAAATTTCCGCGATTATTTTCAGTC
TGTTTTCTAATTTTTATCATTGTACCGGTAACCTCCCGGGTGGCTCTTTCTCTCGGTGATACCGGTCCTGCTTT
TGCAGATCCTGTTTCCCGGTGGGCTGGGGATGATCCTTGGTGTGATGAACGCTTTTTTCAGGGATGTGGGGCAAC
TGGTTGGCGTTGCGCTGCAATTTCTGGTTTTGGTTTACACCCATTGTTTATGTAAGTGAATTCATTACCTGCATGGG
CAAAAATCTGATGATGTATAACCCGATGACTCGGATCATGCAATCTTATCAGTCCATCTTCGCCTATCATCTGG

CCCCAACTGGTATTGCTATGGCCAGTATTGGCTCTCGCCATTATTTTCTGCGTCATCGGTTTCAGGATGTTCC
GCAAGCATGCGGGGATATGGTGGATGAATTATAATGAGTTATATCAGAGTAAATAATGTCGGTAAGGCGTATCG
CCAGTATCACTCAAAGACCGGAGACTGATCGAATGGTTATCCCCTCTGAATACCAAACGCCATAATTTGAAATG
GATCCTCCGCGATATTAATTTGAAAGTCGCTCCGGGCGAGGCTGTGCGTATTATCGGTATCAACGGTGCAGGCAA
GAGTACCCTGCTTAAACTCATAACCGGGACGTCCAGGCCGACGACTGGAGAAATGAAATCTCCGGACGTGTGCG
TGCATTACTCGAATTGGGGATGGGGTTTCATTTCTGATTTCACTGGTCGGCAGAATGTTTATATGTCTGGGCAACT
GTTGGGGTTATCGTACAGAAAATAACTGAACTGATGCCGCAAATGAAGAGTTTGTCTGAGATTGGGGACTATAT
CGATCAACCTGTGCGCGTCTACTCCAGTGGGATGCAAGTTCGATTAGCTTTTAGTGTAGCGACGGCTATCCGTCC
TGATGTGCTAATTATCGATGAGGCATTATCTGTTGGGGATGCATATTTCCAGCATAAAAGCTTTGAGCGTATTCCG
AAAATTTGTCAGGAAGGGACCACGCTGTTGCTGGTATCCCATGATAAACAAGCGATCCAAAGCATTTGCGACCG
GGCCATTTTATGAAATAAGGCCAAATGAAATGGAAGGTGAACCTGAAGCAGTGATGGATTATACAATGCTCT
TCTGGCCGATAAACAATAATCAGTCCATTAAACAAGTTGAGCATAATGGTAAAACGAAACTGTTTCAGGCACTGG
TGAGGTGACTATCTCTGAGGTTTCATCTCTCGATGAACAGGGCAATGTGACTGAATTTGTTTCGGTAGGGCATCG
TGTCAGCTTGACAGGTCAACGTTGAGGTCAAGGACGATATTCCTGAGCTTGTGTCGGATATATGATTAAGGATCG
ACTTGGGCAGCCGATTTTCGGGACCAATACGTACCATCTCAATCAGACACTCACCTCCCTGAAAAAGGAGAAAA
GCGTTCGTTCTTATTTTCTTTGATGCGAGATTGGGGTTGGCTCCTATTCTGTCGCTGTGCGGTTGCATACTTC
CAGTACGCACCTCGGCAAAAATATGAATGGCGCATCTGGCCGTGGTATTCAACGTCGTTAACCGGAACAACA
AGAGTTTGTGCGCGTGTCTGTTGCCGCTGAACTGGAGATTCTTAATGGGTTGTCGTTTTATCGTTTCAATTT
GAAGAACGACACAGAGTTTCGGTTGAAGAAATCAAGCGCCGCTTGAGTTTTTATTTACCTTTTCTTGCAGGTCTG
AAGGACATTTATCCTGATGGCGTGATTGCGGATATTGGTTGCGGACGTGGCGAATGGTTGGAGATCCTGACTGAA
AATGGCATTGCGAACATCGGCGTCGATCTCGATGATGGCATGTGGCGCGCGCCAGGGAGGCCGGACTGAATGTG
CAGAAAATGGATTGTCTGCAGTTTTTCAAAGTCAGGCGGATCAGAGCCTGATAGCGTTGACCGGTTTTCATATT
GCTGAGCATTTGCCGTTTGGGTCCTGCAGCAACTCGCCATGCATACCCTACGGGTGCTGAAACCAGGTGGTTTG
CTGATCCTCGAAACGCCGAACCCGGAGAATGTAAGCGTCGGCACCTGTTCAATTTATATGGATCCAACGCATAAT
CATCCTCTGCCACCGCCACTGCTTGAATTTTTACCTATTCATTATGGTTTTACCCGAGCAATTACCGTTGCTCTG
CAGGAAAAAGAGGTTCTTCAATCTCCGGATGCAGCCGTTAATTTGGTCGATGTACTCAAAGGGGTGAGCCCCGAC
TACAGCATCATTTGCTCAGAAAGCAGCGCCAACAGATATTTTGAACGCTTTGACACCCCTGTTTACCCAGCAGTAC
GGTCTGACGCTGGATGCTCTGAGCAACCGTTACGATGCGATTTTGGCGCAACAGTTTTTCTGTCGTTGTCTCACGG
CTGGAGACGTTGAACCAACCTATATGCAACAGATAAGCCAAATGTGAGAGACTATTCAGACGTTGCAAGGTGAG
GTTGACGATCTGAGTCATGTCATCGATCAGAACCATCAGCTTCATCAGCAAATGGCGGATTTACATAACAGTCGT
TCATGGCGTATTACTCAACCACTACGCTGGTTGTCTTTGCAACGTCAATTTTACGTCAGGAAGGGGCTAAAGTG
CGAGCCCGTAGGGCTGGGAAAAAATATGCGCAAAGGGATGGCGCTCTCGCTGGTCTTTTTCCATCGTTACCCT
AAGTCTAAGGTTTATCTGTTTAAAGTTCTGAGAAAACTGGCTGCTATACATTGCTACAACGTTTGTTCACACGC
GTAATGCTGGTGCAATCTGACACGATGATGATGCAGTCCAGAAGATATGATGTGGGTACTGAAGAAATGACAAGT
CGCGCGATGAGTATTTATAACGAATTAATAAATAAATAACCGAGAAATAACGATGCGTATTGTCTATAGATTTAC
AAGGCCACAGACGGAAAGCCGCTTTCTGTTGGCATCGGTCGTTATAGTATCGCAATCGCCAGAGGCATAATCAGAA
ATAACAGCCGGCATGAGATTTTCTCGCGCTATCCGCCATGCTGGATGAGTCGATTGCAAAATATTAAGGCGCAAT
TTGCCGATCTCCTGCCGGCAGAAAATATAGTCGATGGCATGCCGTAGGCCCTGTTGTCGCGATGGACCAAGGTA
ATGAATGGCGTCGGGAGAGCGCAGAAGTATTGCGGAAGCGTTTCTTGAATCATTGTGTCCAGATGTCGTTTTCA
TTACGAGTTTGTGTTGAAGGTCATGTCGACGATGCGGCTACATCGGTACACAAATTTAGTCGTGATATAAAGTAG

CCGTA CTGCACCACGATCTTATCCCCCTCGTGCAGGGCGAAACCTATCTGCAGGACGATGTATACAAACCCTACT
ATTTACAGAAAGTTGAGTGGTTAAAAACGCTGACCTTTTGTGACTAACTCTGCTTATACCGCACAGGAAGCGA
TCGAGCATCTGCATTTACAGGGCGATCATGTGCAGAATATTGCAGCCGAGTCGATTCTCAGTTTTGTATGGCGG
AGGTGGCAGCGAGCGAAAAAGAGACCGTCCTTGGCCATTACGGTATTACAGCGGAGTTTCATGTTGTATGCGCCCG
GAGGATTTGACTCAAGGAAAACTTTAAACGGTTGATTGAGGCCTATGCCGGGCTCAGTGATGCCCTTACGTCGCA
GTCACTCAACTGGTCATCGTCAGTAAGCTTTCCATCGGTGATCGTCAGTATCTGGAATCCCTTGCCTCAGGTAATG
GTTTACAGCAGGGCGAACTGGTACTCACTGGTTATGTGCCGGAAGATGAGCTGATCCAGCTCTATCGCCTATGTA
AGCTGTTTCATCTTTGCTTCACTACATGAAGGTTTTGGGTTGCCGGTTCTGGAAGCAATGTCGTGCCGTGCGCCGG
TGATTGGCTCAAATGTACCAGTATTCCTGAAGTCATCGGTAATCCTGAGGCATTATTCGACCCGATTTCTGTCT
CTTCCATGAGGGATAAGATCGCGCAATGTTTACTGATGATACCTTCTCGCGCTGCTGAAAGAAATGGCGCAGC
AGCAAGCGCTAATTTCTCTTGGGATAAAGCTGCGGTGACTGCTCTGGAAGCTTTCGAAAAGATCGCGGTAGAAG
ACACCGGACTGCGCAGGTTTTGCCTGAAGCTTTGATTGAGAAGATCCTTGCTATCTCACAAGGGCAGCCAGATG
ACCGCGATCTGCGCTTGTGCGCAACGGCCATTGATTACAATCTGAAAACGGCAGAACTTTATCAAATCGACGATA
AATCGCTGAACTGGCTGTGGAAGGCCATTGATAGCTCATATAGTCTGGCGTTGGTCAACCGGAAATTTGCC
GGGCACTCTCAGCCGATGGTGTAGAGTTTTATTGCATTCCTGAAGGACCAGGTGATTTTGGCCAGATGCCT
CGTTTTATGGCACAGTCGAAAATAGTGATCTTCTGGCATTATAATCAATGTCAGACCCGCAAGAGTAACGAAA
AGATAGATATTATTAGCAGAAATATCTATCCACCGGGTTACCAAAATGGATGCCAAAGTAAAATTCCTTCATT
GTTATGCTTGGGAAGAAACGGCTTTCCGCAACCGTGGATCAATGAATTAATCGGAACTTGACGGAGTGCTGT
GTACTTCGGAACATGTTCTGAAAATACTGATTGATAACGGACTGAATGTGCCGCATTTGTTGTTGGCAATGGCT
GTGACCATTGGCTCAATATCCCAGCCGAGACGACAAAAGATGTGGATCACGGAACATTCGGTTTCTGACGCTCT
CTTCTGTTTTCCACGCAAAGGGATACAGGCAATGCTTCAGGCTTGGGGGAAGCGTTCACTCGTCGTGACAATG
TTATCTTAATCATTAAGACTTTTAACAATCCGCACAATGAAATTGACGCATGGCTGGCTCAGGCCAGGCTCAAT
TCATAGACTATCCCAAAGTTGAAGTGATCAAAGAGGATATGTCAGCCACCGAGCTTAAAGGGCTTTATGAAAGCT
GTGATGTTTTGGTTGCTCCAGGTTGCGCTGAAGGCTTTGGTTTACCTATTGCTGAAGCAATGCTGAGTGGGCTAC
CGGCTATCGTCACCAATTGGAGCGGGCAACTTGATTTGTTAATTCACAAAATTCATGGCTGGTGTACTATCAGT
TCACTCGGGTAAAAACGCACTTTGGTCTGTTTTCTCAGCCTGGGCCAGTGTGGATATTGACAACTTAAACAGATG
CATTAAAAGCGGCAGCCTCAACCGATAAATCAGTGCTGCGTGACATGGCCAATGCTGGTCCGAGCTTCTTCTGC
AGCAGTTTACCTGGAAAGCGGTGGCTGATCGTTCTTCCAGGCGGTCAAGACTCTGCGTGCGCATATTGATATTG
CACAGCATCGGGCGCGCATTGGCTGGGTGACGACCTGGAACACGAAATGTGGGATCGCAACCTATTTCCAGCATC
TGGTGGAAAGCGCACCTCATGGCGGGATGTTGTTTTGCTCCCAGGTCAGCGCTGGCGATCTTGTGTGTGCAG
ACGAAGAGTTTGTACTTCGCAACTGGATTGTAGGTAAGAGAGCAACTATCTGGAAAACCTCCAGCCACACATTG
ATGCTCTGAGACTCGATGTCATTGTGATCCAATCAACTATGGATTCTTTAATCATCGAGAACTGTGCGGTTTTA
TTCGTGCCAGCATGACGCCGGTCGTTCAAGTTGTTATGACGATGCACTCAACTGTGGATCCGCTGGAAAAAGAGC
CGAGCTGGAATTTCCGTCTTGTGAAATGAAAGAGGGCTGGCACTTTGCGACCGGTTGTTGGTGCATTCGATTG
CCGATATGAACCGCTTAAAGATTTAGGCTTAACTGCGAATGTTGCTTTATTCCCGCAGGCTGTTATCAACTACT
CCGACGCGAGCGTCACACGTCAACAGCAGTCTTACCCTAATGCGAGCTATGGCTTCTGCTTACCGCATAAGG
GCCTGATGGAAGTAGTAGAATCCGTCCATAGACTCAAGCAAGCCGTAACCGGTTTCGTTTACGACTGGTGAACG
CAGAGTATCTGTTGGGGAGTCACGGATCTGGTGGCAGAGCTTAAAGCTGCTGCTCAGCGGTTAGGTGTTACCG
ATCTGATTGAGATGCATAATGATTTCTACCTGATGCGGAGAGTCTGCGGTTGCTTTCAGAAGCCGATCTTCTGA
TTTTTGCTTATCAGAATACTGGGAGTCTGCTAGCGGGCGGTACGTTATGGTATGGCGACTCAAAAACCTGTTG

CCGTAAACGCCCTGGCGATATTTGATGATTTGGACGATGCCGTCTTTAAATTTGATGGATGCAGCGTCGATGATA
 TCAGTCAGGGGATTGACCGGATCCTGAATCCATCCGTGAACAGAACTCTGGCAACCAGGACTCAACAACGTG
 CCGATGCATGGCGGGAACAACATGATTATCAAGCTGTTTCACGCCGTCTGGTTAATATGTGTCAAGGCTTAGCTA
 AAGCTAAATATTTTAAATAAAAAATATCTCTCTGTATTTTTGCCTTTGAATACAAGAGGGGTTAGATAATGTGT
 CATTTATTATGAAAATTATTTTTGCTACTGAGCCAATTAAATACCCATTAACGGGCATCGGTTCGATATCCCTGG
 AGCTGGTTAAGCGGCTGGCGGTGCCCCGCGAAATTGAAGAATTAAAGCTATTTACGGTGCCTGTTTATAGAAC
 AGATCCCTTTGGTGGAGAATAAAAGCGATACCAAAGCCAGCAATCATGGTCTGTCTGTCGGCGTTTCTACGCCGAC
 AGACGCTGTTGATTGAGGCTTATCGCTTGTGCATCCGCGGCCAGGCGTGGGCATTGCGCGACTATAAGGATT
 ATATCTACCATGGCCCAATTTTTATCTGCCGATAAACTGGAACGCGCCGTGACCACGTTTCATGACATATCCA
 TTTTACCTGCCCGGAATATCATCCAAAAGATCGGGTTCGCTATATGGAGAAGTCCCTGCATGAGAGTCTGGATT
 CGGCAAAGCTGATCCTGACCGTTTCTGATTTCTCGCGCAGTGAATTAATCCGCTTGTTCAACTATCCGGCGGAGC
 GGATCGTAACCACCAAGCTAGCCTGCAGCAGTACTATATCCACGCAGCCCGGCAGAGTGTCTGCCGTTACTGC
 AGAAATATCAGCTGGCGTGGCAGGCCACGCGCTATATATCGGCACTATGGAGCCACGTAAAAATATCCGAGGCC
 TGCTGCATGCCATCAGCTGTACCGATGGAGATCCGCATGCGCTATCCGCTAATCCTTAGCGGCTATCGCGGCT
 GGGAAAGACGATGTGCTGTGGCAGTTAGTCGAGCGCGTACTCGGGAAGGCTGGATCCGTTACCTCGGATATGTTT
 CGGATGAAGACCTGCCGATCTGTACGCAGCGGCCAGAGTCTTTGTTTATCCCTCCTTCTACGAGGGATTGCGTT
 TACCTATTCTTGAAGCGATGTCTTGCCTGTGCCGTTAGTATGCTCCAATGTACCTCTTTGCCTGAGGTTGTTG
 GCGATGCCGGCCTCGTTGCCGATCCTAATGATATAGACGCGATTAGCGCGCAAATTTTGCAGAGCCTGCAAGATG
 ATAGCTGGCGGAAATCGCCACCGCGCGCGTCTTGTCTCAGCGAAACAGTTTTCTGGGAGAAGTGTGCGACAC
 AGACCATTAACGCCTATAAATTAAGGTTGTCAGTTGAGAGTTTACACGCTCTATAAGACTTACTATCCCG
 ATACCTACGGCGGTTATTGAGCAGGTCATTTATCAGCTAAGTCAAGGCTGCGCCCGCGGGGAATCGCAGCCGATG
 TTTTCACTTTTAGCCCGACAAAGATACAGGTCCTGTGCTTACGAAGATCATCGGGTCATTTATAATAAACAGC
 TTTTGAATTTGCCTCCACGCGGTTTTGCTGAAAGCGTTAAAGCGTTTTAAGCTGATTAAGATGACTACGATA
 TCATCAACTACCATTTCCGTTTCCCTTTATGGATATGCTGCATCTTTGCGCGCGCCCTGACGCCAGGACTGTGG
 TGACCTATCACTCTGATATAGTGAACAAAAACGGTTAATGAAGCTGTACCAGCCGCTGCAGGAGCGATTCTCA
 GCGCGTAGATTGCATCGTTGCCCTGTCGCCCAATTACGTGGCTTCCAGCCAGACCCTGAAAAATATCTGGATA
 AAACGGTGGTATCCCGTTTGGTCTGGAGCAGCAGGACGTGCAGCACGATCCGCGAGGGTGCAGCACTGGCGGG
 AAACGTGCGCGATAAGTTCTTTCTTCTCGTCCGCACTTTCCGCTACTACAAAGGGCTGCATATCTGATGGATG
 CCGCTGAGCGTAGCCGACTGCCAGTGGTGGTTGTAGGGGGCGGCCGCTGGAATCGGAAGTGCAGCGTGAAGCGC
 AGCAGCGCGGGCTGAGCAATGTGATGTTTACCGGCATGCTCAACGACGAAGATAAGTACATTCTTCCAGCTCT
 GCCGGGGCGTGGTATTTCCCTCGCATCTGCGCTCTGAGGCGTTTGGCATTACGTTATTGGAAGCGCACGCTTTG
 CAAGGCCGCTGATCTTTCGAGATCGGTACAGGTACCTCTTTCATTAACCAGGACAAAGTGAAGTGGTTGCGTGA
 TTCCGCCGAATGATAGCCAGGCGCTGGTGGAGGCGATGAATGAGCTCTGGAATAACGAGGAAACCTCCAACCGCT
 ATGGCGAAAACCTCGCTCGTCTGTTTGAAGAGATGTTTACTGCCGACCATATGATTGACGCCTATGTCAATCTCT
 ACATACATTGCTGGAAGCAAATCCTGAGCGGCCGAGCTCGTCTGACTCGAGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTG
 CTTGCAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGGATAAAG
 CCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTCAG
 GCCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGT
 ATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCCTCAACATCGAAAGCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCC
 CGTGAGAAGACGGAAGAAGTATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAACTGGTTCCCTACTATACGGTGAAGAGTTT

GTCGAATCTCTGAAACGCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGAT
 TCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATTGATGGTGGTAAACACCTTCTCCAGGACACTATTTCGT
 CGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTTAACTTCATCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTG
 AAAGTCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTGGTAGCACCGATCCTGACAAAAATCGCC
 GCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGGCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTT
 CACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATCTCTGCTTAAAGGTGGCTGAACCTC
 ACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTACCGAGTGAATAACGGTGAAGTGAAGTACCTGATCGACATCACC
 AAAGATATCTTACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAA
 GGTACCGGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGTGGATCTCGGCGAACCGCTGTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTTT
 GCACGTTATATCTCTCTCTGAAAGATCAGCGTGTGCGGCATCTAAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCA
 GCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTGCTGCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCAG
 GGCTTCTCTCAGCTGCGTGTGCGTCTGAAGAGTACAACCTGGGATCTGAACTACGGCGAAATCGCGAAGATTTTC
 CGTGTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCTGCAGAAAAATCACCGATGCTTATGCCGAAAAATCCACAGATCGCT
 AACCTGTTGCTGCGCTCCCTACTTCAAGCAAATTCGCGATCACTACCAGCAGCGCTGCGTGCCTGCTGCTTGTAT
 GCAGTACAGAACGGTATTCCGGTTCGACCTTCTCCGACGGTTCCTATTACGACAGCTACCGTGTGCTGCTGTT
 CTGCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTACTATTTGGTGGCATACTTATAAGCGTATTGATAAAGAAGGT
 GTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

SEQ ID NO: 15 (пример нуклеотидной последовательности локуса *rfb* O15 – штамм-продуцент O15-EPA stLMTB11738)

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCGATACCC
 AAAGAGATGTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTACAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAA
 GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTGCAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA
 CTCCTTGAGCAGCGCTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCGGGCGTGACCATTATG
 AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCA
 TTTGTGCTGTTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATG
 ATTGACGTTTTCAACGAAACGGGCGCGACCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCC
 GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCCTGAGGGTAAAGTCAAGCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGAT
 CAGCCGCAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTGCTATGTGCTTCTGCCGATATTTGGCCGAACTG
 GAACGTAATCAGCCTGGTGCATGGGACGTAATTCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAACAATCC
 GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG
 TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTCCGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA
 TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTAAAAATTCGACGAAAAGTAATTTGTTGCGAA
 TCTTCTGCCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA
 GGATTTTCTTGTTCAGAGCGGATGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA
 ACGCTCGTCACATCATAGGCATGCATGCAGTGTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC
 CTCTATTAATCAAACCTGAGAGCCGCTTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGCTAGCATG
 AGCAAAACTAAACTAAATGTTCTTTACCTTGAATAAGTCAGGGTGCCAATTACCTACTGCCATTAATTAATTTT
 CCTTACTTGTAGAGTCAATGGTGTATCGAATTTTGGTGTATCTGAGTTTTTCATTGATAACTATACAAGTGTG
 TTAATGGTTGTTGAATATGGTTTTGGATATAGTGGGACAAGAGAAATAGCACTAAATAACGATAAAAAATACCAT
 TCTGAATTTTTTTCGGGTGTGGTGTCTGCTTTTTATTAATGCTAATTGCAGCTATAAATACTCATAATACTC

TGTTTTTTTTATGTTTTTAACGACGTTAAGTCTTTGTTATGTGTTGGTTTTCTGTCCGTAATTGCAGGTGTTTTC
AATCCAAATTGGTTTTTGCAAGGTAAGGAAATGATGAGTGTGATGGCTGTGCTGTCACTATTTTCACGAGGCATA
GCAGTCGTTGCAGTTTATCTAATTATAAAACCCGCAACGCCGATGTACATCAGTGCCTTATTATTGAGCATGCCA
TATATTTTGTATTCAATCTGTGGCGTTGCCACTTACTTATTATCAAGGAGATTTTTTTATGTAGGCCACCGATA
AAGAAAATCAAGTAATTTAAAAAATGGATTTCAATTTTTTTGTTCAACACTTGGCACTAGTGCATACACAATG
TTGACCCCTCTGTATTGGGTGGCGTATCTGGAAAGTTTGATGTAGGCATCTTTAACTCAGCTAACATGATCAAA
CAAGGTTTGGCTGGACTTGCATCACCATTAGTCCAAGCTTTTTATCCAAGAATTAACATTTTGCAAAGAGAGAAT
CCATATATTGCAAACCTAAAACTAGAATGATTCTTAAATACTTGCTTGTTTTTTACATGGCTTTAGCAATACCA
TTTTTACTTTTTGCCAACCAATTATCATTATTAATATTTCGGCATGAAAGGTGAAGTAATTGCAGGTGCAATGCAA
TTAATGACATTGCTTCCTATATTATAGGTTTAAATACAGTTGTGCGGTTACTTGTATTAGTACCTAATGGGATG
CAAAAACAGTATTTCAAATCTATTTTCTAGGAACTATTACTTGTTTAAGCATAGTTTATCCAGCATGTAAATAT
TATGGAGCAACGGGTGGCATTGTGAGTCTTATTGTAGCTGAAATTTTCGTTGGCATGGGAATGCTTAAACAATTC
ATTAAGTAATAAAACCGTATGTAGGCCTCATAAATTATGAATATCTCGGTAATAATATCTGTTTGGAAACGCC
CAGTTCAAATTAGAATTGATTCTCTCTGAGCTCGATTCTCAGGCTAAAGACAATAGTCTACACCTAGAAGTAATTG
TTCCGATAGTCATAGTGGTAAAGAAATTTGATGATGTAGTTGCTGATAATATTCATAAAAAGAAAAATATTAATA
TTATCCATCAACATACTAAAAATATACTCTCCGCTAAGCGCAATTTTCGGAGCATCCCTAGCCCATGGGGATTATT
TAATATTTCTTGATGATGATTGTATACCCGCAAGTGGATATATATCATCGTTGCTGAACTATTTAAAAAAATGA
ATAGTAAAAGCGTTTTATGTGGGGAAGTTAGATTTCGAAAATGAACTCATTGAGACCAGCAATTACTATCGCTACA
GGAACTCTTTACACCCTAAGTTTAGTGATAGTCCTGATATCTCTATGAATGCCTGGACTTTTGTGCGCAATGAATT
GTGTTCTTGATAGAAAGGCATTTTCATCAGGTATAGTTTCATATAATGAAAATTTTATTGGTTATGGTTGTGAAG
ATCATGAGTTTGGGTGGCAACTTGAAAAAATGACTTCAAAAATTTATTTTGGCTGATTTTAAAATATTACATCACG
AATACAGTGGCGATATAGAAGGATATACAAAAAATTCGTGCTACAGCACGTGATGGTATGAATGTATTAAAGCA
AAGTAAGGCCTGAAATGTTTTCTACTAATAAAAAATTTATTCCTAGTTGAGAAAATTTTAGTAAACACAAAACGT
TTAGTAAAATATGCCAATCAATATTTTCAATAAATTTATTTTAAAAAAATAATAACAATTTTAAAAAAAACAG
ATGCAAATAAAAACTCTATTTCCCAATTTCTTACAGATATGTGTTGATTTCCGCATATATACATGGTATTGGAG
AGCGTGGCACCTCAAAAACAGATGATTTGCTTAAGAAGTGGTATATATAGATGATGCTATCTTCATTTATTAAGA
CATTTGTATGGAAGGTAAAAACAATGAAGTATAATGCATTGATGGCTTTTTTATTATTTTTTGTGTTTTTTTT
AGATTGTCGCTGATAATACCTTTCTTATATTTGGCATTTATTCCTGCATTTTTTGGTATTATGTATTTAGTGCCT
AATTTTATGATTACTATGGGCAATGGATTGGTATCTATAGATCGTAAAAATTTGTTGCTGTTATCTATATTCATA
ATTATTTTTTTATTTTGTGTTTTCGATTTGTTTCAAAAAAGCCATTTCTTTTCAAAGTTATTTTACC GTTAGA
TTATTTATGTTGTTTTTATTTTCATTTGTTCTGCGTATTATTTAGTAAATAGATTCATAAAGGGTGACTTGAAA
TTAATGGAGCGAATATTAGTGTATTCTCTCTGGGTTCAAATAGTTATTTTTTTGGTATGTATATAAGTCCAGAG
TTAAAAAGATTGTTATATACTTTCTTTGGTATGTCTGACTCTGTTAATCTTTGGGAACAAAATGCTAAAGTAAGA
GGATTTGGGTTGTGCGGTGAAATAAATTTTCATGACACCATTTTGTGATGATCTATATGTCATTTTTTATGATGAAA
AGGCGTTATGCTTTAATTACTTTAATTTGTCTGACTCAAATCGTAAATTTCAACATGGCTGTGATTGCAGCCATT
ATTGGTATCGGTTGCTCTAGACTTAATATTAATATAAAAAATGCAACAGTATTGATTTTGGGAGTTTTAGTTTAT
AGCTTAGGAGCGGTGTTCTTTCTCGATTTTATGATGAGTTCGTTTCTGGAGATGGCACAAGAACTCTGGATATC
TTATTACAGCAACATGTGTTTGTGTTAGGTAATTTAGATTTTTTAAATATTATATTTGGATTACAGCAAAAACATA
TCTTCATCAATCCCGATATTAACAAAGTTCGGATATGGGCTGGGTTATACTGTTTAAATTACGGTGGGTTAACA
TTTTATTACTCTTTTTATTTTTAATCTTTACTATTTCTATTGCGACATTTGGAATGACATATCAAGCAATTATA

TGGATGTTAATTGGGATAATTTTCAATACCAAAGGTTTAGTTTTAGGATCTAACGGCTATTTCTTTCTATCTTTT
ATATATATGTTTTTGAATAGAGTAACACTTAGTGGACAGAGTTCAATTACTAATAAGTTAGGTCAAGTAAGTAAA
TAGCTTCCAGAGTATATTTGTCAATGATTTGAGGTTTCGGTTATATGTTTTTTCATCTAAAACACTGTTAATTACTG
GTGGTACTGGCTCTTTTCGGGAATGCTGTATTAATAGATTTCTTGATACAGATATTCAGAAAATCCGTATATTTA
GTCGTGATGAAAAAACAAGATGATATGCGGAAAAATACAATAATCAAAAATTAAGTTCTATATTTGGTGATG
TCAGAGATTACCGTAGTATTTTGAATGCGACTCGCGGTTGATTTTTATATATCATGCAGCGGCCTTAAGCAAG
TTCCATCATGTGAATTTTCATCCTATGGAAGCCGTTAAAACATAATCCTTGGTACGGAAAATGTTCTTGAAGCAG
CTATAGCGAATGAAGTGAAGAGGGTTGTATGCCTAAGTACTGATAAAGCTGTATACCCGATTAACGCAATGGGTA
TTTTCAAAAGCTATGATGGAAGGTCATGGTCGCGAAATCCCCTAATGTTGATCGCAATAAAACAGTAATATGTG
GTACCCGTTATGGGAATGTTATGGCATCTCGCGGTTTCAGTTATCCATTATTTGTTGATCTTATTAGAGCGGGCA
AGCCACTCACATAACTGATCCTAATATGACCCGCTTTATGATGACTCTTGAGGATGCGGTAGATTTAGTTCTTT
ATGCGTTTTGAACATGGTAATAATGGTGATATCTTTGTGCAAAAAGCACCTGCAGCAACTATTGACACATTAGCTA
TTGCTTTAAAGGAATTAATAAATGTTCTGACCATCCGGTAAATGTCAATGGAACGCGTCATGGCGAGAAAATAT
ATGAAGCTCTACTTAGTCTGAGGAAATGATCGCTGCTATAGATATGGGCGATTATTACCGTGTCCCGCCAGATC
TTCTGTGACCTTAATTTATGGCAAATATGTTGAGCAAGGTGATAGCCGAATATCTGAAATAGAAGATTATAACTCTC
ATAATACTCAACGGTTAGATGTTGAAGGCATGAAAGAGCTCTTGCTAAAATTAGCCTTTATTTCGAGCAATTCGTG
CTGGTGAAAAATATAATCTGGATTGATGATGAAAATATTAGTTACTGGTGCAAATGGTTTTATTGGTCGTAAT
TTATGTTTGGAGCTTGGGAACTTGGTTATAAAGATCTTATTAGAATTGATCGAGAATCAACGAAGCAAGATCTT
GAACAAGGCTTACAGGATGCCGATTTTATTTATCACTTAGCTGGTATCAATAGACCTAAGACTGATGATGAGTTT
ATTTCTGGAACAGTGATTTAACAAAGCATATAGTTGAGTATCTCCTTTCTATTGGTAAGAATACACCAATTATG
CTAAGTTCTTCGATACAAGCTGAACCTAATAATGCTTATGGGGTTAGCAAAGCTGTAGCTGAAAGCTATGTCGAA
AAATATGCTGCTGCTAGTGGTTCTTCGTATTATATTTTTCAGATATCCAAACGTTTTTGGTAAATGGTGTAAGCCA
AACTATAATCTTTTTATAGCAACTTTTTGCTACAATATTTCCAATGATATTGAGATTACTATCAATGATGCAGCA
GCGCCAGTCAATCTGGTCTATATTGATGATGTTTGTACTGATGCTATAGCTCTTCTCTCTGGGACGGTTGAAAGT
GGATATAAAGTTGTTGCACCAATTTATTTCAACAACAGTTGGTGAAGTTGCAGAATTAATTTATAGCTTCAAAAAT
AGCCGTTCCACCCTGATCACAGAGGCTGTCCGGGCGGGATTTACCCGTCATTGTATTCTACATGGCTGAGTTAT
TTACCAGCAGAGAAGTTTTCGTACAAGGTACCTTTTTATGGGGATGCCGCGGAGTCTTTTGTGAGATGTTGAAA
ACGCCCTCAGCGGGCAGTTTTTCATTTTTTACTGCTCACCCCTGGTATTACGCGTGGCGGACATTACCATCACAGT
AAAAATGAGAAGTTTTTGGTCATTTCGAGGTCAGGCATGCTTTAAATTTGAACATGTGATTACCGGTGAGCGATAT
GAACTGAAAGTTTCATCGGGTGAGTTTAAAGATTGTTGAAACAGTTCTGGTTGGACACATGACATTACAAATATT
GGAATGATGAATTAATAGTCATGCTCTGGGCAAATGAAATTTTCAACCGTGATGAGCCCGATACTATTGCGAGA
CCTCTATAATGAAAAAATTAAGTTATGTCTGTTGTTGGAACCCGTCCTGAGATTATCCGTTTGTGCGAGGGTTC
TTGCTAAGTTTGTATGAATACTGCGAGCATATATTGTCCATACTGGTCAAATTTATGATTACGAATTAATGAAG
TGTTCTTCAATGACTTGGGTGTTTCGAAAACCTGATTATTTTTTAAATGCAGCGGGTAAAAATGCGGCGGAAACCA
TTGGTCAGGTTATTATTAAGGTAGATGAAGTATTAGAAATCGAAAACCTGAAGCAATACTGGTATTGGGCGATA
CGAATTCATGTATTTCTGCCATTCGGCCAAACGCGTAAAGTGCCTATATTTTCATATGGAAGCAGGTAACCGTT
GTTTCGATCAACGCGTGCCTGAAGAAACCAACAGACGTATTGTTGACCATACGGCTGATATCAATATGACCTACA
GTGATATTGCTCGTGAATATCTCTGGCTGAAGGTATCCAGCTGATCGGATCATAAAAACCTGGTAGCCCTATGT
TTGAGGTTCTTTCATATTATATGCCCAAATGATGGTTTCAGATGTGCTATCGCGTTTTGAATCTACAGTCTGGTG
AGTTTTTTTGTAGTAAGTGCAGCATCGTGAAGAGAATGTTGATTCTCCAAAACAGCTCGTAAAGCTTGCAGCAATTC

TAAATACTGTTGCTGAAAAATATAATCTTCCAGTTATTGTCTCCACACACCCAAGGACACGTAACCGAATCCGTG
AGCAAGGAATTGAATTTTCATTCAAATATAAATCTACTGAAACCATTGGGTTTCCATGATTATAACCACTTGCAGA
AGAACTCACGAGCTGTGCTTTT CAGATAGCGGTACTATCACTGAAGAGTCATCCATCATGAATTTCCAGCGGTAA
ACATCCGGGAAGCGCATGAGCGTCCGGAAGGCTTTGAGGAAGCATCCGTCATGATGGTGGGGTTAGAGTGTGAAC
GCGTATTACAAGCGCTGGATATTCTGGCAACACAACCCGAGGTGAAGTCCGCTTTTACGTGAGGTTAGTGATT
ACAGCATGCCAAATGTGTCCGATAAAGTTGTCAGAATTTGTTCACTCTTACACAGATTATGTTAAGAGAGTCTGCT
GGAAAGAATATTGATGAAACTTGCTTTAATCATAGATGATTACCTGCCCAACAGTACTCGTGTGGTGCAAAAAT
GTTTCATGAACTTGCTCAAGAATTTATCCAGCGTGGGCACGATGTTACGGTAATTACTCCTGGTACGGGCATGCA
AGAAGAGATTTCTTTTGATACCTTTT CAGGGGTAAAAACATGGCGTTTTTAAAAGCGGGCCGCTCAAGGATGTAAG
TAAAATTCAGCGAGCGGTCAATGAAACGCTTTTGTCTTATCGGGCGTGGAAAGCCATCAAAAATGGGTAAAAAA
AGAGACCTTTGAGGGGGTGATTTATTATTACCTTCCATATTCGTTGGGGCCTTTAGTTAAAAAATTAAGCTCG
TTGCCAATGTCTGCTTATCTTATTTTAAAGAGATATGTTTCCACAATGGGTAATTGATGCAGGAATGCTTAATGC
TGTTCCCCAATAGAACGCTACTTTCTGCTTTTTTGAAAAAATATCTTATCGTCAGGCAAAATCGTATTGGACTTAT
GTCTGATAAGAATCTTGATGTTTTTTCGGAAGATAATAAAGGCTATCCGTGCGAAGTTTTGCGTAATTTGGGCATC
CCTAACACCAACGATCATACCCAAGGATTATATACCACTACGTAAGCGACTTGGCCTAGAGGATAAAACCATTTT
CTTCTATGGTGGAAACATAGGTCATGCACAGGACATGACAACTTGATGCGACTTGTGAGAAACATGGCAGCATA
TCCTCAAGCTCATTTCTATTTATTGGCCAGGGGATGAAGTTGAATTAATTAATTCATTAGCATCTGAGTGGGC
ATTGACGAATTTACCTATTTGCCCTCGGTTAACCAAGATGAATTTAAGTTCAATTTTGTCCGAAATGGATATCGG
CTTGTTTTCTCTTTCCGCTAGACACTCTTCCATAATTTTCTGGTAAGTTATTAGGCTATATGGTTCAGTCGCT
ACCTATTTTAGGTAGCGTAAATGCCGAAATGATTTGCTCGACATTGTCAATCAAAATAATGCGGGATTAATCCA
TGTC AATGGT GAGGACGATAAATATGTCAATCTGCGCTATTAATGTTGCATGATATTGATGTGCCCGGCAACT
TGGTTCGGGGCGAATATATTGTTGAAAGAACAATTTCTCCGTTGAGTCTGCGGCACAGACGATAGAAATGAGGTT
GGAGGCATGCAATGCGATTAATTGATAATGACCAACTCGACGAATTATATGATCAAGCCGGGCAATCGGAACGTT
TACGTTCCACCTTATGATGCACGGCTCGCATCAAGAAAAGGTACAGCGTTTACTTATTGCATTAGTAAAGGGCA
GCTATGTTGAACCGCATTATCACGAACTTCTCATCAGTGGGAAATGTTCAATGTTATGGAGGGGCAACTTCAGG
TTTTGTTGTATGGTAGAAATGGT GAGGTTATAAAGCAATTTATAGCAGGAGATAATACTGGAATGAGCATTGTGG
AGTTTTCTCCGGGCGATATACACAGTGTGCAATGCCTATCTCCGCGTGTCTTATGGTGAAGTTAAGGAGGGGC
CATTTGACCCCTCTTTTGCAAAATCGTTCGTGTGAGCGGCCGCGAGCTCGTCTGACTCGAGGATCCGTGTAGGCTG
GAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGG
ATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACA
TTCCAGGCCGCGAGCATT CAGCGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTA
GTCCGATGAGCAGTATGGGACGCAACCTTGGCGCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAAC
CGTTCGCGTGAGAAGACGGAAGAAGTATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAACTGGTTCCTTACTATACGGTGAAA
GAGTTTGTGCAATCTCTGAAACGCCTCGTTCGATCCTGTTAATGGTGAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCT
ATTGATTCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATTGATGGTGGTAACACCTTCTTCCAGGACACT
ATTCGTCGTAATCGT GAGCTTTCAGCAGAGGGCTTTAACTTCATCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGG
GCGCTGAAAGGTCCTTCTATTTATGCCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATGGTAGCACCGATCCTGACCAA
ATCGCCCGGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGCCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAG
ATGGTTCAACCGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATCTCTGCTTAAAGGTGGCCTG
AACCTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGAATAACGGTGAAGTGAAGCAGTTACCTGATCGAC

ATCACCAAAGATATCTTCACCAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCT
 AACAAAGGTACCGGTAATGGACCAGCCAGAGCGCGTGGATCTCGGCGAACCGCTGTGCTGATTACCGAGTCT
 GTGTTTGCACGTTATATCTCTCTCTGAAAGATCAGCGTGTTGCCGCATCTAAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCA
 CAGCCAGCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTCTGCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTAC
 GCCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGCCTGCTGAAGAGTACAACCTGGGATCTGAACTACGGCGAAATCGCGAAG
 ATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCTGCAGAAAATCACCGATGCTTATGCCGAAAATCCACAG
 ATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAATGCGCGATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGATGTCGTT
 GCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCCGGTCCGACCTTCTCCGAGCGGTTGCCATTACGACAGCTACCGTGCT
 GCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTACTATTTGGTGCGCATACTTATAAGCGTATTGATAAA
 GAAGGTGTGTCCATACCGAATGGCTGGATTA

**SEQ ID NO: 16 (пример нуклеотидной последовательности локуса *rfb* O16 – штамм-
 продуцент O16-EPA stLMTB11739)**

ATGACGAATTTAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCGATACCC
 AAAGAGATGTACCAATCGTGACAAGCCAATGATTCAGTACATGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAA
 GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTGCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA
 CTCCTTGAGCAGCGCTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG
 AACGTGCGTCAAGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCA
 TTTGTGCTGTTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATG
 ATTGACAGTTTCAACGAAACGGGCCGACCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCC
 GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAAGCCGATGTTGAATTTATCGAAAAACCGGAT
 CAGCCGACAGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGTTCGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGAACTG
 GAACGTAATCAGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAACAATCC
 GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG
 TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCGTAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA
 TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTAAAAATTCGACGAAAAAGTAAATTTGTTGCCAA
 TCTTCTGCCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA
 GGATTTTCTTGTTCAGAGCGGATTTGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA
 ACGCTCGTACATCATAGGCATGCATGCAGTGTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGTAGCGTGCATTAATAC
 CTCTATTAATCAAACCTGAGAGCCGCTTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGTGAAAATA
 CTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTGGTTCAGCTGTAGTTCGTACATATAAATAATACGCAGGATAGTGT
 GTTAATGTGATAAATTAACGTACGCCGAAACCGGGAATCACTTGCTGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATGTT
 TTTGAACATGGGATATTTGGGATGCACCTGCAATGGCACGGATTTTGTCTCAGCATCAGCCGGATGCAGTGATG
 CACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTTGGT
 ACTTATGCTCTTTTGGAAAGCCGCTCGCAATTAAGTGTCTGCTCTTGATAGCGACAAGAAAAATAGCTTCCGTTTT
 CATCATATTTCTACTGACGAAGTCTATGGTGAATTTGCCTCATCCAGATGAAGTAAATAATACAGAAGAATTACCC
 TTATTTACTGAGACGACAGCTTACCGCCCAAGCAGCCCTTATTCGCATCCAAAGCATCCAGCGATCATTAGTC
 CGCGCGTGAAACGTACATATGGTTTACCGACAATTGTGACTAATGCTCGAACAACTATGGTCCCTTATCATTTT
 CCGGAAAAGCTTATTCCTACTGTTTATTTAATGCACTGGAAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAAAGGAGAT
 CAGATCCGCGACTGGTGTATGTTGAAGATCATGCGCTGCGTTATATACCGTCTAACCGAAGGTAAGCGGGT
 GAAACTTATAACATTTGGTGGGCACAACGAAAAGAAAACATCGATGTAGTGCTCACTATTTGTGATTTGCTGGAT

GAGATTGTACCGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAAATCACTTATGTTGCTGATCGTCCGGGACACGATCGCCGC
TATGCTATTGATGCTGAGAAGATTGGTCGCGCATTGGGATGGAAACCACAGGAAACGTTTGAGAGCGGGATTTCGT
AAAACGGTGGAAATGGTACCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAATGTGAAAAGTGGTGCCTATCAATCGTGGATT
GAACAGAACTATGAGGGCCGCCAGTAATGAATATCCTCCTTTTTGGCAAAACAGGGCAGGTAGGTTGGAACTAC
AGCGTGCTCTGGCACCTTTGGGTAATTTGATTGCTTTTTGATGTTCACTCTACTGATTATTTGCGGTGATTTTAGTA
ATCCTGAAGGTGTAGCTGAAACCGTAAGAAGCATTTCGGCCGGATATTATTGTCAATGCAGCCGCTCACACCGCAG
TAGACAAAGCAGAATCAGAACCGGAGTTGCACAATTAATTAACGCAACAAGTGTGAAAGCGATTGCGAAAGCAG
CAAATGAAGTTGGAGCCTGGGTTATCCATTACTCGACTGATTACGTCTTCCCTGGAAATGGCGATATGCCATGGC
TGGAGACGGATGCAACCGCACCTAAATGTTTACGGTGAACCAAGTTAGCCGGAGAAAAGCGTTACAGGAAT
ATTGCGCGAAGCATCTTATTTCCGGACCAGCTGGGTCTATGCAGGAAAAGGAAATAACTTCGCCAAAACGATGT
TACGTCTGGCAAAAGAGCGTGAAGAATTAGCGGTTATTAACGATCAGTTTGGTGCGCCAACAGGTGCTGAACTGC
TGGCTGATTGTACAGCACATGCCATTCGTGTCGACTGAATAAACCGGATGTCGCGAGGCTTGTACCATTTGGTAG
CCAGTGGTACCACAACCTGGTACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGCATTCGCCCTTG
CACTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAACAACAGCCTATCCTACACCAGCTCGTCTCCACATAACTCTCGCCTTA
ATACAGAAAAATTTACAGCAGAACTTTGCGCTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTTGGCGTGAACGAATGCTCAATG
AATTATTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTGATGGTGGAGCAAGATGAATTAAGGA
ATGATGAAATGAAATGCGTAAAGGTATTTTACGGGGTGGTTCTGGTACACGTCTTTATCCTGTGACTATGG
CTGTACAGTAAACAGCTATTACCTATTTATGATAAACCGATGATCTATTACCCGCTCTCTACACTGATGTTGGCGG
GTATTCGCGATATTTGATTATCAGTACACCTCAGGATACTCCTCGTTTTCAACAATTGCTGGGTGACGGTAGCC
AGTGGGGCCTGAATCTTCAGTACAAAGTGAACCTAGCCAGATGGCCTCGCGCAGGCATTTATCATCGGTGAAG
AGTTTTATTGGTGGTATGATTGTGCTTTGGTTCTTGGTGATAATATCTTTTACGGTCACGATCTGCCGAAGCTAA
TGGAGGCCGCTGTTAACAAGAAAGTGGTGAACGGTATTTGCCTATCACGTTAATGATCCAGAACGCTATGGTG
TCGTTGAGTTTGATAAAAACGGTACGGCAATCAGTCTGGAAGAAAACCGTTAGAACCAAAGAGTAATTACGCCG
TTACAGGTCTGACTTTTATGATAACGACGTGGTTCAGATGGCGAAAAACTTGAAGCCGTCTGCACGTGGTGAGT
TAGAAATTACAGATATTAACCGTATTTATCTTGTAGCAGGGACGTCTGTCTGTCGCGATGATGGGGCGTGGCTACG
CGTGGCTGGACACGGGGACTCATCAGAGTCTGATAGAAGCAAGTAATTTTATGCGACAATTGAAGAGCGCCAGG
GATTGAAGGTTTCCTGTCTGAAGAGATTGCATTTTCGTAAAGGTTTTATTGATGTTGAGCAAGTAAGAAAATTAG
CTGTACCATAATAAGAATAATTTATGGGCAGTATCTTTATAAAATGACGAAGGATTCAAATTAATGAATGTGAT
TAGAACTGAAATTTGAAGATGTGCTAATCTGGAGCCAAGAGTATTTGGTGATGATAGAGGTTTTCTTTTATGAGAG
CTTTAATCAATCAGCATTTGAACATATCTAGGCTATCCGGTCAGCTTTGTTCAAGACAATCACTCACGTTTCATC
AAAAATGTACTCAGAGGCCCTTCACTTTCAACGCGGCGAGTACGCACAAGATAAACTTGTACGCTGCACCTCATGG
AGCAGTTTTTGTGTTGCTGTTGATATTCGACCCAATTCGGTATCCTTTGGTAAATGGGTTGGTGTCTGCTTTC
AGCTGATAATAAGCAGCAGTTGTGGATACCAAAGGGTTTGTCTCATGGCTTTTTGGTTCTGTCTGATATCGCTGA
ATTTCAATATAAACTACAACTATTTATCATCCTGAAAGCGATTGTGGAATATGTTGGAATGATGAACGCATTGC
AATTGATTGGCCCCAACATCAGGGTTAATCCTTTTCGCCAAAAGATGAAAGGCTCTTTACGTTAGATGAGCTTAT
CAGATTAATAATTAATTCATGAATACGAATAAATATCTTTAAGAAGAAACGTTATATATCTGGCTGTCTGTTCAA
GGTAGCAATTAATCTTTTACCATTGCTTACATTTCCATATCTTGTGAAGAACACTTGGTCCCTGAAAATTTCCGGTATA
TTCCGTTTTTGGCAAGCGACTATGCTATATATGATAATGTTTGTGTAATATGGTTTCAATCTCACAGCAACTCAG
AGTATTTGCCAAAGCAGCAGATAGTAAAGATAAAGTAACGTCTATTTTTTGGGCGGTGATATTTTCAAAAATAGTT
CTTATCGTCATTACATGATTTTCTTAACGTCGATGACCTTGCTTGTTCCTGAATATAACAAGCATGCCGTAATT

ATATGGTCGTTTGTTCCTGCATTAGTCGGGAATTTAATCTACCCTATCTGGCTGTTTCAGGGAAAAGAAAAATG
AAATGGCTGACTTTAAGTAGTATTTTATCCCGCTTGGCTATTATCCCTCTAACATTTATTTTTGTGAACACAAAG
TCAGATATAGCAATTGCCGGTTTTATTTCAGTCAAGTGCAAATCTGGTTGCTGGAATTATTGCACTAGCTATCGTT
GTTTCATGAAGGTTGGATTGGTAAAGTTACGCTATCATTACATAATGTGCGTCGATCTTTAGCAGACGGTTTTTCAT
GTTTTTATTTCCACATCTGCTATTAGTTTATATTCTACGGGAATAGTTATTATCCTGGGATTTATATCTGGACCA
ACGTCCGTAGGAATTTAATGCGGCCAATACTATAAGAAACGCGCTTCAAGGGCTATTAAATCCTATCACCCAA
GCAATATACCCAAGAATATCAAGTACGCTTGTCTTAAATCGTGTGAAGGGTGTGATTTTAATTAATAAAATCATTG
ACCTGCTTGAGTTTGATTGGTGGTGCTTTTTCATTAATTTCTGCTCTTGGGTGCATCTATACTAGTAAAAATAAGT
ATAGGGCCGGGATATGATAATGCAGTATTGTGCTAATGATTATATCGCCTCTGCCTTTTCTTATTTCATTAAGT
AATGTCTATGGCATTCAAGTTATGCTGACCCATAATATAAGAAAGAATTTCAGTAAGATTTTAAATCGCTGCGGGT
TTGTTGAGTTTGTGTTGATTTTTCCGCTAACAACTTTTTTAAAGAGATTGGTGCAGCAATAACATTGCTTGCA
ACAGAGTGCTTAGTTACGTCACTCATGCTGATGTTTCGTAAGAAATAATAAATTAAGTTGCTGAGGATTTTAT
GTACGATTATATCATTGTTGGTTCTGGTTTGTGGTGGCCGTTTGTGCGAATGAGTAAAAAAGCTAAACAAAA
AGTTTTAGTGATTGAGAAAAGAAATCATATCGGTGGAAATGCGTACACAGAGGACTGTGAGGGTATCCAGATTCA
TAAATATGGTGACATATTTTTCATACCAATGATAAATATATATGGGATTACGTTAATGATTTAGTAGAATTTAA
TCGTTTTACTAATTTCCACTGGCGATTTATAAAGACAAATTTTCAACCTTCTTTTTAATATGAATACTTTCCA
CCAAATGTGGGAGTTAAAGATCCTCAAGAAGCTCAAATATCATTAAATGCTCAGAAAAAAGTATGGTGACAA
GGTACCTGAAAATTTGGAGGAGCAGGCGATTTTCATTAGTTGGGGAGGACTTATACCAAGCATTGATAAAGGGTTA
TACGGAGAAGCAGTGGGGAAGAGTGCAAAAGAATTGCCTGCATTTATTTAAGCGAATCCCAGTGAGATTTAC
GTTTGATAACAATTTATTTTTCCGATCGCTATCAAGGTATTCGGGTGGGAGGCTACACTAAGCTTATTGAAAAAT
GCTTGAAGGTGTGGACGTAATAATTAGGCATTGATTTTTTGAAGACAAAGATTCTCTAGCGAGTAAAGCCCATAG
AATCATCTACACTGGACCCATTGATCAGTACTTCGACTATAGGTTTGGAGCGTTAGAATATCGCTCTTTAAAAT
TGAGACGGAACGCCATGAATTTCCAACTTCCAAGGAATGCAGTAATAAATTTCACTGATGCTAATGTACCATA
TACCAGAATAATTGAGCATAAACATTTTGAATGTTGAGACAAAGCATAACGGTTGTTACAAAAGAATATCCATT
AGAGTGGAAAGTTGGCGACGAACCTACTATCCAGTTAATGATAATAAAAACATGGAGCTTTTTAAGAATATAG
AGAGTTAGCTAGCAGAGAAGACAAGGTTATATTTGGCGGGCGTTTGGCCGAGTATAAATATTATGATATGCATCA
AGTGATATCTGCCGCTCTTTATCAAGTGAAAAATATAATGAGTACGGATTAATGATCTATCTTGAATTAGTGTC
TTTCTCATTACAGCATTTATCTGTTTATATCTTAAGAAGGATATATTTTATCCAGCCGTATGCGTTAATATCATC
TTCGCACTGGTCTTATTTGGGATATGAAATAACGTGAGATATATATGCTTTTCAGTTAAATGACGCTACGTTGATT
TTTCTACTTTGCAATGTTTTGACATTTACCCTGTGATGTTTATTGACGGAAGTGATTTAGATCTAAATATCAGA
AAAGTCAATAATGCTATTTATAGCATAACCATCGAAGAAAGTGATAATGTAGGCTTGTAGTTATTTCTTTTTCG
ATGATATATATATGCATGAGGTTAAGTAACCTACCAGTTCGGGACTAGCTTACTTAGCTATATGAATTTGATAAGA
GATGCTGATGTTGAAGACACATCAAGAAATTTCTCAGCATAACATGCAGCCAATCATTTCACTACTTTTGCTTTA
TTTATTTGGTCTAAAAATTTACTAATAACAAAGGTAAGTAAAAATTTACTTTACTTGTTTTTATTGTATTCAFC
TTTGCAATTTACTGAATACTGGTAAGCAAATTTGCTTTTATGGTTATCATCTCTTATGCATTATCGTAGGTGTT
AATAGAGTAAACATTATGTTTATCTTATTACAGCTGATGGTGTCTATTCTCCTTGTATATGCTCTTTTACGT
GGACTGCCTGGGGGATGGCATAATTATCTATCCATGATTTGGTTCAGCCCTATAATCGCGTTTCAGGAGTTTTAT
TTTCAGCAAGTATCTAACTCTGCCAGTTCATGCTTTTTGGTTTTTTGAAAGGCTGATGGGGCTATTAAACAGGT
GGAGTCTATGTCGTTGCATAAAGAATTTGTGTTGGTGGGTTTCCCAACAAATGTTTATACTGCTTTTTCGGAT
TATGTTTATATTTCCGCGGAGCTAAGCTATTTGATGATGGTTATTTCATGGCTGATTTTCAGGTGTTTTATGGAGA

TTGTCTCGAAATTACATATCTGTGAAAATATTTATTCATATTTATTTATACCTTTTCTTCATTTTTATCAT
GAAAGCTTCATGACTAATATTAGCAGTTGGATACAAATAACTCTTTGTATCATAGTATTCTCTCAATTTCTTAAG
GCCCAGAAAATAAAGTGAAAATGTATTTTTGAATGATTTAAATTTCTCTAGACGCGATGCTGGATTTAAAGCAA
GAAAAGATGCACTGGACATTGCTTCAGATTATGAAAACATTTCTGTTGTTAACATTCCTCTATGGGGTGGAGTAG
TCCAGAGAATTATTAGTTCTGTTAAGCTTAGTACATTTCTCTGCGGTCTTGAAAATAAAGATGTTTTAATTTTCA
ATTTCCCGATGGCCAAACCATTTTGGCATATATTGTCATTTCTTACCAGCCTTCTAAAATTTAGAATAGTACCTC
TGATTCATGATATTGATGAATTAAGAGGAGGAGGGGTAGTGATTCTGTGCGGCTTGCTACCTGTGATATGGTCA
TAAGTCACAATCCACAATGACAAAAGTACCTTAGTAAATATATGTCTCAGGATAAAATCAAAGACATAAAAATAT
TTGATTACCTCGTCTCATCTGATGTGGAGCATCGAGATGTTACGGATAAGCAACGAGGGGTATATATGCTGGCA
ACCTTTCTAGGCATAAATGTTCTTTTATATATACTGAAGGATGCGATTTTACTCTCTTTGGTGTCAACTATGAAA
ATAAAGATAATCCTAAATATCTTGAAGTTTTGATGCTCAATCTCCGAAAAGATTAACCTCCAGGCATGCAAT
TTGGACTCATTGGGATGGAGATTCTGTCGAAACCTGTAGTGGTGCCTTTGGCGACTATTTAAAGTTTAAATAACC
CTCATAAGACATCTCTTTATCTTTCAATGGAACCTCCAGTATTTATATGGGATAAAGCCGCCCTTGGCGGATTTCA
TTGTAGATAATAGAATAGGATATGCACTGGGATCAATCAAAGAAAATGCAAGAGATTGTTGACTCCATGACAATAG
AAACTTATAAGCAAATTAGTGAGAATACAAAATTTATTTCTCAGAAAATTCGAACAGGAAGTTACTTCAGGGATG
TTCTTGAGAGGTGATCGATGATCTTAAACCTCGCTAAACGATATGGTCTCTGTGGTTTTATTCCGGCTTGTTAGA
GATGCTTATTGACTCGTGTATTTTACCAGGACTGTAGAATTTATCGATTTCCCTGCTATATTGCAATGATGGT
AGCATTAATTTTGGTGAATAATTTACAAAGTGGAGTCCGTCTCAGGCTGGATGCATTTGGACGTGGCGTATTTTT
TTTTCCGATAATGTGCAAGTTAACGACTATGTTTATATCGCCTCAATTGAGAGCGTTACGATAGGTCCGGATACG
CTTATTGCAAGTAAAGTATTTATTACCGATCATAATCACGGTTCCTTTAAGCACTCTGATCCAATGAGTTCGCCA
AATATACCTCCAGACATGCGCACGTTGGAATCTTCACTGTTGTAATTTGGCCAGAGGGTTGGTTGGGTGAGAAT
GTGACGGTTTTGCCTGGAACAATTTATGGTAATGGAGTTCGTAGTCCGCGCCAATTTCTGTTGTTAGAGGTTCTAT
CCCGAAAATACTGTCAATGCGGGAGTACCAGCAAAAATCATAAAGAAAATACAATCATGAGACCAAATTTATGGGAA
AAAGCATAGTCGTTGTTTCTGCGGTCAATTTTACCAGTGGCGGTCCATTTACCATTTTAAAAAATTTTTGGCAG
CAACTAATAATAAAGAAAATGTCAGTTTTATCGCATTAGTCCATTCTGCTAAAGAGTTAAAAGAAAAGTTATCCAT
GGGTTAAATTCATTGAGTTTCTGAGGTTAAAGGGTTCGTGGCTAAAACGTTTGCACCTTTGAATATGTAGTTTGT
AAAACTTTCAAAGAGCTGAATGCTACGCATTGGATTTGTCTGCATGATATTACGGCCAATGTCGTCACTAAAA
AAAGATATGTGATTTGTCATAACCTTGCCCTTTTTATAAAGGAATTTTATTTCCGTGAAAATCTTATGGAGCCTA
GCTTTTTCTTATTTAAAATGCTATACGGGCTGATATATAAAAATAAACATTTAAAAAAAATACTGCAGTGTTTGTT
ACAATTTCTGGATGAAAGAAAATTTATCAAGAAATTTCTATAAATAACATCATTGTCAGTCCGCCAGAAATTA
AATTATCTGATAAAGCCAACTTACTGATGATGATTCTCAATTTAAGAATAACCCTTCTGAGTTGACAATATTTT
ACCCTGCTGTTCCACGAGTATTTAAAATTTACGAGCTTATTATTAGTGCAGCAAGGAAATGAAAGAACAATCCA
ATATTAATTTCTGCTTACTATCAGTGGTACAGAAAATGCGTATGCAAAATATATTATCAGTCTTGCAGAAGGAC
TGGATAATGTTTCAATTTCTCGGGTACTTGGATAAAGAAAAAATCGATCATTGTTATAATATTTTACGATATAGTT
GTTTTCCCTTAGGTTAGAAACATGGGGATTGCCGTTGTCTGAGGCTAAAGAGCGAGGTAAGTGGGTATTAGCAT
CAGATTTCCATTTACTAGAGAACTCTTGGTAGTTATGAAAAGAAAGCTTTTTTTGATTCTAATAACGATGACA
TGTTAGTTAACTTATTATTGACTTCAAAAAGGTAACCTCAAAAAGATATCTCTGATGCAAAATTTTCAATTTATC
GTAATGAAAATGTATTAGTTGGGTTTGTGAACTAGTTAATTTTATTACTGAAGAACATTGAAATGGTATATATA
ATAATCGTTTTCCACGGACATGAAGACTACATCAAAAATTTACTCGAAAATCTTAATGCTGACGATGAGCACTAC
AAGATTATCGTACGCGACAACAAGACTCTCTATTATTGAAACAAATATGCCAGCATTATGCAGGCCTGGACTAT

ATTAGTGGAGGTGTATACGGCTTTGGTCATAATAATAATATTGCGGTGGCGTATGTAAAGGAAAAATATAGACCC
 GCAGATGATGATTACATTTTTGTTTTGAATCCCGATATCATCATGAAGCATGATGATTTGCTGACATATATAAA
 TATGTCGAAAGTAAGCGTTATGCTTTTAGTACATTATGCCTGTTCCGAGATGAAGCGAAATCTTTACATGATTAT
 TCCGTAAGAAAATTTCTGTGCTTTCTGATTTATTGTGTCAATTATGTAGGGATTAATAAAAACAAAAATCCT
 AAAGAAAGTATCTATCTGATACGGTTGTTGATTGGTGCAGGATCATTTATGCTGGTACGTTTTTCAGATTTT
 GTGCGTGTAATGGCTTCGATCAAGGTTACTTTATGTAAGTATTTGACCTGTGCTTGAGGCTTAGCCTG
 GCTGGTGTGACTTCAATATGTTCCCGCTTTTCATGCGATACATTATGCTCATCATGACAATCGAAGTTTTTTT
 TCAAAAGCCTTCAGATGGCACTTAAAAAGTACTTTTAGATATTTAGCCAGAAAACGTATTTTATCAATCGCAAC
 TTTGATCGAATTTTCATCAGTTTTTACCCTGTAAGAGCTCGGTACCCGGGCTAGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
 GAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACCTCGGAATAGGAACCTAAGGAGGATATTCATATCCGTCGACGGCG
 GCCGCCCTGCAGGCATGCAAGCTTGATCCATATGGATCGCTAGCTTAATTAATAAAGCCGTAAGCATATAAGCA
 TGGATAAGCTATTTACTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTCAGGCCGCGAGCATTGAGCG
 CGGTGATCACACCTGCAGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGATGGGACG
 CAACCTTGGCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCTCGTGAAGACGGGAAGA
 AGTGATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAACTGGTTCCTTACTATACGGTGAAGAGTTTGTGCAATCTCTGGAAC
 GCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCTCAAACCATATCT
 CGATAAAGGAGACATCATCATGATGGTGGTAAACACCTTCTTCCAGGACACTATTCGTGTAATCGTGAGCTTTC
 AGCAGAGGGCTTTAATTTCATCGGTACGGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTAT
 GCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTGGTAGCACCGATCCTGACCAAAATCGCCGCGTAGCTGAAGACGG
 TGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGGCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTGAATA
 CGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCTGAACCTCACCAACGAAGAACTGGC
 GCAGACCTTTACCGAGTGAATAACGGTGAAGTGAAGTACCTGATCGACATCACCAAGATATCTTACCAA
 AAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACGGGTAATGGAC
 CAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCCAACCGCTGTGCTGATTACCGAGTCTGTGTTGACGTTATATCTCTTC
 TCTGAAAGATCAGCGTGTGCCGCATCTAAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCAGCAAGGCTGA
 GTTCATCGAAAAAGTTCGTGCTGCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCG
 TGCTGCGTCTGAAGAGTACAACCTGGGATCTGAACTACGGCGAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCAT
 CCGTGGCAGTTCTGCAAAAAATCACCGATGCTTATGCCGAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCC
 GTACTTCAAGCAAATGCCGATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTATGTCGTTGCTTATGCAGTACAGAACGGTAT
 TCCGGTTCCGACCTTCTCCGAGCGGTTGCCTATACGACAGCTACCGTGTGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGAT
 CCAGGCACAGCGTACTATTTGGTGGCATACTTATAAGCGTATTGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATG
 GCTGGATTAA

SEQ ID NO: 17 (пример нуклеотидной последовательности локуса *rfb* O18A – штамм-продуцент O18A-EPA BVEC-L-00559)

ATGACGAATTTAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCGATACCC
 AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCACTACATTTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAA
 GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAAATCA
 CTCCCTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGCGTACCATTATG
 AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCA
 TTTGTGCTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATG

ATTGCACGTTTCAACGAAACGGGCCGACCCAGGTGCTGGCAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCC
GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGAT
CAGCCGCAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAAGT
GAACGTACTCAGCCTGGTGCATGGGGACGTATTGAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAACAATCC
GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG
TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCGGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA
TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAAATATAACGGCAGTGAAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAA
TCTTCTGCCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA
GGATTTTCTTGTTCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA
ACGCTCGTCACATCATAGGCATGCATGCAGTCTCTGGTAGCTGTAAGGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC
CTCTATTAATCAAAGTGGAGCCGCTTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGTAAAAATA
CTTGTACTGGTGGCGCAGGATTTATTGGTTCAGCTGTAGTTCGTACATTATAAATAATACGCAGGATAGTGT
GTTAATGTCGATAAATTAACGTACGCCGAAACCGGGAATCACTTGCTGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATGTT
TTTGAACATGCGGATATTTGCCGATGCACCTGCAATGGCACGGATTTTTGCTCAGCATCAGCCGGATGCAGTGAT
CACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTTGGT
ACTTATGTCCTTTTGAAGCCGCTCGCAATTACTGGTCTGCTCTTGATAGCGACAAGAAAAATAGCTTCCGTTTT
CATCATATTTCTACTGACGAAGTCTATGGTGAATTTGCCCTCATCCAGATGAAGTAAATAATACAGAAGAATTACCC
TTATTTACTGAGACGACAGCTTACCGGCCAAGCAGCCCTTATTCGCATCCAAAGCATCCAGCGATCATTTAGTC
CGCGCGTGGAAACGTACATATGGTTTACCGACAATTGTGACTAATTGCTCGAACAACATATGGTCTTATCATTTT
CCGGAAGCTTATCCACTGGTTATTCTTAATGCACTGGAAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAAAGGAGAT
CAGATCCGCGACTGGTTGTATGTTGAAGATCATGCGCGTGCCTTATATACCGTCGTAACCGAAGGTAAGCGGGT
GAAACTTATAACATTTGGTGGGCACAACGAAAAGAAAAACATCGATGTAGTGCTCACTATTTGTGATTTGCTGGAT
GAGATTGTACCGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAAATCACTTATGTTGCTGATCGTCCGGGACACGATCGCCGC
TATGCTATTGATGCTGAGAAGATTGGTCGCGCATTTGGGATGGAAACCACAGGAAACGTTTGAAGCGGGATTGCT
AAAACGGTGGAAATGGTACCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAATGTGAAAAGTGGTGCCTATCAATCGTGGATT
GAACAGAACTATGAGGGCCGCCAGTAATGAATATCCTCCTTTTTGGCAAACAGGGCAGGTAGGTTGGAACTAC
AGCGTGCTCTGGCACCTTTGGGTAATTTGATTGCTTTTGTGTTCACTCTACTGATTATTGCGGTGATTTTAGTA
ATCCTGAAGGTGTAGCTGAAACCGTAAGAAGCATTGCGCCGGATATTTATGTCATGCAGCCGCTCACACCGCAG
TAGACAAAGCAGAATCAGAACCGGATTTGCACAATTAATTAACGCAACAAGTGTGAAAGCGATTGCGAAAGCAG
CAAATGAAGTTGGAGCCTGGGTTATCCATTACTGACTGATTACGTCTTCCCTGGAAATGGCGATATGCCATGGC
TGGAGACGGATGCAACCGCACCCTAAATGTTTACGGTGAACCAAGTTAGCCGGAGAAAAAGCGTTACAGGAAT
ATTGCGGAAGCATCTTATTTTCCGGACCAGCTGGGCTATGCAGGAAAAGGAAATAACTTCGCCAAAACGATGT
TACGCTGGCAAAGAGCGTGAAGAATTAGCGGTTATTAACGATCAGTTTGGTGGCCAACAGGTGCTGAACTGC
TGGCTGATTTGACAGCACATGCCATTCGTGTCGCACATGAATAAACCGGATGTCGCAGGCTTTGACCATTTGGTAG
CCAGTGGTACCACAACCTGGTACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGCATTCCCTTG
CACTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAACAACAGCCTATCCTACACCAGCTCGTCTCCACATAACTCTCGCCTTA
ATACAGAAAAATTTACAGCAACTTTGCGCTTGTCTTGCCCTGACTGGCAGGTTGGCGTGAACGAATGCTCAATG
AATTATTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTGATGGTGGAGCAAGATGAATTAAGGA
ATGATGAAATGAAATGCGTAAAGGTATTATTTTAGCGGGTGGTCTGGTACACGTCTTTATCCTGTGACTATGG
CTGTGAGTAAACAGCTATTACCTATTTATGATAACCGATGATCTATTACCGCTCTCTACACTGATGTTGGCGG

GTATTCGCGATATTTTATTATCAGTACACCTCAGGATACTCCTCGTTTTCAACAATTGCTGGGTGACGGTAGCC
AGTGGGGCCTGAATCTTCAGTACAAAGTGCAACCTAGCCCAGATGGCCTCGCGCAGGCATTTATCATCGGTGAAG
AGTTTTATTGGTGGTGATGATTGTGCTTTGGTCTTGGTGATAATATCTTTTACGGTCACGATCTGCCGAAGCTAA
TGGAGGCCGCTGTAAACAAAGAAAGTGGTGCAACGGTATTTGCCTATCACGTTAATGATCCAGAACGCTATGGTG
TCGTTGAGTTTGATAAAAACGGTACGGCAATCAGTCTGGAAGAAAAACCGTTAGAACCAAAGAGTAATTACGCCG
TTACAGGTCTGTACTTTTATGATAACGACGTGGTTCAGATGGCGAAAAACTTGAAGCCGTCTGCACGTGGTGAGT
TAGAAATTACAGATATTAACCGTATTTATCTTGGAGCAGGGACGTCTGTCTGTGCGGATGATGGGGCGTGGCTACG
CGTGGCTGGACACGGGACTCATCAGAGTCTGATAGAAGCAAGTAATTTTATTGCGACAATTGAAGAGCGCCAGG
GATTGAAGGTTTCTGTCTGAAAGAGATTGCATTTTCGTAAGGTTTTATTGATGTTGAGCAAGTAAGAAAATTAG
CTGTACCACCTAATAAAGAATAATTATGGGCAGTATCTTTATAAAATGACGAAGGATTCAAATTAATGAATGTGAT
TAGAACTGAAATTGAAGATGTGCTAATTCTGGAGCCAAAGTATTTGGTGATGATAGAGTTTCTTTTATGAGAG
CTTTAATCAATCAGCATTTGAACATATTCTAGGCTATCCGGTCAGCTTTGTTCAAGACAATCACTCACGTTATC
AAAAATGTACTCAGAGGCCCTTCACTTTCAACGCGCGGAGTACGCACAAGATAAACTTGTACGCTGCACCTATGG
AGCAGTTTTTGTGCTGTGATATTCGACCAATTCGGTATCCTTTGGTAAATGGGTTGGTGTCTGCTTTCT
AGCTGATAATAAGCAGCAGTTGTGGATACAAAAGGTTTTGCTCATGGCTTTTTGGTCTGTCTGATATCGCTGA
ATTTCAATATAAACTACAACTATTATCATCTGAAAGCGATTGTGGAATATGTTGGAATGATGAACGCATTGC
AATTGATTGGCCCCAAACATCAGGGTTAATCTTTTCGCCAAAAGATGAAAGGCTCTTTACGTTAGATGAGCTTAT
CAGATTAATAATTAATGTCATGAGCCGGCCTTAAGGAGGACTAGTCCCGCGCGCCATGAGTTAATCAAAAACA
GTTTTTGGAACCTTTGCGGGTATGTACTTCCAGCTATTGTGACACTACCAGCTTTGGGTATTATGGGGCGAAAT
TAGGCCCAGAAATATTTGGTGTATTCACTTTGGCATTAGCTGTTGTGGGTTATGCAAGCATTTTGTATGCAGGCC
TTACTCGCGCAGTGATACGAGAAGTCGCAATTGAAAAGATAATGAAGAAAATAAGTTGAAAATATTTCTTCAG
CGACAGTTGTAATTTATTTTATTGAGTTTGGCCGCTCACTCTTATTATTTTTTTTTTAGTGGTCATATCGCATTGC
TACTGAACATTAGTGAGACTTTTTTTCATAATGTAAGTGTCTCGCTTAAAATCTCGCAGCATCCATACCATTAT
TTTTGATTACTCAAATATGGTTGTCAATTTTAGAAGGTGAAGAAAGATTTGGTTACTTAATATCTACAAATCAA
TTACGGGAGTGATATAGCAATCTCACGGCATTATTTATACTTATTAACCCTCTTTGATGATGCGATAATAG
GCTTAGTCTAGCAAGTTTTTATGTTTTATTTTGGCTTTTATAATTTGTACGATAAAGTGCTTAAAGCTAAAC
TAACAATCGATATACCAACAATTAAGATTTGTTATGTTCCGGTGGTTGGATTACAGTAAGTAATATCATCAGCC
CTGTGCTATCATATTTTGTAGGTTTTATTGTTTCAAATCAACTTGGGGCTGCTAATGTTGCTTTTTTATACTGCAC
CATCAGAAATATTTCTCGGCTTAGTATAATCCAGGTGCGTTTTCAAGAGCCTTATTTCCAAGATTAGCTAATG
CAAATAATCCGCTGAAAGATATAAACGAAAAGATTAATTACAATTTCACTTTTAATAATCATCACCCCTATTT
TTTGTATTGGCGTGTATTTTTCAGAGAAGATAATGGTTTTATGGATGGGGGCATCATTTTTTGGTGAGCCTGGTT
TGGTATTATCAATATTAAGTATTGGCTTTATTTTAAATGGATTGGCACAAGTACCATTTGCCAGTATTCAATCCC
GAGGTCATGCTAAGATAACTGCATTTGTTTCTCTTAGAGTTGTTTCTTATTTATTACTTTTTATTTTACCTCA
TAAAGCACATGGGGTTGTTGGCGGGGATTGCGTGGTCAGTGAGGATGATAGTAGATTATATAGCATTAAAGTC
TTTTGGACGGTAAAGTATTAATAAAATAAAATTCAAAATGCAAGTTAATAACTCATGGCTTTATTTGGGTAGGTTG
ACAATTTATAATGATATATATATAACTTTAACTCTTCTTAGTTATAGCCATAATGTTTTCTTCTCGGCAC
AAAAAGTAGGATCACATCTCCATTACCTTTGCATTTTTTACCATGGTTACTAACTTTAATTGTGGGATAAGTAA
TTACGATCAATTTTACGAGTTAATGAAAGAAGCTTTTACTCTTTGTTGATTGGTTTACAGTTATTTTTATATT
TTATTTTATAGGGGAAGTGGTTAATTATAAACGTGAAAATATAAATGTTTATTATGGTCTTTTACATATTAATA
TGAATGTAAAAATATTGGATCATTGTCATCCCAATTTTATTATATACCATTTTCGAAATATATATGGTTGGTAT

GGGGGAGCAGATGGATTCTTCTCAATTTACGTCTTGCAAATACATTGGAGGGCTATACGGGTAAAAAATTTAT
CTTAATGCCTGCTGTATATCCTCTAATGATGGCTATGTTGCGCAATTGTTTGTCTAACAAAACTTCCAAATTA
TAAATACTCCATTTATTTCTGGATGTTTTTGTATTGTATTGGCACAATGGGAAAAATTTCAATATTAACGCCAAT
ATTGACATATTTAATTTATTTATGACTTCAAACATAGATTAAGAATAAAAAACAATAAAGTTTACATTGTTGAT
AATTATATTAGCTTTAACTTTGCATTTTACACGTATGGCTGAGAATGACCACTCAACATTTTATCTATTTTAGG
GCTCTATATTTATTACCAATAATTGCTTTAGGCCAGTTGAATGAAGTAAATAGTAGTCATTTTGGTGAGTATAC
GTTTAGATTATATATGCTATAACTAATAAAATTTGGCCTTATTAAGAATTGCCAGTAAATACTATTCTTGACTA
TTCATACGTTCTGTACCAACAAATGTATATACTGCACCTCAACCATTTTACCAGGATTTTGGTTATACTGGCAT
CATATTTGGAGCAGTATTATACGGACTAATATATGTGAGTTTATACACGGCCGGTTCGTGGAAATAATACACA
GGCATTACTGATTTACGCATTGTTTTCAGTTAGCAGTGCAACGGCTTTCTTCGCTGAAACGCTAGTAACGAATTT
AGCTGGAAATGTGATGTTAGTATTATGTACCATCTTACTATGGCGATTTACAGTAATATGCAAACAGTACAGTA
ACCATTCTAATGGCCACCTACAATGGCGAGGCCCTTCATCAAAAATCAGATTTTGTCACTACAACAACAAACATTT
TCTAACTGGCGGTTATTTATTTAGGATGATGGGTCTACAGACAATACTATATCTATAATAAAAACTTCCAAAA
TCTGACTCCAGAATTCGGCTAGTTGATGATAATTTGAAAGGTCAAGGTGCAGGAAAAAATTTTTTATCGCTGATA
AAGTACAGCGAGACAGATTATACAATTTATTTGACCAAGATGATATTTGGTTAGAAAACAAAATATTTGAATTA
GTAAAGTATGCAAATGAAATTAATTTGAATGTATCAGATGCGCCTTCGCTAGTTTATGCTGATGGCTATGCTTAT
ATGGATGGTGGGTTACAATCGATTTTCTGGGATATCTAACAATCATGCTGATCAATTAAGGATTTTCTTTTT
TTTAAATGGTGGATACCAAGGATGTTCTATTATGTTCAATCGTGAATGACCAAATTTCTTCTGAATTATCGAGGA
TTTGTATATCTACATGACGATATCACAACATTAGCTGCATACGCTCTTGGTAAAGTTTATTTCTCCCGAAATAC
CTTATGTTATATAGACAGCACGAATGCGGTAACGGTATCAAAACATTCGCAATGGATTGACTTCTAAATTT
AAATCACCAGTAACTATCTTTTATCACGAAAACATTTATCAGGTAAAAAATCTTTTTTTGAATGTAACGCTCT
ATCTTATCAGAGACGAATAAAAAAGTTTTTTTTGGATTTTATTTTCAATTTGTGAATCAAATAATAATTTACAGAT
TTTTTTAAGTTATGGCGAGGTGGGTTTAGATTAATAACAGTAGAACTAAATTTATTTAAAATTTCTTAATACGG
AGAAAAATTTAGCGAATGATTTCAATACTTACACCTACTTTTAAATCGGCAACATACTTTTATCAAGGCTATTCAAT
CTCTTATATTACAACTGATAAAGATTTTGGAGTGGATAATAATTTGATGATGGTAGTATAGATGCAACAGCGGTAC
TTGTAGAAGATTTAGAAAAAATGTGATTTTACTTGAATTTATGCTATCAGGAAAAAATGGTAAGCCCATGG
CTTTAAACGCTGGTGTAAAGCTTGTAGAGCGGATTATATCTTTATTTGACAGTGTGATGCACTAACTCCCG
ATGCCATAAAATTAATTAAGAATCAATACATGATTGCTTATCTGAGAAGGAAAGTTTTCAGCGGAGTCCGTTTTA
GAAAAGCATATATAAAAGGGGGGATTATTGGTAATGATTTAAATAATTTCTCAGAACATATATACTATTTAAATG
CGACTGAGATTAGCAATTTAATAAATGGTGTGTTGCATATTTGTTTTAAAAAGAAAGTTTGGTAAAAAATCCAT
TCCCCGTATAGAAGATGAAAAATTTGTTCCAGAATTTATATTTGGAATAAAAATAACTGACAAGGCGAAGATTC
GATTTAACATAAGCAAAGTTATATATCTTTGTGAGTATCTTGATGATGGTCTTTCTAAAAATTTCCATAACCAGC
TTAAAAATACCCAAAGGGTTTAAAGATTTATACAAAGATCAAAGAAAACGAGAGAAAACCTTATATAAAAAA
CAGAGATGCTAATTTAGATATTTGCAATGTTTATTTATGAGAAAAAATGAAAAAATCTATTTGTCTTACAGG
TTTAGGCCTTGGAGGTGCTGAGAAGCAGGTTTGTCTTTTAGCTGATAAATTAAGTTTAAAGCGGGCACCATGTAAA
GATTTATTTCACTTGGACATATGTCTAATAATAAAGTCTTTCTAGCGAAAATAATGTTAATGTCAATTAATGTAAA
TATGTCAAAAAACATTTCTGGAGTTATAAAAGGTTGTGTGAGAATTAGAGATGTTATAGCTAATTTCAAACCAGA
CATTGTACACAGTCATATGTTTCATGCAAACATTTACTAGATTGTCTGTAATTGGAATCAAAAAACAGACCTGG
TATTATATCAACTGCACATAATAAAATGAAGGTGGTATTTGAGAATGCTCACATATAGAATAACCGATTGTTT
AAGTGATTGTTGTACAAATGTTAGCAAAGAAGCAGTGGATGAGTTTTTACGGATAAAAGCCTTTAATCCCCGTAA

AGCAATTACTATGTATAATGGGATAGATACCAATAAATTTAAATTTGATTTATTGGCAAGGAGGGAAATTCGAGA
CGGTATTAATATAAAAAATGATGATATATTACTTGTCTGCAGGTCGTTAACGTTAGCTAAAGATTATCCTAA
TTTATTTGAATGCAATGACTCTGCTTCTGAACACTTTAACTTATTATTATTGGTGATGGTGAATTGCGTGACGA
AATTAATATGCTTATAAAAAAATGCAATTATCTAATAGGGTGTCTTGTGGGAGTTAAAAAATATTGCTCC
CTATTTTCTGCGATGTGATATTTTGTCTCTCTTCTCGTTGGGAAGGATTTGGATTAGTCGTGGCAGAAGCTAT
GTCATGTGAGCGAATTGTTGTTGGCAGGATTGAGGGGAGTAAGAGAAGTTATTGGTGACGATGATTTTCTTGT
ACCCATATCTGATTCAACACAACCTTGAAGCAAAATGAAAAATGTCCTTTGAGCCAGATACGTGATCACATTGG
TTTTCGGAATCGTGAGCGTATTTAAAAAATTTCTCAATAGATACTATTATTATGCAGTGGCAAGAACTCTATGG
AACTATAATTTGCTCAAAACATGAAAGGTAGATTTATATTTGGAACGTGCTTTTGTGTTGAATTTAATCAATCT
CAATTGAGATTTTGTATTTCAAAAATACCATCATAGCTAACGATGATTGGTATTTATTTAAGATGCTTTCTAT
AAATATATTGACGTTTTAATGCGCCGAAACGATTGGGCTGGGAACAGAGAAGTAAAAGTGTGTTGAGAATGAAG
AGTTTTTGAGATGTTTATGGATATTAATAATGATCCAGTGAATTAATTTATAATAAATCAAGATTTAATGT
TAATAAATGATAATCTTTTCTGACACTCATATTAATTATGAGTGGTACGTTTGGTAAACGGTAAACTATTATATG
ACAGCTAGAACAACATAAGTTTTGCACTTACAATTACTCCCACTCTTAAGTGGCCTTCAAAGGGTAACTTAAAC
GAAATTAGTGCGTTATATACTGATTATGATTATACACTAGTTTGTCTCAAAAAAAGGTCCACTAACAAAAGCATTG
CTGGAATATGATGTCGATTGTCATTGTATCCCCGAACCTACGAGAGAAATTACCGTAAAGAATGATTTTAAAGCA
TTGTTCAAGCTTTATAAGTTCATAAAAAAGAAAAATTTGACATTGTGCATACACATTCTTCAAAAACAGGTATT
TTGGGGCGAGTTGCTGCCAAATTAGCACGTGTTGGAAAGGTGATCCCACTGTACATGGTTTTCTTTTCCAGCC
GCATCTAGTAAAAAGTTATTACCTTTATTTTTCATGGAATGGATAGCAAAGTTCTTTACGGATAAGTTAATC
GTCTTGAATGTAGATGATGAATATATAGCAATAAACAATTAATAATCAAGCGGATAAAGTTTTTTAATTCCT
AATGGAGTAGACACTGATAAGTTTTCTCCTTTAGAAAATAAAATTTATAGTAGCACCTTGAATCTAGTAATGGT
GGTAGATTATCCAAGCAAAAAGATCCTGAGACATTATGCTTGTCTGTTGAAAAACTGCTGAATGAAAATGTTAAT
GTTAAGCTGACACTTGTAGGAGATGGTGAACATAAAGAACAGTTAGAAAAGCAGGTTCAAACGGCAAGATGGACGT
ATAATTTTTTCATGGATGGTCAGATAACATTGTTAATATTTAAAAGTTAATGATCTTTTTATATTACCTTCTCTT
TGGGAGGGTATGCCATTAGCAATTTTAGAAGCATTGAGCTGTGGACTTCCATGTATAGTCACTAATATTCCAGGT
AATAATAGCTTAATAGAAGATGGCTATAATGTTGTTGTTGAAATTAGAGATTGTCAGTTATTATCTCAAAAA
ATCATGTATATGTTGGTAAGCCAGAAGTATTGCACAGCAATCTACCAATGCACGATCATTATTCTGAAAAAT
TATGGATTAGTAAAAAGAAATAATAAGGTGAGACAGCTATATGATAATTAAGAGCTCGGTACCCGGCCCTAGGGT
GTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCTTATACTTTCTAGAGAATAGGAACCTTCGGAATAGGAACATAAGGAGGATAT
TCATATCCGTGACGCGGCCGCCCTGCAGGCATGCAAGCTTGTATCCATATGGATCGCTAGCTTAATTTAATAA
GCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCCAACATTCCA
GGCCGCGAGCATTGAGCGGGTATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGG
TATGGCAGTGTGGGACGCAACCTTGCCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTCAACCGTTC
CCGTGAGAAGACGGAAGAAGTATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAACTGGTTCCTTACTATACGGTGAAAGAGTT
TGTCGAATCTCTGAAACGCCCTCGTCGATCCTGTTAATGGTGAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGA
TTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATTTGATGGTGGTAAACCTTCTTCCAGGACACTATTG
TCGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTTAACTTTCATCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCT
GAAAGGTCCTTCTATTATGCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATGGTAGCACCGATCCTGACCAAAATCGC
CGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGGCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGT
TCACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCT

CACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGGAATAACGGTGAACCTGAGCAGTTACCTGATCGACATCAC
 CAAAGATATCTTCACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAA
 AGGTACGGGTAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGCTGTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTT
 TGCACGTTATATCTCTCTCTGAAAGATCAGCGTGTGCCGCATCTAAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCC
 AGCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTTCGTCTGCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCCA
 GGGCTTCTCTCAGCTGCGTGTGCGTCTGAAGAGTACAACCTGGGATCTGAACTACGGCGAAATCGCGAAGATTTT
 CCGTGTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCTGCAAAAAATCACCGATGCTTATGCCGAAAAATCCACAGATCGC
 TAACCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAATGCCGATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGATGTCGTTGCTTA
 TGCAGTACAGAACGGTATTCGGTTCGGACCTTCTCCGACGCGGTTGCCATTTACGACAGCTACCGTGTCTGT
 TCTGCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTACTATTTTGGTGCGCATACTTATAAGCGTATTGATAAAGAAGG
 TGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

**SEQ ID NO: 18 (пример нуклеотидной последовательности локуса *rfb* O25B – штамм-
 продуцент O25B-EPA stGVXN4459)**

ATGACGAATTTAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCGATACCC
 AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAA
 GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA
 CTCCTTGAGCAGCGCTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG
 AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCA
 TTTGTGCTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATG
 ATTGACGTTTTCAACGAAACGGGCCGACCCAGGTGCTGGCAAACGATGCGGGGTGACCTCTCTGAATACTCC
 GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAAGGTAAAGTCAAGCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGAT
 CAGCCGACAGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGTCTGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGAACTG
 GAACGTAATCAGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAACAATCC
 GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTCGCGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG
 TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGCGAAGTTCGGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA
 TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTAAAAATTCGACGCAAAAGTAATTTGTTGCGAA
 TCTTCTGCGGTTGTTTTATATAAACCATCAGAAATAACAGGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCAA
 GGATTTTCTTGTTCAGAGCGGATGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGGAGTGGGTA
 ACGCTCGTACATCATAGGCATGCATGCAGTCTGTTAGCTGTAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC
 CTCTATTAATCAAACCTGAGAGCCGCTTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGCTAGCAGT
 GAAGATACTTGTACTGGTGGCGCAGGATTTATTTGTTCTGCTGTTGTTTCGTACATAATAAATAATACGCAAGA
 TAGTGTGTTAATGTCGATAAATTAACATACGCCGAAACCTGGAATCACTTGCAGATGTTTCTGATTCTGAACG
 CTATTTCTTTGAACATGCGGATATTTGTGATGCAGCTGCAATGGCACGGATTTTGTCTCAGCATCAGCCGGATGC
 AGTGATGCACCTGGCAGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATAT
 TGTGGGTAATGTCCTTTTAGAAGCGGCTCGGAATATTGGTCTGGTCTGGATGATGAAAAGAAAAAACTT
 CCGTTTTTCATCATATTTCTACTGATGAGGTGTATGGTACTTACCCCATCCGGATGAAGTAAATAGCAATGAAAC
 GTTGCCGCTATTTACGGAAACGACAGCATAACGCGCAAGTAGTCCATATTTCTGCTTCTAAAGCTTCCAGCGATCA
 TTTGGTTCGCGCATGGAAACGTAATGTTTACCGACCATGTTGACTAATTGCTCGAACAATATGGTCTCTTA
 TCATTTCCCGAAAAGCTTATCCACTGGTATTTCTTAATCACTGGAAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAA
 AGGAGATCAGATCCGCGACTGGTTGTATGTAGAGGATCATGCTCGAGCGTTATATACCGTCTGTAACCGAAGGTAA

AGCGGGCGAACTTATAACATTGGTGGACACAACGAAAAGAAAACATCGACGTAGTGTTCACTATTTGTGATTT
GTTGGATGAGATAGTCCCAGAAAGAGAAATCTTACCGCGAGCAAATTACTTATGTTACCGATCGTCCGGGACACGA
TCGCGGTTATGCGATTGATGCTGAGAAGATTGGTCGCGAATTGGGATGGAAACCACAGGAAACGTTTGAGAGTGG
GATTCGTAAAACGGTGAATGGTACCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAATGTGAAAAGTGGTGCCTATCAATC
GTGGATTGAACAGAACTATGAGGGCCCGCAGTAATGAATATCCTCCTTTTTGGCAAAACAGGGCAGGTAGGTTGG
GAACTACAGCGTGCCTGGCACCTCTGGGTAATTTGATTGCTCTTGATGTTCACTCCACTGATTACTGTGGTGAT
TTTAGTAATCCTGAAGGTGTAGCTGAAACCGTAAGAAGCATTTCGGCCTGATATATTGTCAACGCAGCCGCTCAC
ACCGCAGTAGACAAAGCAGAATCAGAACCAGTGGTGCACAATTACTGAACGCAGAGTGTGCAAGCGATCGCG
AAAGCAGCCAAATGAAGTCGGCGCCTGGGTTATTCACTACTCTACTGACTACGTATTTCCGGGGACCGGTGAAATA
CCATGGCAGGAGGAGGATGCAACCGCACCGTAAATGTTTACGGTGAACCAAGTTAGCGGGAGAAAAAGCATT
CAAGAGCATTGTGCGAAGCACCTTATTTCCGGACCAGCTGGGTCTATGCAGGTAAAGGAAATAACTTCGCCAAA
ACAATGTTGCGTCTGGCAAAAGAGCGTGAAGAATTAGCCGTTATTAATGATCAGTTTGGTGCGCCAACTGGCGCA
GAGTTACTGGCTGATTGTACGGCACATGCTATTCGTGTGGCACTGAATAAACCGGAAGTCGCAGGCTTGATCCAT
CTGGTAGCTAGTGGTACCACAACGTGGCAGCATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGCATT
CCCCTTGCCTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAACAACAGCCTATCCTACACCAGCTCGTCTCCACATAACTCT
CGCCTAATACAGAAAATTTAGCAGAACTTTGCGCTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTTGGCGTGAAACGAATG
CTTAACGAATTATTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTAATGGTGGAGCAAGATGTATT
AAAAGGAATGATGAAATGAAAACCGCTAAAGGTATTATTTTGGCGGGTGGTCTGGTACTCGTCTTTATCCTGTG
ACGATGGCCGTCAGTAAACAGCTGTTACCGATTTATGATAAACCGATGATCTATTACCCGCTCTCTACACTGATG
TTAGCGGGTATTTCGCATATTCTGATTATCAGTACACCACAGGATACTCCTCGTTTTCAACAACGCTGGGTGAC
GGGAGCCAGTGGGGCTGAATCTTTCAGTACAAAGTGAACCGAGTCCGGATGGTCTTGGCAGGCGTTTTATTATC
GGTGAAGAGTTTATTGGTGGTGTGATTGTGCTTTGGTACTTGGTGATAATATCTTCTACGGCCACGACCTGCCG
AAGTTAATGGACGTAGCTGTTAACAAAGAAAGTGGTGAACGGTATTTGCCTATCACGTTAATGATCCTGAACGT
TATGGTGTGCTGGAGTTTGATAATAACGGTACTGCAATTAGCCTGGAAGAAAAACCGCTGGAACCAAAAAGTAAC
TATGCGGTTACTGGGCTTTATTTCTATGACAATGACGTTGTGGAAATGGCGAAAAACCTTAAGCCTTCTGCCCGA
GGTGAACGAAATTACCGATATTAACCGTATTTATATGGAACAAGGACGTTTGTCTGTGCTATGATGGGGCGT
GGCTATGCATGGCTGGATACAGGGACGCATCAAAGTCTTATTGAAGCAAGCAACTTCATTGCCACCATTGAAGAG
CGCCAGGGACTAAAGGTTTCTGTCCGGAAGAAATGCTTATCGTAAAGGGTTTATTGATGCTGAGCAGGTAATA
GTATTAGCCGAACCGTTGAAGAAAAATGCTTATGGTCAAGTATCTGCTCAAAATGATTAAGGTTATTAATAAGAT
GAACGTAATTAACGAAATTCCTGATGTGCTGATTTTTGAACCAAAAGTTTTTGGGATGAACGTGGCTTCTT
TTTTGAGAGTTTTAATCAGAGGATTTTTGAAGAAGCAGTAGGTCGTAAGGTTGAGTTTGTTCAGGATAACCATT
TAAGTCCAGTAAAGGTGTTTTACGTGGTCTTATTATCAGTTAGAACCCTTATGCTCAAGGAAAACGTTGCGCTG
TGTTGTTGGCGAGGTTTTTGTGTTGCGGTTGATATTCGTAATCGTACCTACATTTGGGAAATGGGTTGGGGT
GAATTTGCTGCTGAGAATAAGCGTCAGTTGTGGATTCCCTGAGGGATTTGCACATGGTTTTTGGTGTGAGTGA
TTTAGCAGAAGTTTTATATAAAACGAATCAATATTATGCTCCATCACATGAAAAAATATTATATGGAATGACCT
CTTGCTTAATATTAATGAGCCGAGCAGCACTGATCACTCTGTCTGATAAGGATGCAAAATGGGAAAGATTTGA
ACTAAGTGAGTTTTGAAATGTCTCTCTTAAACATAGTATATGGAATGTTGCGGGCTACTTTATACCAACATTAA
TTGCAATTCGCGCTTTGGATTAATTGCGAGGAAATTTGGTGTAGAACTATTTGGTTTGTATACGTTAGCAATGA
TTTTTATAGGGTATGCAAGTATATTTGATGCTGGGTTAAACAAGAGCTGTTGTGCGTGAAATAGCATTACTAAAA
ACAGAGTGGACGATTGTAATACGATAATAGTAACTTCTATTATCGCTGTGATTTTTTAGGGTTTATCGGAGCGG

GGGGAGTGTCTGCTTAAAGGCGATATTATTGAACTGTTAAATATCTCACCAATATATACGCCGATTTCGATAA
AGTCTCTAGTATTATTATCATCTCTGATACCTGTATTCTTAGTCACGCAAATACTATTAGCAGAGCTTGAGGGTC
GGGAATATTTTGGGATTCTAAATATACAAAAAGTGTAGGGAATCTTTAATTGCAGGGTTACCTGCATTATTTG
TTTTAATTAATCAAACGCTTTTTCTGCAATTATTGGTGTAGCGATTGCAAGAGTTATATGCTTGTGGTTAAGCT
ACATTATGAGCAGGGAAAGAATAACTATCGATATCTCATTTTTTTCAATAACTGTTTTAAAGCGGTTATTTAGAT
ATGGCGGGTGGGTAACATAAGTAACATAATATCTCTATATTAGCGAGTATGGATAGATTTATTCTATCCCATA
TCCAGGGAGCATCAAAAATATCATTCTATACAGTCCCTAATGAGCTGGTAACTAGGCTTGGAAATAGTTCAGGCT
CTCTTGGGAAAGCTGTTTTCCAAAATTAAGTCATGCAAGGAATTTTACAGCGTCATATGCAGAGCAAAAAAAG
CTTATATATTAATGACTGTCAATTGTAATGCCTTTGGTTTTATTGTATATTATTACGCAAAGTTTATTTTAAACAT
TGTGGATGGGGCTGAGTATGCAGGGATTCGGTCGAAATATTACGGATTATGCTTATAGGGTATATTTTAACT
GTTATTACAAAATCTTTTTGCCAACATACAGGCCCTTTGGAAAAGCAAAATACACTGCATACATCCATATGATGG
AATTTATTCTTATTTGATAATGTTATATATAATTTCAAAGGAATATGGGGTTATTGGTGTTCGCTGGTTATGGA
CAATTCGAGTAATAATTGATTTTTGATGCTTTTATATATGAGTTATCGTTGTAATAATCTTATGAAAAAGGGT
AGCCTGATGATATATATTGTGGTATTAAATGGAAATGGGGCTATAGATACCATTAAATGTGTTAAAAGTTAATG
GATTTAAATGTTAGCGATTATAAAATATCATTGTTGATAACTGTTCTATGGATAACTCATATGATACTATAAAA
GAAATCTTAATTCATTATATATTGCTGATAAAAGTATCATTGAGGTGAAGTATGAGGATAGAAAATAATATAAA
ACCTTAGAAAAAGATAAAATCATATTAATACAATCTCCGCAAATAATGGGTACGCAAGTGGTAATAATATTGGC
ATAGAGTTCGCTCTTAATCAGGAGAATATGAAATACGCTCTGGGTTCTGAATAATGATACTGAAGTGGATAAAGAG
GCTTTAACTCATTTAATTAGTAAATGTGATTGAGATAAAAGTATAGGGATTTGCGGTTCTCGTTTAGTCTATTTT
GCCGACAGAGAGATGCAGCAAGGACTAGGTGGGGTGCATAACAAATGGTTATGCACTACAAAAAATATGAAATG
GGAAGATTAGTTTCCAAAAATATGATGATGAAGTCATTAGTAATGATATAGATTATATAAATGGCGCATCGATG
TTTTCTCTAGAGAATGTTTGGAAACAGTTGGATTGATGAATGAAGAATATTTTTTATACTATGAAGAGTTAGAT
ATTTGCCTCAGAGCAAAAGCAAGAACTTTAAATTAGGTATTTGCTCAGAAAGTTTGGTTATCATAAAATAGGT
GCAAGTACTGATGGGGAAAGAGCATGATGGCTGATCTTTGCTCAATAAAAAATAGGCTGGTCATTACAGAAAGG
TTTTATCCCAATATATTGGACGGTATGGTTGTCACTTTTTGTTGTAGCATTAAACCGTCTAGAAAGGGTGGAG
TTTAATAAGATGAAAAGATGTTTGAATGTTATGTTAACTTCAAACGAAACAAAGGTAGCAAATGCCATTAGAAT
ATGCACTTAATCATGGTGTAAATAAATCTATAGTTTGATATGTTATTAAGGGTATTTAATGAAAGTGGCTTTTT
TATCTGCTTATGATCCACTATCTACATCCAGTTGGTCTGGCACACCTTATTATATGCTAAAGGCATTATCGAAGA
GAAATATTTCCATTGAAATATTAGGACCCGTAATAGCTATATGATATACATGTTAAAAGTATATAAAATTAATAT
TAAGGTGTTTCGGAAAAGAATATGATTATAGTCATTGCAAGTTGCTTTCCAGGTATTACGGTAGAATATTCGGTA
GGAAATAAAAAAATGATGGTTGGATTTTATTATCGCACCTGCAGGTTCCACAAATTGCTTTTTTAAAAA
CAACCATACCAATAATATATCTATCGGATACAACATATGATCAATTA AAAAGCTATTATCCGAATTTAAATAAAA
AAACAATTATAAATGATGAGGATGCAAGTTTAAATCGAACGCAAGGCTATTGAAAAGCAACAGTAGTATCTTTCC
CATCTAAATGGGCAATGGATTTTTGCAGGAATTATTACAGATTAGATTTTGATAAATTAGTTGAAATACCATGGG
GGGCTAATTTATTTGATGATATTCACTTTGCTAATAAAAAATAAATCAAAGAATAGTTATACTTGTCTTTTCT
TGGGAGTTGATGGGAAAGAAAAGGTGGGAAAACAGCCTTGAAAGCAATTGAATATGTAAGGCAGTTATATGGGA
TCGATGTTAGACTAAAAATTTGTGGATGTACTCCGAATCAAAGATTTTACCTACTTGGGTTGAATTAATTGATA
AAGTAGATAAAAAAATACGTTGACGAATATCAGAAATTCATCGATGTGTATCTAACGCTGATATACTTCTTTTAC
CAACCATTGCTGAATGTTATGGAATGGTATTTGTGAAGCTGCTGCTTTTGGATTGCCTGTTGTGCTACAGATA
CAGGTGGAGTCAGTTCTATAGTTATCAACGAAAGGACGGGGATATTAATTAAGACCCGTTAGACTATAAGCACT

TTGAAATGCAATTCATAAAATAATTAGTTCGGTAGAGACTTATCAAACTACTCCAAAACGCAAGAATTAGAT
ATAATAATATATTGCATTGGGACAATTGGGCTAAAAAGATAATTGAGATTATGTATGAGCATAAGAATAGAAGAA
TCAAATAGCACAAAAGAATTATATGTTTATTATACTTTTTCTGTTTTCCCTGATTTTTTGTTTTATACATTA
GGGGTTGATAATTTAGCATTTCAACGATAATCTCAATTACATTGCTTTTTGTTTTTTAAGAGCTAAAAATATT
TGCAAAGATAATTTCTAATAATAGTAGCGTTATTCATATTGTTGTGTTTTAACTGTTTGTAAAGTATGCTATTT
AATATTGAACAGGCTTTAACATTTAAAGTTGTACTTTCAATATATAGCATCTTAATAATGGCATAACGTCCTCTCT
TGTTATGCACAGACGTTGTGGTTATGTTCTGAAGAAACTTAAGAGATCCGTCCTTTATTTGTTTCGCATTTCTT
TGCCTTATTGGCATTATAAGTATTCTTTTACAGAAGACTGAGATTATACATGATAAAAGTATGATTCTTTTTCTCT
GAACCATCAGCATTTGCATTGGTTTTTATACCTATCTTTTCATTTTGTTTATACTATACAAGAGGGGGGGGCTA
CTATTGCTCTATATATATCTTTGGGTATTGCGTTAGGTATCCAGAATTTAACAAATGTTGGTAGGCATTGTGATT
AGTGTTTTTGTGATGAAAAAATAACTATAAGGCAAACTATTGTTATACTTTTTGGGGCATGGATTTTTTCCATG
ATATTAAGTGATTAGACATTTCTTACTATACATCGCGGCTTGATTTTAAAAACTACGAACCTATCAGTGCTT
GTATATCTTTCAGGAATTGAAAGAGCTTTCTTGAATTTTATTACAAGTTATGGTCTTGGTATTGGTTTTCAACAA
ATGGGAGTGAATGGGGAGATAGGAATATATCAACAAATTTTAGCTGAACCTGATGCCCTATGTTAAATATATAC
GATGGCTCATTTATTTCTTCTAAGTTAATATCTGAGTTTGGGGTTATTGGTGCATTAATGTGATTTTTCTATTTT
TTTTATTTTTCCCGATTTTATCTGCGTTTCAAAAAAGTAAGAGATATTCACCGCAGTATATTTTAGCATATAGC
TTCTACATGTGTTCTTCATCCCTCTTTTTATACGTGGTGGTGTATATAAACCCCTATGTGTTTATGTTATTT
TCATCAATATTTTTGTCAAATATCACGCTAAAAATATCTTGATGAAATCTAATGTCCAGATAGCTATATAATAG
TAGATTATATTATCATTATCACGTAATTACATATTAATAGCATATATGATAACTAGGACATAAATAATGTGCAT
TAAAAAAACTTAAGTTAATTAACGATATGGCCTTTATGGTGGTCTTAGGCTTCTTAAAGATATATCTTAAC
AAAATTTTTATTTGTTCAAATGTTAGGATTATTAGATTTCCATGTTATATTAGAAAAGATGGAAGTGTAGTTT
TGGAAAAGTTTTACATCAGGTGTAGGATTACGAGTTGATGCATTTATGGATGCCGTAGTTTCCATTGGAGAAAA
TGTTCAAATTAATGACTATGTTACATCGCGGCTATTAATAATGTCATTATTGGTAGAGATACATTAATAGCAAG
TAAAGTATTTATAGTGATCATAATCATGGTATTTTTTCTAAATCCGATATCCATAGTTCACCAACTATTTATCC
TTCGTCTAGGCCCTTGAATCTGCACCTGTGTATATTGGAGAGCGTGTGTGGATTGGCGAAAATGTGACAATATT
ACCAGGTGCGTGTATAGTAATGGTGTAGTTATTGGCGCAAACAGTGTGTTTCGTGGTGAGATTCCTAATAATGT
GATCATTGCTGGTGTCCAGCTAAAATTGTTAAAAATATAACTATGAGCGTATGCAATGGGAAAGAATATAGTT
GTAATATCGGCTGTTAATTTTACAACCGGAGGCCCTTTACCGTACTAAAAATGTGCTTACAGCAACTAAAGAT
AGAGCCGAATGTAATTTATTGCACTGGTTCATAGCTCTGCTGAACTAATGGAATTTTCCGTGGGTTGAATTT
ATAGAGTATCCAGAAGTCAAGTCTTCGTGGGTTAAAAGATTATATTTCGAATATATAACTTGCAATAGATTATCT
AAGGTGATTAAGGCAACTCATTGGGTATGCTTACATGATATTACAGCAAATGTTAGTGTACCCTATAGATTTGTT
TATTGCCACAATCCTGCACCGTCTATAAAATATTTAAGCTATCGAGATATTATAGGAGAACCTAAATTTTATCTT
TTTTATCTTTTTTATGGGCTTTTATACAATATCAATATAAAAAAGAACACAGCAGTTTTTGTTCAGCAGCAGTGG
CTAAAAAAGAATTCGAAAAAATATAAGTTAAAGAATGTTGTTGTTAGTCGCCCTGAAGATATTTGCCCTTTT
GAAAGTGATGGTTTGGTAAGAAATAATAAAAAAGGATGTGAGGATATTTTACCCAGCAGTGCCCCGTATATTT
AAAACTTTGAAGTTATCATACGTGCTGCACAAATATTACAAGATAAAAAATTCATTTTTTACTTTTGTAT
GGTACTGAAAATAAGTATGCAAAAAGAATATATAAATTAGCTTCGGAACGAAAATGTACATTTCTCGGTTAC
CTTAATGCAACCGAGATGGTTAACTTTTATCAAGATTCAGATATTTTGTGTTCCCATCGAACTAGAAACGTGG
GGATTACCATTATCAGAAGCTAAAACATACAAAAATGGATATTTGCGGCAGACTTACCTTATGCTCATGAAGTT
TTATATAACTATTCAAAAAC TAGATATTTCCATTTGACGATGAGAAAATACTTGTTCGCTACATATTAGAGTAC

ACAAGTAAAAATATGCATGAAGATATAAAAAATAGTAGGGTGAATTTTAATAATGATGCATTGACTGGTTTTGAA
 CAGTTTATTGAATATATCCTCAAGGGGAACAGCTGGTTTATATTATAATCGTTTCACATGGCCATGATGACTA
 TATAGAAAATCTTTTATTAATTTAAAGTTGCCCTCTGGAAGATTTAAAAATAATAGTTCGTGATAACAAAAGTTC
 AATGGTTTTAAAAAACATGCGAAAAAATTCGCTAACCTATTTGCATGGAGGGCAATATGGATTTGGACATAA
 TAATAACATAGCAGTGT CATATATAATTAATAACTTCATGATTATGAATAATGATTATTTCTCTTTCTAACCC
 CGATGTATTCATAACAGTAAAAGTTTGATTAATTTGTTGATTATATAATTAGTAATGATTATAAGTTTAGCAC
 ATTATGTCTTTATCGAGATTTACTAAAAGCAAACATGATTATCAATACGGAGTTTTCCAACTTTATATGATTT
 TCTTTGTTCTTTTTTATTGGGGTGAATAAAAGTAAATTAAGAAGGAAAATATACTTTCTGATACTGTAGTTGA
 TTGGTGTGCTGGCTCATTTATGCTTATTCATGCTTTAAGTTTCTTAAATGTGAATGGTTTTGATCAAAAATATTT
 TATGTATTGTGAAGATATTGACCTTTGTATGCGTTTTAAATTAAGTGGAGTAGATCTTTACTATACTCCCATTT
 TGATGCTATTCAATTATGCGCAGCATGAAAATAGAAGAATTTACTAAAGCATTTGATGGCATATAAGGAGTAT
 TACGCGCTACATATTACGGAACCAATCTTTCTTATAAAAACTATAGAAAAATTACATCCGAACTGGTAAAGTG
 ATTAAGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCCTATACTTTCTAGAGAAATAGGAACTTCGGAATAGGAA
 CTAAAGGAGGATATTCATATGGATLALGCCCTLALGCATLALGCATGGATLALGCATLTTATLACTTTLATLALGTLCT
 TTGTATACTTATTTGCGAACATTCAGGCGCGAGCATTGAGCGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATG
 TCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGTGGGACGCAACCTTGGCTCAACATCGAAAGCCGTGGT
 TATACCGTCTCTATTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGAAGTATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAACTG
 GTTCTTACTATACGGTGAAGAGTTTGTGCAATCTCTGGAACGCCCTCGTCGCATCCTGTAAATGGTGAAGCA
 GGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATTGATGGTGGT
 AACACCTTCTCCAGGACACTATTCGTGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTAACTTCATCGGTACCGGT
 GTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGTGAAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTG
 GTAGACCGGATCCTGACAAAATCGCCGCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTTGGTCCGAT
 GGGCGAGGTCATATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTAT
 TCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCAACGAAGAAGTGGCGCAGACCTTACCGAGTGGAAATACGGTGAA
 CTGAGCAGTTACCTGATCGACATCACCAAAGATATCTTACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGAT
 GTGATCCTGGATGAAGCGGTAACAAAGGTACCGGTAATGGACCAGCCAGAGCGCGTGGATCTCGGGAACCG
 CTGTGCTGATTACCGAGTCTGTGTTTGCACGTTATATCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTTCGCCGATCTAAA
 GTTCTCTGCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGCGCACAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTGCTGCGCTGAT
 CTGGGCAAAAATCGTTTCTTACGCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGTGCGTCTGAAGAGTACAACTGGGATCTG
 AACTACGGCGAAATCGCGAAGATTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCGTCAGAAAATCACCGAT
 GCTTATGCCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAATGCGGATGACTACCAG
 CAGGCGCTGCGTGATGTGTTGCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCCGGTTCGACCTTCTCCGAGCGGTTGCC
 TATTACGACAGCTACCGTGTGCTGTTCTGCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTACTATTTGGTGGCGAT
 ACTTATAAGCGTATTGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

SEQ ID NO: 19 (пример нуклеотидной последовательности локуса *rfb* O75 – штамм-продуцент O75-EPA stLMTB11737)

ATGACGAATTTAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCGATACCC
 AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAA
 GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTTATGAGTTAGAATCA
 CTCSTTGAGCAGCGCTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTTATG

AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCA
TTTGTGCGTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATG
ATTGCACGTTTTCAACGAAACGGGCCGACGCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCC
GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGAT
CAGCCGCAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAAGT
GAACGTAATCAGCCTGGTGCATGGGGACGTATTAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAACAATCC
GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAAGCGTTTGTGAAG
TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCGGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA
TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAAATTCGACGAAAAAGTAATTTGTTGCGAA
TCTTCTGCGGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA
GGATTTTCTTTGTTTCCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA
ACGCTCGTCACATCATAGGCATGCATGCAGTGTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGTAGCGTGCATTAATAC
CTCTATTAATCAAACCTGAGAGCCGCTTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGCTAGCAGT
GAAGATACTTGTACTGGTGGCGCAGGATTTATTTGGTTCTGCTGTTGTTTCGTACATAATAAATAATACGCAAGA
TAGTGTGTTAATGTCGATAAATTAACATACGCGGAAACCTGGAATCGCTCGCTGAAATTTCTGATTCTGAACG
TTATTCATTTGAGCATGCAGATATCTGGATGCCGAAGCGATGGCTCGTATTTTCGCACAGCACCAGCCAGACGC
GGTGTGCACCTGGCAGCAGAGGCCACGTTGACCGCTCAATAACTGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATAT
TGTGGTACTTATGTTCTTTTAGAAGCGGCGCAATTATTGGTCTGGTCTGGATGATGAAAAGAAAAAAACTT
CCGCTTTCATCATATTTCTACTGATGAGGTGTATGGTACTTACCCCATCCGGATGAAGTAAATAGCAATGAAAC
GTTGCCGCTATTTACGGAAATGACAGCATACGCGCAAGTAGTCCATATTTCTGCTCTAAAGCTTCCAGCGATCA
TTTGGTTGCGGCATGGAAACGTAATGTTTACCGACCATTTGACTAATGCTCGAACAATATGGTCCCTTA
TCATTTCCCGGAAAAGCTTATTCACCTGGTTATTTCTTAATGCACTGGAAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAA
AGGAGATCAGATCCGCGACTGGTTGTATGTAGAGGATCATGCTCGAGCGTTATATACCGTCGTAACCGAAGGTAA
AGCGGGCGAAACTTATAACATTTGGTGGACACAACGAAAAGAAAAACATCGACGTAGTGTCACTATTTGTGATTT
GTTGGATGAGATAGTCCCGAAAGAGAAATCTTATCGTGAACAATTACCTATGTTGCTGATCGCCAGGGCATGA
TCGCCGTTATGCAATTTGATGCCGATAAAATTAGCCGCAATTGGGCTGAAACCACAGGAAACGTTTGAAGCGG
GATTCGTAAAACCTGTGGAATGGTATCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAATGTGAAAAGTGGTGCCTATCAATC
GTGGATGAAACAGAACTATGGGGCCGCACTAATGAATATCCTCCTTTTTGGCAAAACAGGGCAGGTTGGTTGG
GAACTACAGCGTGCTCTGGCACCTCTGGTAATTTGATTGCTCTTGATGTTCACTCCACTGATTACTGTGGTGAT
TTTAGTAACCCGTAAGGTGTGGCTGAAACCGTTAGAAGCATTGCGCCTGATATTTATTGTCAACGCAGCCGCTCAC
ACCGCAGTAGACAAAGCAGAATCAGAACCAGGTTTGCACAATTACTGAACGCAGCAGGTGTCGAAGCGATCGCG
AAAGCAGCCAATGAAGTCGGCGCTTGGGTTATTCACTACTCTACTGACTACGTATTTCCGGGGACCGGTGAAATA
CCATGGCAGGAGGAGGATGCAACCGCACCGCTAAATGTTTACGGTGAACCAAGTTAGCAGGAGAAAAAGCATT
CAAGAGCATTGTGCGAAGCACCTTATTTCCGGACCAGCTGGGCTATGCAGGTAAGGAAATAACTTCGCCAAA
ACGATGTTGCGTCTGGCAAAAGAGCGTGAAGAATTAGCCGTTATTAATGATCAGTTTGGTGGCCAACTGGCGCA
GAGTTGCTGGCTGATTGTACGGCACATGCCATTCGTGTGGCACTGAATAAACCGGAAGTCGCAGGTTTGTACCAT
CTGGTAGCCAGTGGTACCACAACCTGGCACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAAGCAGGCATT
CCCCTTGCACTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAACAACAGTCTATCCTACACCAGCTCGTCTCCACATAACTCT
CGCCTTAATACAGAAAAATTTAGCAGAACTTTGCGCTTGTCTTGGCTGACTGGCAGGTTGGTGTGAAACGCATG
CTCAACGAATTTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTGATGGTGAACCAAGATGAATT

AAAAGGAATGATGGAATGAATACGCGTAAAGGTATTATTTTAGCGGGTGGTTCTGGTACACGCTTTTATCCTGTG
ACTATGGCTGTCAGTAAACAGCTGTTACCGATTATGATAAACCGATGATCTATTACCCGCTCTCTACACTGATG
TTGGCGGGTATTCGCGATATTTTGATTATCAGCACGCCACAGGATACTCCTCGTTTTCAACAACCTGCTGGGTGAT
GGGAGCCAGTGGGGCTAAATCTTCACTACAAAGTGCAACCGAGTCCGGATGGTCTTGCCGAGGCATTTATCATC
GGTGAAGAGTTTATCGGTGGTGATGATTGTGCTTTGGTACTTGGTGATAATATCTTCTACGGTCACGACCTGCC
AAGTTAATGGATGCCGCTGTTAACAAAGAAAGTGGTGCAACGGTATTTGCCTATCACGTTAATGATCCTGAACGC
TATGGTGTCTGTTGAGTTTGATAAAAACGGTACTGCAATCAGCCTGGAAGAAAAACCGTTACAACCAAAAAGTAAT
TATGCGGTAACCGGGCTTTATTTCTATGATAACTACGTTGTGGAAATGGCGAAAAATCTTAAGCCTTCTGCCCGC
GGTGAACCTGGAATTAACCGATATTAACCGTATCTATATGGAACAGGGGCATTTATCTGTTGCCATGATGGGACGT
GGATATGCCTGGCTGGACACGGGGACACATCAAAGTCTTATTGAAGCAAGCAACTTCATTGCCACCATTGAAGAG
CGCCAGGGCTTGAAAGTTTCTGCCCCGGAAGAAATTGCTTACCGTAAAGGGTTTATTGATGCTGAGCAGGTGAAA
GTATTAGCTAAACCGCTGAAAAAAATGCTTATGGTCAGTATCTGCTAAAAATGATTAAGGTTATTAATAAAAAT
GAATGTTATTAACAGAAATTCAGATGTACTGATTTTTGAACCGAAAGTTTTTGGTGATGAGCGTGGTTTCTT
TATGAAAGCTTTAATCAGAAAGTTTTCGAAGAGGCTGTAGGGCGGAAGGTTGAATTTGTTTCTGAGATAATCATT
TAAATCGTGTAAGGTGTACTTAGAGGTTTACACTTTCAGCTTCTCCCTTTGAGCAGGCAAAATTAGTAAGGTG
TATAGTTGGCGAGGTATTTGATGTTGCAGTAGACATTAGACCTAATTCTGAAACATTTGGTTTATGGGTTGGAGT
AACTCTTTCGTGAGAAAATAAAGGAGCTATGGATCCAGAAGGATTCGCCCATGGTTTTTAACTTTAAGTGA
TATTGCAGAGTTTGTTTATAAACTAACAATATTATCTTTAAATCATGAAAGGGGAGTCATTTGGAACGATGA
GAAATTAACATTGCCTGGCCCTCTCAATCAGAGAAGATTCTGTCACAGAAAGATATTAATTTACCATCATTTAG
ATTTGTTCAAATGTTTAGCAAGTAGTGTATCTTTACTGACATAGTCATCATTTTTTATGCTTTAAGTAAAT
TATATTGCACATCTATAACACAAAGCGCAATAATATTTGACCTGATGAAGGTTTGTGGTTATTTATCTTTCTAG
GCGTTTTTTATGACTAAAATAGTTGTGGTTTCTACAGCTCCAATATTCGCCACAAATAATGGGTACAAAAGTTCT
GTATTAGGAAGAATTGATGAGTTATTAATGAGGATAATGAGGTCGTTTTGATTGAAATAAACCTTGAAAATGTT
ACGGAAAAGAAAGATGAATTAATACCAACAAGATTTAATAATATTCAAAGATATGAAGTAAAAAAATATCTAGA
TCATTTATTTGCCGAGTTACAAATATTTATTTGATATCAGAACTCGGTATGAACAATATTTTCTTCTGCTGACATT
AGAGATAACATAAAAAAGATAATTTAGTAAACCTTCTATTATTATTGCTGAGTCTATATGGGCGTTGCAA
GCATTGCCTATTGAAATTAGTGCAGAAATACACTGTGTTATTCATGATGTGGCAACTGATTTCTTTAAAGAAATG
TTTGTATCTCATAATGAGGTTGTACGAAAAATTTTGTTTTTTAATGATTACCTAAAGTTGAAAATTAAGGAA
AATATTATCAAACGTTTGTAGAGTTGAGCAATTTATCTTTCTGACAGAGAAGATAAATGTTGGTATAAAACAAGA
TACAATATTGATGAGGTTGTTGTTCTTAGCGAGCAATCATCTTTATGTAGAAAAGATTAAGAGAACTATCAAT
TTCCAAACCCCTTCTGCTTATTTCCCGGTAGCATTGAATTTTACAAAATTTTACGGCTTAAATGGTTTATA
AAAAATATATATCTGGATTAAATAGGAAAAAAGAATAGTTGTAACAGGAAAGGCATCAGATAAAAAATAAAG
ATGTTAAACTGTGGAGAGGAAATACCTTTACGGGAGAGCTTGACTTTTCCACATATAATAAACTTAGCTCAACA
TGCTTGTGTGTTATTGCACCGATTACAACGGGCACTGGAATTTAAATAAAAATATTAGAAGCTGTACAAAAGGT
ATTCCTGTACTTACAACAAAATTTGCTTCAAAGGAATATGTTCCGATTTATGTTTTTATTTGCGAGGAGGATACT
GACACAACTTTGTCAATTTAATTAACAGTTTTCTTGAACGACATTAAGAGTCCAAGAATGAATTTATTGCTTT
TTTCAGTCTTGCCTTTGGTTAATATTGGCTTTGGCCATAATAATAAAAGTGGAGATTAACGCATACTTAA
TGTTTTTCTCGTGGTCTAATGGTATTAATATCAGGGCTGCGTATGAATGATAGTGATTATATCGAATACAGGA
AAATGTATAATGAAGTGCCTATTTTATGTGACTTTAGTCTCGCATCTATAAGGATATACATGGGAGGTAGGCT
ATCTATTCTTATCATCAATCTTTAAACTTTATGCTTGCATTTCAATTTATTTCTTTTTTTATGCTTTTTTAT

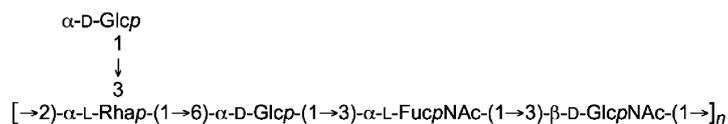
CACTCCTGCTTACATATTTTTATTTCAGAAAAATAAGTTAATACCGATACTATCGTTAGTTTTTTATTTAAGCC
 ATGCTTTTATAGTTAGAGATTTGATTCAAATTAGGGCAGGATTAGCTGTTAGCATATCATTATATTTCAATAATTA
 AATTTAAAGGAAATAAAAGTATAATTACAGGAGTTTTATTGCTTCTTTGATTCAATCTGGGGCCTTATTATTG
 CTCTTTGTTATCCTTTTTTCAAAAAAATACATAACATTAATAATGATGTTGTTTTATTTTTAGTGTCAATTA
 TTTTTTCTATTTGAATGGGCTTAATTTATCGATACAACTCTTATCTCAATATAGTTTCTTCCAACGCAATTT
 CGAATTATGTTGGTGGGAAGAAATATGATTATCGGGTGAATATTTACTAATCCGGTTTTTATTAAGGTGTTT
 TTTAATTGCTTAATGCACAAATATGACTTTCAGATATTAATAATGAGAAATATAGTGCTTTATAACTTAT
 ATGTTTTAGGTGATTAGCTATGGTTGCATTGAGTGGGATGGCTATTCTTTCAGGCCGCTTTTCATCCTTTCTGA
 CACTAGGTGAAAGCATTTTAATTGTATATGCTCTGTTCTACAAAAGAAATACACCTCTGGCGTTTCTAATTTTTT
 CTTTTTAAACAATTGTGCAATTAGGATATGATCTATTTATTTCTAATGTGCATCCTGAGCTTACTCTGATTATAT
 TTGGGTGAATCTAAGTAAAAATAATAAATAGGCATACTTATCTCTAAAATACAAAATCTTGGACCTGTGAATG
 TAGTACGAGGATTGATAAAAGAAAATAAAAAATATGCTTTTACTGTTTTTGTTTAAACAATAGCGTAGATAAAA
 ATATATATGATGAGTTATGCTGTTTAGGAGCCAAGGTTATATTAATACCAGATGGTACTTGGTTCAGCAAAATTT
 TATTTGTGAGAAGTTTTTAAAGGAACATCCACATAATATCTTACATTCACATGGGATCACGGCCGATATGTTTT
 CTTACTTTCTGAATGGCGTAAAAATATCTACTATTCAATAGACTAGATGAGGATTATATCCCATTATTTGGCG
 CGGTAAAGGGAATGCTATATATATCTTCATCGTTTTATATTACGAAGATTTAATCATATCGTTGCTTGCTCAG
 CAGCGTCCAATCAAACTGAAACAATCGAAAGTAAAACTAAAAATAACCACCATCCAGAATGGGATTGATATAA
 CTAGGTTTAAGACACTTGAGTCTGATAAAAAAAATTTATTGAGGGAAAAACACGGATTTGATAGTGAAAAAGAA
 TATTTATATATTTGGCTCGTTATCATTAAAGGAAAAATATTGCTTACCTCTTGGAACACTTAGCCATCGAAGAAA
 ATGATATATTTTAAATCTAGGTGATGGTGAACTTTTTAGATATTGTAAGGATAAAATATTCTAAAGATTTACGGT
 ATATATTTATGGGAAAGTTGAATGCCCTCTTGAATATTATCAATTATCAGATATTTTTGTTCCGCTTCTTTAT
 CGGAAGGGCTCCCCTTGGCACTATTAGAAGCTGCCTCTACTGGGTGCTATTTATATGTTAGCGATATAGAGCCCC
 ATAGAGAAATTCATCTCTATTAGGAGAGGAAAATATTTCTATGTTTAAAATTAAGGATGGATCATATAATTATT
 TGCAACCTAAAATAAAAAAGCTGACTATAACGCTCTTTCTGACGATAAACTTTACAATATATCCGATAAAAAAA
 TGTCAAATCTTTATGACAAACTTTTTGTTCTTTATTAGAGCAGAGGCACTAATATAATGATTTATGTTTCGGTA
 ATTTCTCATGGTCATTTCAAACCTCTTAAGGAATTAGGAGCAGTATCAAAATTAATAATCACAGCAGAATTA
 GTTATCATCAAAGATAATTTAGGAGAGAGCGAGCTTTTGGATTTTGTGAGGAAAAACAAAATAACTTATTTAAGG
 TCTAAAGAGAAAAAGGATTTGGAGAGAATAATAATGAAGTTTTTCCCTCTATATCCTCCTAATTACTAAGGAA
 GATTTTTTTGTGGTTATGAATCCTGATATATATATTGAGTGCCTGATCTATTAGATGTCTGATAGTGTGGT
 TCAGCGAATGTTAATCTAGCAACGATAAATTTATACAGGGATTTTGATAAAAAACATATGATAACTCAGTAAGG
 AAATTTCCCTCGGCAATTGATTTTTTTATGTCATTTTTATTTAAGAAAAATGACTGTGTAGTAAATAAGAACAAA
 ATAACGAAACCAACATATGTTGATTGGGCTGCAGGTTCTTTTCTAATATTTAATGCCTTCTTTTATTCAAACCTC
 AACGGATTCAACGAAAAGTATTTTATGTATTGCGAAGATATTGATATATGTTGGCGAGCTAAAAACACTTCAAT
 ACTTCAGTTTTTATACTATCCATGCTATGCAGCAATTCATTTGGCACAATTTAACAATCGTAGGATTTTTAGTAGA
 CATTTTCAATTTGGCATATAAAAGTATTATCCTTTTTTATTATATAAAAAATGGTATGCTGCGTTCTAGTAAGTTG
 CTTTAAATGCTAATATTTCTTTAAGAGGTGAGAATGATACCTGTTATTTTGGCTGGTGGTTCGGGAAGTCGCTTGT
 GGCCACTTTCACGAGAAAAGTTCCCAAGCAGTTTTTAAAGTTGACTGGCAGTTTGACAATGTTGCAGTCAACAT
 TGTACAGTCTTAATAATTTAATGCTGATGATTCAATAGTTATATGCAACGAAGAGCATAGATTTATTGTTGCAG
 AACAATTAAGAGAGTTAGGCAAACTTTCAAATAACATTTATCTTGAACCCAAAGGTCGTAATACAGCCCCGCTA
 TAACACTCGCAGCATTAGCAGCAAAAAGAAAATTCGCTGATGAAGATCCATTGATTCTTATTTTAGCTGCAGATC

ACAACATCCAAGACGAACATGTTTTCTGTGAGGCAATTAATAAGGCGTCATCTTTAGCTAGTTATGGAAAACCTAG
TGACTTTTGGTATCGTTCATTCAAACCTGAAACTGGGTATGGCTATATTCGTCGCGGTGATGAAGTGCCTGTAG
ATGAGCAGCATGCGGTGGCCTTTGAAGTGGCGCAGTTTGTGCGAAAAACCGAATCTGGAACCCGCGCAGGCTATG
TGGCAAGCGGCAATATTACTGGAACAGCGGTATGTTCTGTCCGTGCCGACGCTATCTCGAAGAAGTAAAA
AGTATCGTCCGGATATTCTCGATGCCTGTGAAAAAGCGATGAGCGCCGTGCATCCGGATCTCGATTTTATTTCGTG
TGGATGAAGAGGCGTTTCTCGCTTGTCCGGAAGAGTGGTGGATTACGCGGTGCATGGAATGCACGGCAGATGCCG
TTGTGGTGCCGATGGATGCGGGCTGGAGCGATGTCGGTTCCTGGTCTTCATTATGGGAGATCAGCGCCACACCCG
CCGAGGGCAACGTTTGGCCAGGCGATGTGATTAATCACAAAAGTAAAAACAGCTATGTGTACGCCGAATCTGGCC
TGGTCAACCCGTCGGGGTGAAGATTTGGTGGTAGTGCAGACCAAAGATGCAGTGTGATTGCCGACCGTAATG
CGGTGCAGGATGTGAAGAAAGTGGTGCAGCAGATCAAAGCTGATGGTCCGCATGAGCATCGGGTGCATCGCGAAG
TGTATCGTCCGTGGGGCAAATATGACTCTATCGACGCGGGCGACCCGTACCAGGTGAAACGCATCACCGTGAAC
CGGGCAAGGTTTGTCCGTACAGATGCATTATCATCGCGCGGAACACTGGGTGGTTGTCCGCGGAACGGCAAAAG
TCACTATCAACGGTATATCAAACCTGCTTGGTAAAAACGAGTCCATTTATATTCGCTGGGGGCGATGCACTGCC
TGGAAAACCCGGGAAATAGATTTAGAATTAATTGAAGTTCCGCTCTGGTGCATATCTTGAAAGAGATGATGTTA
TTAGATGTTATGATCGCTATGGACGAAAGTAATATATAATAATTTATTTAGAAATGATAAATTATAAGTT
TTTCGTCTGATAAAACAATAGATAGTATGGGTGGAAAATATGAGTTCCTTAACTTGTTTTAAAGCTTACGACATT
CGCGGGAAATTAGGTGAAGAACTGAATGAAGATATCGCCTGGCGCATGGTCCGCGCTATGGCGAATTTCTCAA
CCGAAAACCATGTGTAGGCGGTGATGTCCTCACCAGCGAAACCTTAAACTGGCGCTGGCAAAGGTTTAC
CAGGATGCGGGCGTCGATGTGCTGGATATTGGCATGTCCGGCACCGAAGAGATTTATTTCCGCACGTTCCATCTC
GGCGTGGATGGCGGCATTGAAGTTACCGCCAGCCATAATCCGATGGATTACAACGGCATGAAGCTGGTGCAGGAA
GGGGCTCGCCCGATCAGCGGTGATACCGGACTGCGCGACGTCACGCGTCTGGCAGAAGCTAACGACTTTCTCC
GTGATGAAACCAAACGCGGTGCTATCAGCAAATCAATCTGCGTGACGCTTACGTTGATCACCTGTTCCGGTTAT
ATCAATGTCAAACCTTACGCCGCTCAAGCTGGTATCAACTCCGGGAATGGCGCAGCGGGTCCGGTGGTGGAC
GCTATCGAAGCCCGCTTAAAGCCCTCGGCGCACCGGTGGAGTTAATCAAAGTGCATAACACGCCGACGGCAAT
TTCCCCAACGTTATTCTAACCCGTTGCTGCCGGAATGTCGCGACGACCCCGCAATGCGGTGCATCAAACACGGC
GCGGATATGGGCATTGCTTTGATGGCGATTTTGACCGCTGTTTCTGTTTACGAAAAGGGCAGTTTATTGAG
GGTACTACATTGTCGGCCTGCTGGCAGAAGCGTTCCTCGAAAAAATCCCGCGCGAAGATCATCCACGATCCA
CGTCTCTCTGGAACACCATTTGATGTGGTGACGGCCGCGGGCGGCACGCGGTGATGTCGAAAACAGGACACGCC
TTTATTAAAGAACGATGCGCAAGGAAGACGCCATCTACGGTGGCGAAATGAGCGCTCACCATTACTTCCGCGAT
TTCGCTTACTGTGACAGCGGCATGATCCCGTGGCTGCTGGTCCGCGAACTGGTGTGCCTGAAAGGAAAAACGCTG
GGCGAACTGGTGCAGCACCAGGATGGCGGCGTTTCCGGCAAGCGGTGAGATCAACAGAAAAGTGGCGCACCCCTGTT
GAGGCGATTAACCGCGTGAACAGCATTTTAGCCGTGAGGTGCTGGCGGTGGATCGCACCGATGGCATCAGCATG
ACCTTTGCCGACTGGCGCTTTAACCTGCGCTCTTCAAACCCGAACCGGTGGTGCGCCTGAATGTGGAATCTCGC
GGTATGTTTACAGTTATGGTAATCCATACTCAAGAAATATTATCAATTTTACGTCATAAAGAATAAGCCCTGAC
AAGTTAGGGCTTAATTAATATATATTTTTTTTTGAATTTGGGATTTGTGGTAAGATTTTAAATATGTTATTTAATG
TGGTTGAATTAATGTTGACTGGAAAATAATAATGAGAACGAAAAAGCATTACACAACCTTAAAGTTGATTTATT
AATTACTTTTTTATTGGTTTTGCTAGGGTTTTATATTCGAACTGTTTTTGTTCAAAAATGGGAAGTATATTAC
TGGAGTATGTTACTATTACACAGTTGACAGCATATCTCAATTTGGCAGAATTAGGTATTGGAATTGCAGCTGC
CAGCGTATTATATAAACCGCTCAGCGAGAATGAATACAATAAAATAACTTACATAATATCTTTGCTCTCAGTCAT
ATACAAATATATATTTGTGTTTTGTTTTGATTTCTGGCGTTGTTATAGGTATCTGTATTTATTACTTTATTGATTC

TGTAAAGGTTGTAATGGCGTTTTTTTATATTGGGCTTTGTTTCGTTTTTAATACATCGTTGACATATAGTTATGC
TAAATACTCCACATTATTAAGTCTAATCAGCGGTAAGTACTCAGCAGTAAGAAAAATCAAGGTGGCGAAAAAGTTAT
AATAATGTATTTAGATATTAATTTTGTGCTTACGCAAAGTTTCATACTTTATTTGTAGTTGAGACTTTAGG
TATTTTTCTCAATATTTGATTTTTAAAAATAAATGGGAACGGAAATCAATATCTCAGTAATGAGGTTTTACT
TATTGAAAGCGATAAACTTTTGATAAAAAAGAATTAATAAAGAATAAAAAATATGTTCTTCCATAAAATAGG
TGCTGTGCTTGTCTTAATACAGACTACCTGCTGTATCAAAGTTTCTGACATTAAGTTATGTGACAATTTTTGG
CAGCTATATGATGGTATTTTCAGATAGTAAGTGTGTTGATGTCAAGTTTTGTTAATGCTATTACTGCAGGAATGGG
TAATTACTTAATTAATAAAAAGTAATTTAGAAATTAAGGAAATACACGTCAATTTTATGTGATATTTATCGCCTT
TGCAACATTTCATATCACTAAATATGTTTTTTCTGTTAATGATTTTATCGCAAAATGGATAGGTGTTAATTATAC
ATTAAGTAACACCCTAGTTGCATTAATGATTTTAACTGATTCATTAGTGTGTCAGGGTACCTTCTGATATATT
AAAAACGCAAGTGGACATTTTGGTGATATTTATTTATCCATTTATAGAAGGTGTGCTGAATATTACGATATCCAT
CATTTTGGCTATCATTTATGGATTACCTGGCATTTATATAGGGACAATAGTATCTAACTTAATAGTAATAATGCT
TGCGAAACCATTATATCTTTACTCTAAGTTATTTAATCTTAGAAATCCGACGAGGGTTTTATTTGAATTTATTTCT
TCGGCTATGTTATATTCATTATGTGTGATTTGGGGTGAGCTATTTATGCGCGATGAAATATATTCATTTAAAGT
AAGTACATGGTTGGATTTTATTAACAAGCTACTCTTAGTCTCTACTCTAGCATATTTGGTAATATGTGCTATTTT
CTCTACGGATAGTGACTTTAGATTATTTTTCAGAAAAATATATATGTGATTATGAAGAAATAAAAAATTTTCGAAA
ATGTATTAATCGAAATTTATGCAACGAGCTTTATTTTTATAAATGATATGTGATCTTTTCGCGAATAGGAGTAAGG
ATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGA
GGATATTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATA
CTTATTTGCGAALCTTCAGGCGCGAGCATTCCAGCGCGGTGATCCLACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCALGC
AACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCG
TCTCTATTTTCAACCGTTCCTGAGAGACGGAAGAAGTATGCGGAAAATCCAGGCAAGAACTGGTTCCCTT
ACTATACGGTGAAGAGTTTGTGCAATCTCTGGAAACGCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAGCAGGTGCAG
GCACGGATGCTGCTATGATTCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATGATGGTGGTAACACCT
TCTTCCAGGACTATTCGTGTAATCGTGAGCTTTTCAGCAGAGGGCTTTAACTTCATCGGTACCGGTGTTTCTG
CGGTGAAGAGGGGGCGTGAAGGTCCTTCTATATGCTGCTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATGGTAGCAC
CGATCCTGACCAAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATGGTGCCGATGGCGCAG
GTCATATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTTCTCTGC
TTAAAGGTGGCTGAACCTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGAATAACGGTGAACCTGAGCA
GTTACCTGATCGACATCACCAAAAGATATCTTACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCC
TGATGAAGCGGCTAACAAAGTACCAGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCCGTGTCTGC
TGATTACCGAGTCTGTGTTTGCACGTTATATCTCTTCTGAAAGATCAGCGTGTGCGGCATCTAAAGTTCTCT
CTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCGACAAGGCTGAGTTTCATCGAAAAAGTTTCGTGCTGCGCTGATCTGGGCA
AAATCGTTTCTACGCCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGTGCTGCTGCTGAAGAGTACAACCTGGGATCTGAACTACG
GCGAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCTGCGAGAAAATCACCGATGCTTATG
CCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTAATCAAGCAAATTTCCGATGACTACCAGCAGGCGC
TGCGTGATGTGCTTGTATGTCAGTACAGAACGGTATTCGGTTCCGACCTTCTCCGCGAGGTTGCCTATTACG
ACAGCTACCGTGTGCTGTTCTGCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTGACTATTTTGGTGGCATACTTATA
AGCGTATTGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTA

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

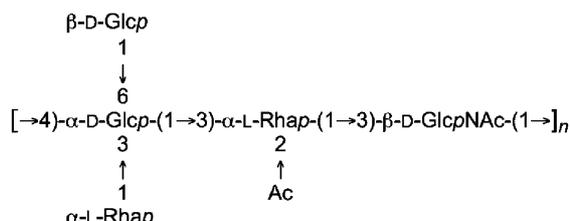
1. Биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем, где гликозилированный полисахаридный антиген O4 E.coli содержит структуру формулы (O4-Glc+)



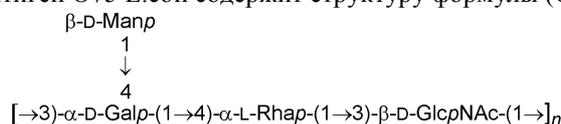
где n представляет собой целое число от 1 до 100.

2. Биоконъюгат по п.1, где n представляет собой целое число от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20.

3. Биоконъюгат по п.1 или 2, где гликозилированный полисахаридный антиген O4 E.coli ковалентно связан с остатком Asn в сайте гликозилирования, содержащем консенсусную последовательность глико-



(9) полисахаридный антиген O75 E.coli содержит структуру формулы (O75)



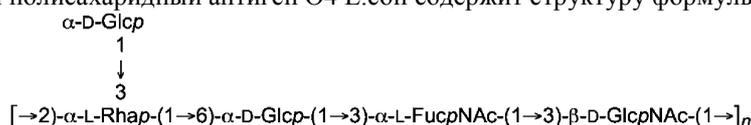
где каждый n независимо представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20.

8. Фармацевтическая композиция по п.7, где каждый белок-носитель представляет собой ЕРА, содержащий SEQ ID NO: 3.

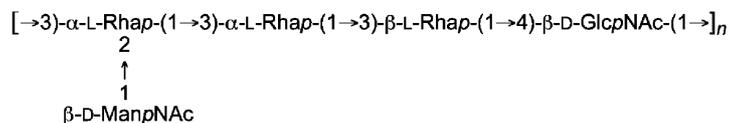
9. Фармацевтическая композиция по любому из пп.7 или 8, содержащая по меньшей мере полисахаридные антигены O1A, O2, гликозилированные полисахаридные антигены O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75 E.coli, каждый из которых ковалентно связан с белком-носителем.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая:

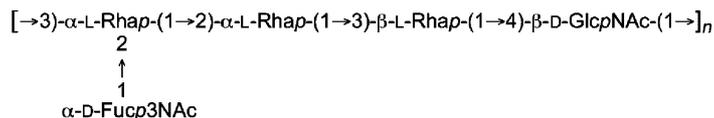
(1) биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 E.coli, ковалентно связанного с обезвреженным экзотоксином A P.aeruginosa (белком-носителем ЕРА-4), содержащим SEQ ID NO: 3, где гликозилированный полисахаридный антиген O4 E.coli содержит структуру формулы (O4-Glc+)



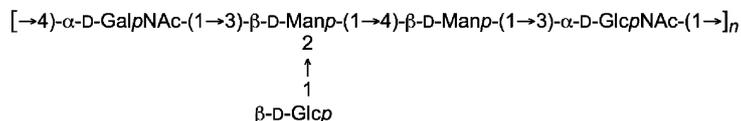
(2) биоконъюгат полисахаридного антигена O1A E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА-4, содержащим SEQ ID NO: 3, где полисахаридный антиген O1A E.coli содержит структуру формулы (O1A)



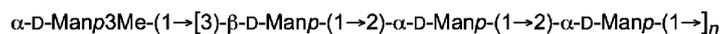
(3) биоконъюгат полисахаридного антигена O2 E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА-4, содержащим SEQ ID NO: 3, где полисахаридный антиген O2 E.coli содержит структуру формулы (O2)



(4) биоконъюгат полисахаридного антигена O6A E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА-4, содержащим SEQ ID NO: 3, где полисахаридный антиген O6A E.coli содержит структуру формулы (O6A)



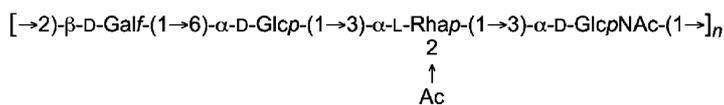
(5) биоконъюгат полисахаридного антигена O8 E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА-4, содержащим SEQ ID NO: 3, где полисахаридный антиген O8 E.coli содержит структуру формулы (O8)



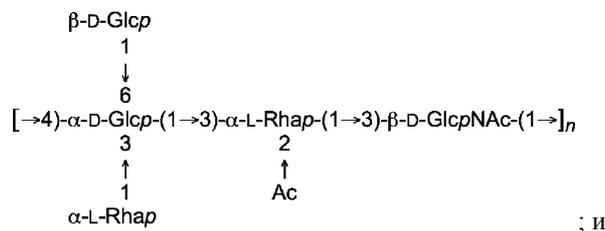
(6) биоконъюгат полисахаридного антигена O15 E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА-4, содержащим SEQ ID NO: 3, где полисахаридный антиген O15 E.coli содержит структуру формулы (O15)



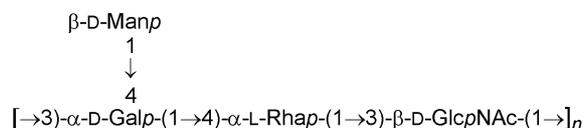
(7) биоконъюгат полисахаридного антигена O16 E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем ЕРА-4, содержащим SEQ ID NO: 3, где полисахаридный антиген O16 E.coli содержит структуру формулы (O16)



(8) биоконъюгат полисахаридного антигена O25B E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем ERA-4, содержащим SEQ ID NO: 3, где полисахаридный антиген O25B E.coli содержит структуру формулы (O25B)



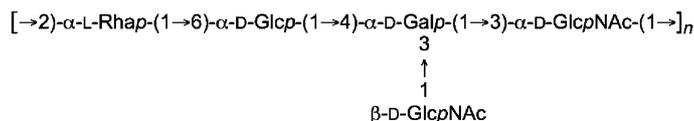
(9) биоконъюгат полисахаридного антигена O75 E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем ERA-4, содержащим SEQ ID NO: 3, где полисахаридный антиген O75 E.coli содержит структуру формулы (O75)



где каждый n независимо представляет собой целое число от 5 до 40.

11. Фармацевтическая композиция по п.10, дополнительно содержащая:

(10) биоконъюгат полисахаридного антигена O18A E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем ERA-4, содержащим SEQ ID NO: 3, где полисахаридный антиген O18A E.coli содержит структуру формулы (O18A)



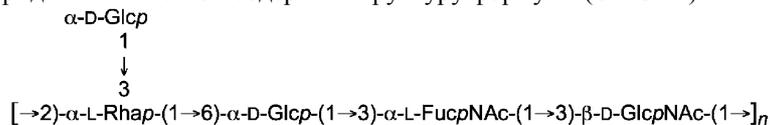
и n представляет собой целое число от 5 до 40.

12. Способ индукции у субъекта антител против гликозилированного антигена O4 E.coli, включающий введение субъекту биоконъюгата по любому из пп.1-4 или фармацевтической композиции по любому из пп. 5-11.

13. Способ вакцинации субъекта против E.coli, включающий введение субъекту биоконъюгата по любому из пп.1-4 или фармацевтической композиции по любому из пп.5-11.

14. Способ вакцинации по п.13, где указанная E.coli представляет собой внекишечную патогенную E.coli (ExPEC).

15. Рекombинантная прокариотическая клетка-хозяин для получения биоконъюгата гликозилированного полисахаридного антигена O4 E.coli, ковалентно связанного с белком-носителем, где гликозилированный полисахаридный антиген O4 содержит структуру формулы (O4-Glc+)



где n представляет собой целое число от 1 до 100, где клетка-хозяин содержит:

(1) нуклеотидную последовательность генного кластера gfb для полисахаридного антигена O4 E.coli;

(2) нуклеотидную последовательность, кодирующую гликозилтрансферазу, последовательность которой по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 4, где гликозилтрансфераза способна модифицировать полисахаридный антиген O4 E.coli с получением гликозилированного полисахаридного антигена O4 E.coli;

(3) нуклеотидные последовательности, кодирующие транслоказу и гликозилтрансферазу, последовательность которых по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 7 и 8, соответственно, где транслоказа способна транслоцировать бактопренол-связанную глюкозу, а гликозилтрансфераза способна гликозировать бактопренол;

(4) нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-носитель; и

(5) нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу, способную ковалентно связывать гликозилированный полисахаридный антиген O4 E.coli с белком-носителем с получением биоконъюгата.

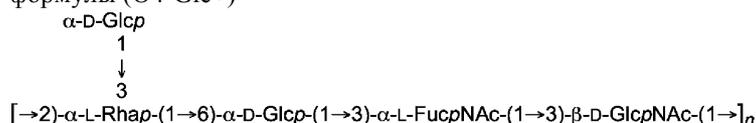
16. Рекombинантная прокариотическая клетка-хозяин по п.15, где гликозилтрансфераза имеет SEQ ID NO: 4;

олигосахарилтрансфераза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, предпочтительно имеющую SEQ ID NO: 6, содержащую аминокислотную мутацию N311V, более предпочтительно SEQ ID NO: 6, содержащую аминокислотные мутации Y77H и N311V; и

белок-носитель содержит по меньшей мере один сайт гликозилирования, содержащий консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 1, предпочтительно имеющую SEQ ID NO: 2, предпочтительно где белок-носитель представляет собой обезвреженный экзотоксин A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA), более предпочтительно где EPA содержит 1-10, предпочтительно 2-4 сайта гликозилирования, каждый из которых содержит консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 2, более предпочтительно где белок-носитель представляет собой EPA с четырьмя консенсусными последовательностями гликозилирования (EPA-4), более предпочтительно где белок-носитель содержит SEQ ID NO: 3.

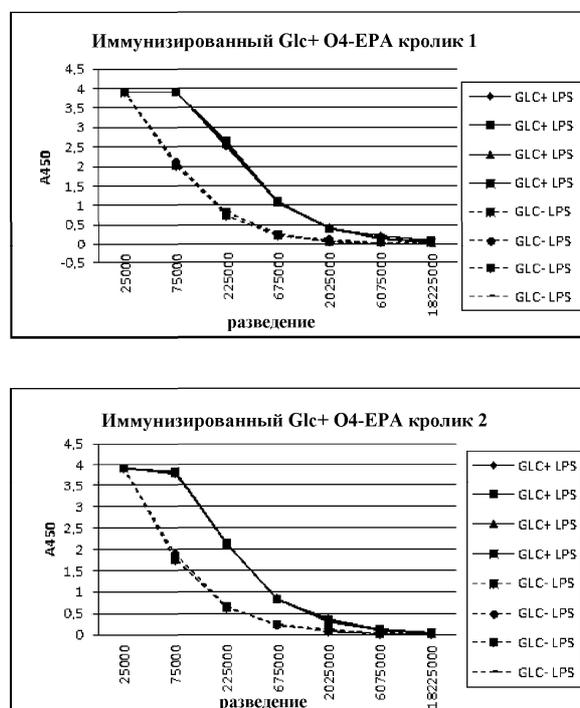
17. Рекombинантная прокариотическая клетка-хозяин по любому из пп.15 или 16, которая представляет собой клетку *E.coli*, например штамм *E.coli* K-12, такой как штамм W3110.

18. Способ получения биоконъюгата гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, где гликозилированный полисахаридный антиген O4 *E.coli* содержит структуру формулы (O4-Glc+)

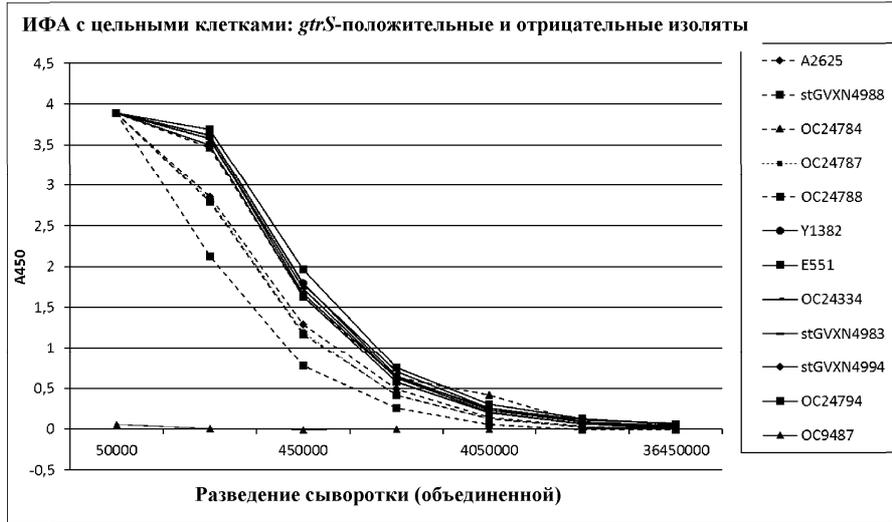


где n представляет собой целое число от 1 до 100, способ включает культивирование рекombинантной прокариотической клетки-хозяина по любому из пп.15-17 в условиях для продуцирования биоконъюгата.

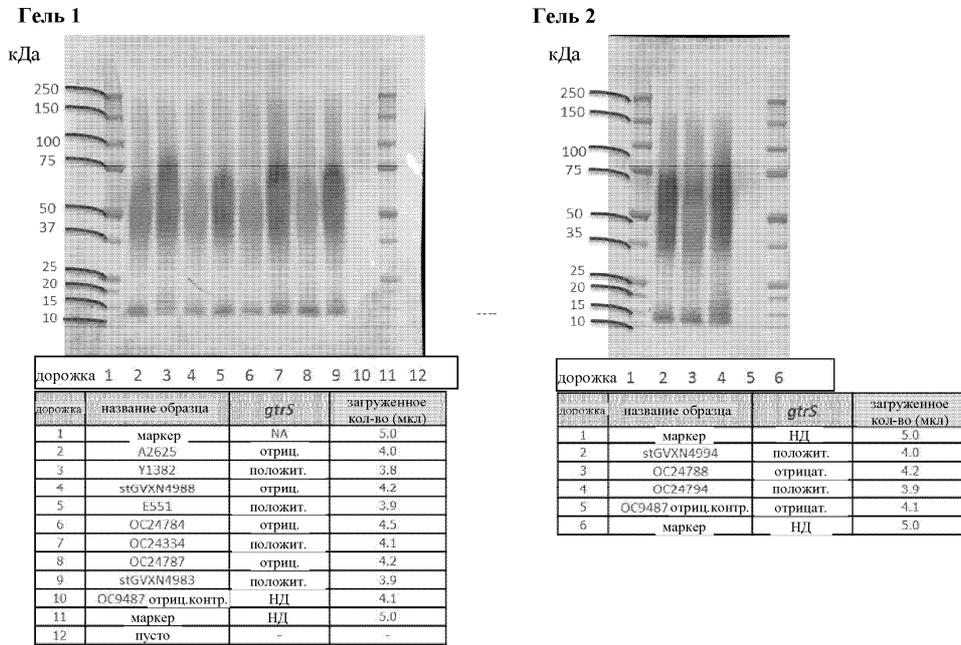
19. Композиция по любому из пп.10 или 11, где биоконъюгат полисахаридного антигена O25B присутствует в композиции в концентрации, которая приблизительно в 1,5-6 раз, например в 2-4 раза, выше, чем концентрация любого другого биоконъюгата, предпочтительно, где биоконъюгаты O1A:O2:гликозилированный O4:O6A:O8:O15:O16:O18A:O25B:O75 присутствуют в массовом соотношении полисахаридов 1:1:1:1:1:1:1:2:1 или 2:1:1:2:1:1:1:4:1 и предпочтительно где концентрация биоконъюгата полисахаридного антигена O25B составляет от 2 до 50 мкг/мл, предпочтительно от 8 до 40 мкг/мл, например от 16 до 32 мкг/мл.



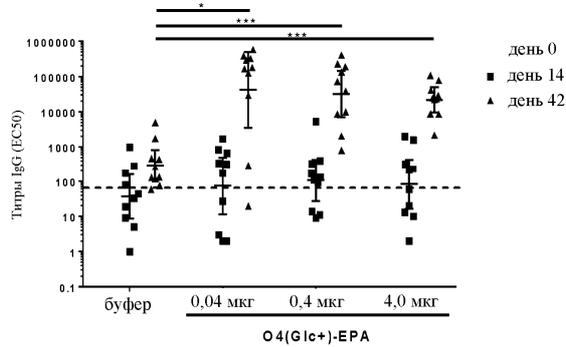
Фиг. 1



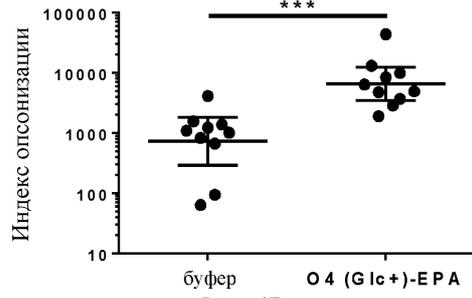
Фиг. 2



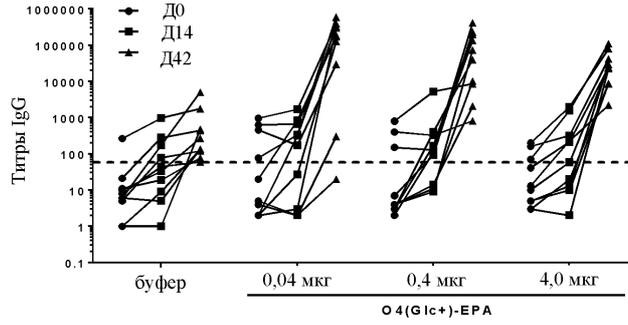
Фиг. 3



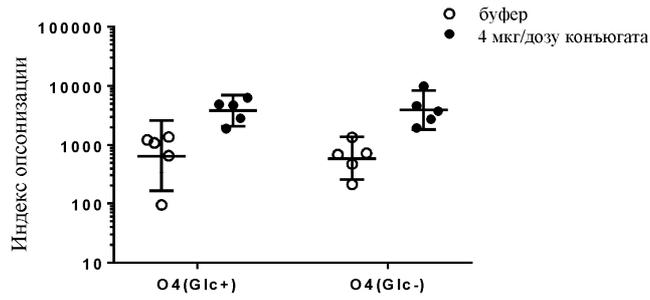
Фиг. 4А



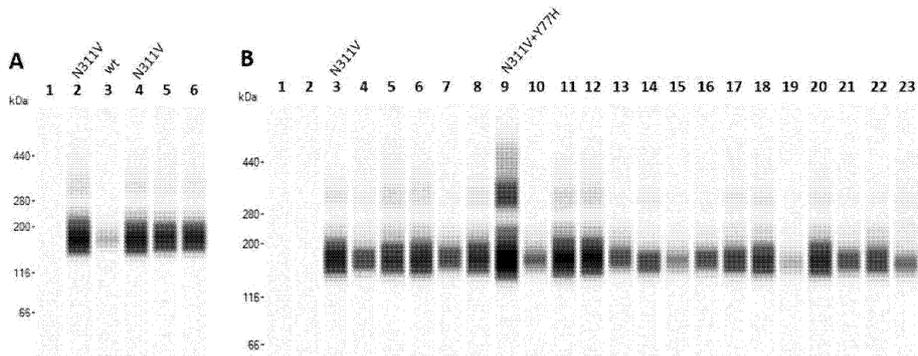
Фиг. 4В



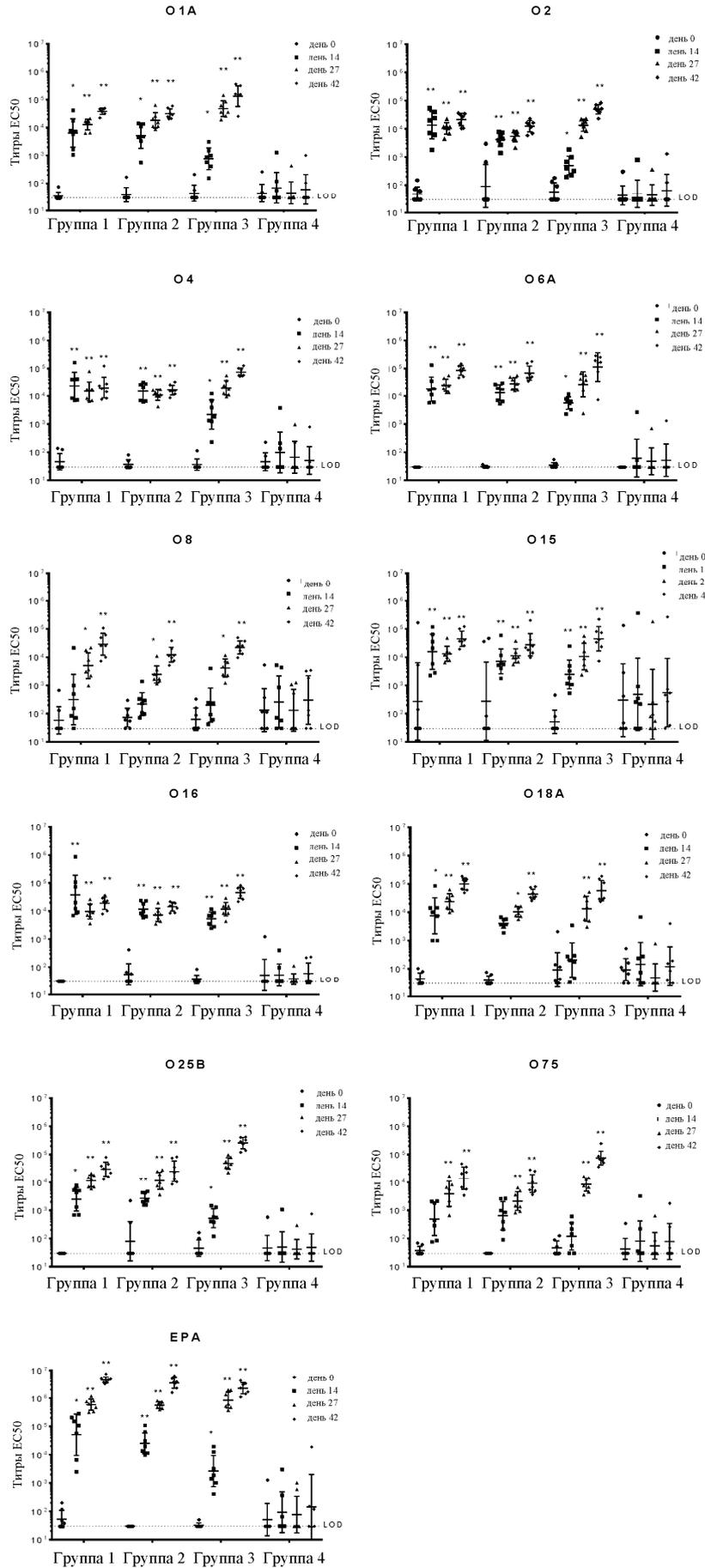
Фиг. 5



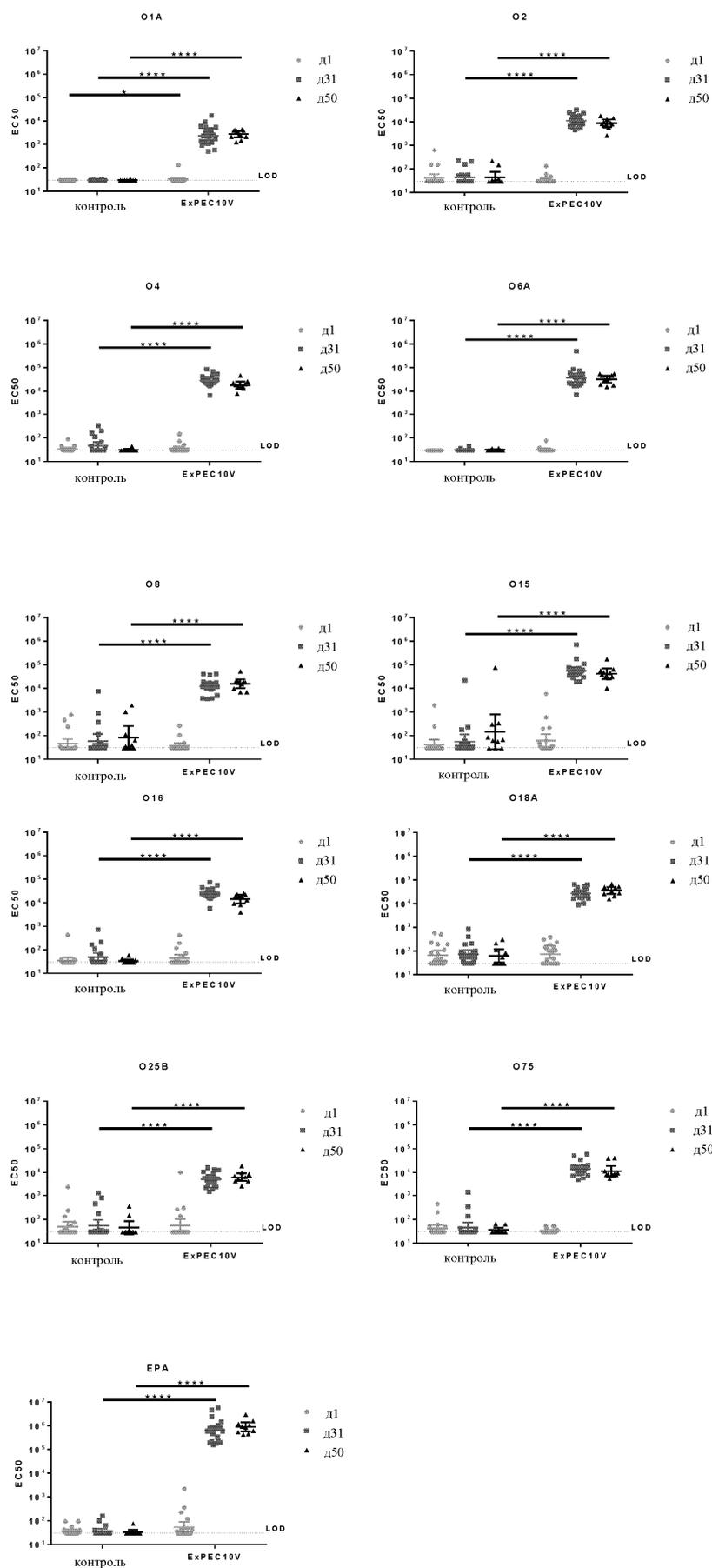
Фиг. 6



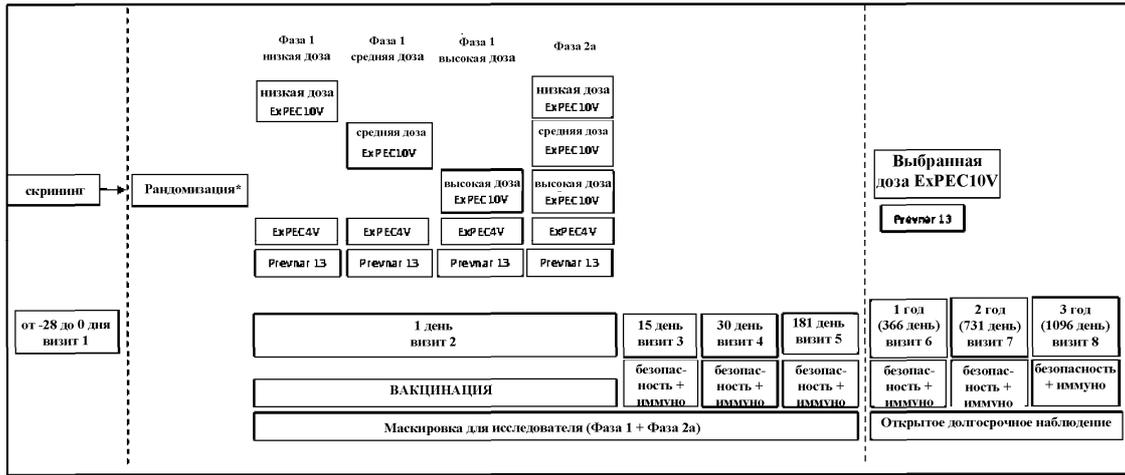
Фиг. 7



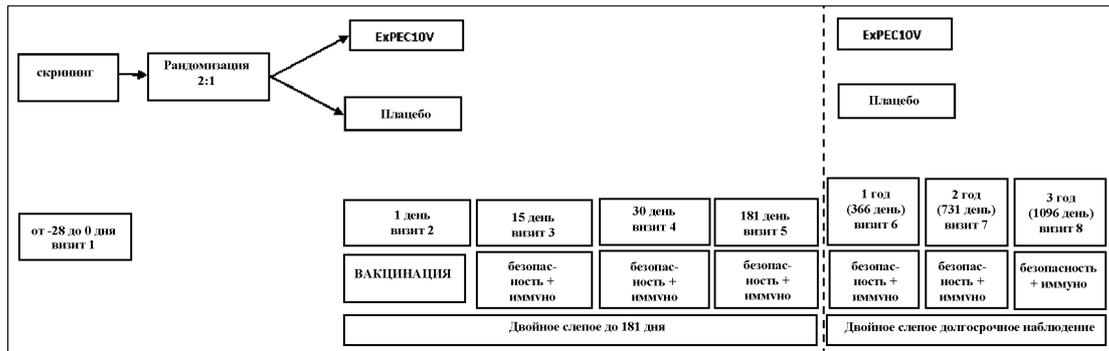
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10А



Фиг. 10В

