

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046636**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.04.01**

(51) Int. Cl. **C12N 9/10** (2006.01)  
**C12P 21/00** (2006.01)

(21) Номер заявки  
**202192392**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.03.18**

---

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

---

(31) **62/819,762**

(56) **WO-A1-2016107818**  
**WO-A1-2016107819**  
**WO-A1-2017035181**

(32) **2019.03.18**

(33) **US**

(43) **2022.02.09**

(86) **PCT/US2020/023415**

(87) **WO 2020/191088 2020.09.24**

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

(72) Изобретатель:  
**Гёртсен Ерун, Бюргаут Питер Ян,  
Верденбург Эвелине Марлен, Пулман  
Ян Тёнис, Фа Келлен Кристина,  
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)**

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

---

(57) Предложены способы получения биоконъюгатов полисахаридных О-антигенов, ковалентно связанных с белком-носителем, с применением рекомбинантных клеток-хозяев. Рекомбинантные клетки-хозяева, используемые в описанных способах, кодируют конкретный фермент олигосахарилтрансферазы в зависимости от продуцируемого биоконъюгата полисахаридного О-антигена. Ферменты олигосахарилтрансферазы могут представлять собой олигосахарилтрансферазу PglB или ее варианты. Также предложены композиции, содержащие биоконъюгаты, и способы применения биоконъюгатов и композиций, описанных в данном документе, для вакцинации субъекта против внекишечных патогенных E. coli (ExPEC).

---

**B1**

**046636**

**046636**

**B1**

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

В данной заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США № 62/819762, поданной 18 марта 2019 г., содержание которой включено в данный документ во всей полноте путем ссылки.

### Ссылка на перечень последовательностей, поданный в электронном виде

Изобретение содержит перечень последовательностей, поданный в электронном виде через EFS-Web в виде перечня последовательностей в формате ASCII в файле под названием "004852\_11612\_Sequence-Listing", созданного 11 марта 2020 г., размером 199 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 полисахарида 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  $\alpha$ -L-Rha (1->6)  $\alpha$ -D-Glc (1->3)  $\alpha$ -L-FucNAc (1->3)  $\beta$ -D-GlcNAc (1-> из штамма *E. coli* O4:K52 (Jann et al., Carbohydr. Res. (1993), v. 248, p. 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  $\alpha$ -D-Glc (1->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 полисахарида O-антигена. Конъюгированная 12-валентная вакцина с O-антигеном была синтезирована путем выделения и очистки полисахарида O-антигена и химической конъюгации с обезвреженным экзотоксином *A Pseudomonas aeruginosa* и протестирована на безопасность и иммуногенность в клиническом ис-

следовании 1 фазы (Cross et al., J. Infect. Dis. (1994) v.170, p. 834-40). Эта вакцина-кандидат никогда не была лицензирована для клинического применения. Недавно была разработана система биоконъюгирования в *E. coli*, в которой полисахарид антигена 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, p. 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), p. 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. Более того, эффективность получения множества компонентов для более сложных вакцинных композиций, охватывающих несколько серотипов, становится все более важной, и, следовательно, остается потребность в улучшении получения отдельных биоконъюгатов определенных O-антигенов.

### 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. Кроме того, в одном аспекте изобретения предложены клетки-хозяева и способы улучшенного получения биоконъюгатов определенных O-антигенов с применением вариантов олигосахарилтрансферазы (OST), основанные на преимуществах применения некоторых вариантов OST для биоконъюгатов некоторых O-антигенов *E. coli* серотип-зависимым образом, не поддающимся прогнозированию. Применение таких вариантов OST может в некоторых случаях также влиять на характер гликозилирования биоконъюгата, например, увеличивая относительное количество гликанов, связанных с белком-носителем, по сравнению с биоконъюгатами, полученными с использованием OST дикого типа или других вариантов, и, следовательно, новые биоконъюгаты, полученные такими способами, также являются аспектом изобретения.

В одном аспекте предложен способ получения биоконъюгата полисахаридного антигена O<sub>x</sub> *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, способ включает стадии:

(1) предоставления рекомбинантной клетки-хозяина, содержащей:

а) нуклеотидную последовательность кластера генов *gfb* для полисахарида O<sub>x</sub>-антигена;

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<sub>y</sub>; и

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

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O1A, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V;

когда O<sub>x</sub>-антиген представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотную мутацию N311V или аминокислотные мутации Y77H и N311V, а рекомбинантная клетка-хозяин дополнительно содержит последовательность, кодирующую глюкозилтрансферазу GtrS, последовательность которой по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 4, и которая способна модифицировать полисахаридный антиген O4 *E. coli* путем добавления глюкозы с получением гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, и нуклеотидную последовательность, кодирующую транслоказу GtrA и глюкозилтрансферазу GtrB, последовательность которых по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 7 и 8, соответственно, где транслоказа способна транслоцировать связанную с бактопренолом глюкозу, а глюкозилтрансфераза способна гликозилировать бактопренол;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O6A, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O8, PglB<sub>y</sub> не содержит аминокислотные мутации в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O15, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O16, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации Y77H, S80R, Q287P, K289R и N311V;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O18A, PglB<sub>y</sub> не содержит аминокис-

лотные мутации в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669; и

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O75, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотную мутацию N311V,

где в каждом случае аминокислотные мутации относятся к PglB<sub>y</sub> дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6,

где полисахаридные антигены O1A, гликозилированный O4, O6A, O8, O15, O16, O18A и O75 имеют структуры формул (O1A), (O4-Glc+), (O6A), (O8), (O15), (O16), (O18A) и (O75), соответственно, показанные в табл. 1, и 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.

В одном воплощении антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O1A, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В одном воплощении антиген O<sub>x</sub> представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, а PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотную мутацию N311V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В одном воплощении антиген O<sub>x</sub> представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, а PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации Y77H и N311V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В воплощениях, когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, рекомбинантная клетка-хозяин предпочтительно дополнительно содержит последовательность, кодирующую GtrS, последовательность которой по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 4, и нуклеотидные последовательности, кодирующие GtrA и GtrB, последовательности которых по меньшей мере на 80% идентичны SEQ ID NO: 7 и 8, соответственно.

В одном воплощении антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O6A, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В одном воплощении антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O8, PglB<sub>y</sub> не содержит аминокислотные мутации в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669 по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В одном воплощении антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O15, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В одном воплощении антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O16, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации Y77H, S80R, Q287P, K289R и N311V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В одном воплощении антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O18A, PglB<sub>y</sub> не содержит аминокислотные мутации в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669 по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В одном воплощении антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O75, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотную мутацию N311V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В конкретном аспекте предложен способ получения биоконъюгата полисахаридного антигена O<sub>x</sub> E. coli, ковалентно связанного с белком-носителем, способ включает стадии:

(1) предоставления рекомбинантной клетки-хозяина, содержащей:

а) нуклеотидную последовательность кластера генов gfb для полисахарида O<sub>x</sub>-антигена;

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<sub>y</sub>; и

(2) культивирования рекомбинантной клетки-хозяина в условиях для продуцирования биоконъюгата, где PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотную мутацию N311V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6,

где антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O1A, гликозилированный полисахаридный антиген O4, полисахаридный антиген O6A, полисахаридный антиген O15, полисахаридный антиген O16 или полисахаридный антиген O75, и когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, рекомбинантная клетка-хозяин дополнительно содержит последовательность, кодирующую гликозилтрансферазу GtrS, последовательность которой по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 4, и которая способна модифицировать полисахаридный антиген O4 E. coli путем добавления глюкозы с получением гликозилированного полисахаридного антигена O4 E. coli, и нуклеотидную последовательность, кодирующую транслоказу GtrA и гликозилтрансферазу GtrB, последовательности которых по меньшей мере на 80% идентичны SEQ ID NO: 7 и 8, соответственно, где транслоказа способна транслоцировать связанную с бактопреолом глюкозу, а гликозилтрансфераза способна

гликозилировать бактопренол, и

где полисахаридные антигены O1A, гликозилированный O4, O6A, O15, O16 и O75 имеют структуры формул (O1A), (O4-Glc+), (O6A), (O15), (O16) и (O75), соответственно, показанные в табл. 1, и 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.

В некоторых воплощениях способ дополнительно включает выделение биоконъюгата из рекомбинантной клетки-хозяина.

В некоторых воплощениях белок-носитель выбран из группы, состоящей из обезвреженного экзотоксина A *P. aeruginosa* (EPA), флагеллина *E. coli* (FHC), CRM197, 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 нетипируемого *Haemophilus influenzae*. В некоторых воплощениях белок-носитель представляет собой обезвреженный экзотоксин A *P. aeruginosa* (EPA). Предпочтительно белок-носитель EPA содержит 1-10, предпочтительно 2-4, более предпочтительно 4 сайта гликозилирования. В некоторых воплощениях каждый сайт гликозилирования содержит консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 2. В конкретном воплощении белок-носитель EPA содержит SEQ ID NO: 3.

В некоторых воплощениях рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой клетку *E. coli*, например, штамм *E. coli* K-12, такой как штамм W3110. В другом аспекте предложен биоконъюгат, полученный способом получения биоконъюгата полисахаридного антигена O<sub>x</sub>, ковалентно связанного с белком-носителем, описанным в данном документе.

В другом аспекте предложена композиция, содержащая такой биоконъюгат. В некоторых 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. В некоторых воплощениях композиция по изобретению содержит биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, где гликозилированный полисахаридный антиген O4 *E. coli* имеет структуру формулы (O4-Glc+), 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 композиция по изобретению дополнительно содержит по меньшей мере биоконъюгат полисахаридного антигена O25B *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, где полисахаридный антиген O25B имеет структуру формулы (O25B), показанную в табл. 1, а 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 композиция по изобретению дополнительно содержит по меньшей мере биоконъюгат полисахаридного антигена O2 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, где полисахаридный антиген O2 имеет структуру формулы (O2), показанную в табл. 1, а 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 композиция по изобретению содержит: (1) биоконъюгат полисахаридного антигена O1A *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем; (2) биоконъюгат полисахаридного антигена O2 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем; (3) биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем; (4) биоконъюгат полисахаридного антигена O6A *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем; (5) биоконъюгат полисахаридного антигена O8 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем; (6) биоконъюгат полисахаридного антигена O15 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем; (7) биоконъюгат полисахаридного антигена O16 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем; (8) биоконъюгат полисахаридного антигена O25B *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем и (9) биоконъюгат полисахаридного антигена O75 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, где полисахаридные антигены имеют структуры Формул структура каждой из формул O1A), (O2), (O4-Glc+), (O6A), (O8), (O15), (O16), (O25B) и (O75), соответственно, показанные в табл. 1, и 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. В некоторых воплощениях такая композиция дополнительно содержит: (10) биоконъюгат полисахаридного антигена O18A *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, где полисахаридный антиген O18A имеет структуру формулы (O18A), показанную в табл. 1, а 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 композиция по изобретению представляет собой иммуногенную композицию.

В другом аспекте предложен способ вакцинации субъекта против внекишечной патогенной *E. coli* (ExPEC), включающий введение субъекту такого биоконъюгата или композиции, которые описаны в данном документе. В других аспектах предложен такой биоконъюгат или композиция, которые описаны в данном документе, для применения в вакцинации против внекишечной патогенной *E. coli* (ExPEC).

В других аспектах предложены рекомбинантные клетки-хозяева для получения биоконъюгата полисахаридного антигена O<sub>x</sub> E. coli, ковалентно связанного с белком-носителем, рекомбинантная клетка-хозяин включает:

(а) нуклеотидную последовательность генного кластера *gfb* для полисахаридного антигена O<sub>x</sub>;

(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<sub>y</sub>, где: когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O1A, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V; когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотную мутацию N311V или аминокислотные мутации Y77H и N311V, а рекомбинантная клетка-хозяин дополнительно содержит последовательность, кодирующую гликозилтрансферазу GtrS, последовательность которой по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 4, и которая способна модифицировать полисахаридный антиген O4 E. coli путем добавления глюкозы с получением гликозилированного полисахаридного антигена O4 E. coli, и нуклеотидные последовательности, кодирующие транслоказу GtrA и гликозилтрансферазу GtrB, последовательности которых по меньшей мере на 80% идентичны SEQ ID NO: 7 и 8, соответственно, где транслоказа способна транслоцировать связанную с бактопренолом глюкозу, а гликозилтрансфераза способна гликозилировать бактопренол; когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O6A, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O6A, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O15, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O16, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации Y77H, S80R, Q287P, K289R и N311V;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O18A, PglB<sub>y</sub> не содержит аминокислотные мутации в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669; и

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O75, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотную мутацию N311V,

где в каждом случае аминокислотные мутации относятся к PglB<sub>y</sub> дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и

где полисахаридные антигены O1A, гликозилированный O4, O6A, O8, O15, O16, O18A и O75 имеют структуры формул (O1A), (O4-Glc+), (O6A), (O8), (O15), (O16), (O18A) и (O75), соответственно, показанные в табл. 1, и 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.

В некоторых воплощениях предложены такие клетки-хозяева, в которых антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O1A, а PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых воплощениях предложены рекомбинантные клетки-хозяева по изобретению, в которых антиген O<sub>x</sub> представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, а PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотную мутацию N311V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых воплощениях предложены рекомбинантные клетки-хозяева по изобретению, в которых антиген O<sub>x</sub> представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, а PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации Y77H и N311V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В воплощениях, когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, рекомбинантная клетка-хозяин предпочтительно дополнительно содержит последовательность, кодирующую GtrS, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и нуклеотидные последовательности, кодирующие GtrA и GtrB, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7 и 8 соответственно.

В некоторых воплощениях предложены рекомбинантные клетки-хозяева по изобретению, в которых антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O6A, а PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В некоторых воплощениях предложены рекомбинантные клетки-хозяева по изобретению, в которых антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O8, PglB<sub>y</sub> не содержит аминокислотные мутации в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669 по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В некоторых воплощениях предложены рекомбинантные клетки-хозяева по изобретению, в которых антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O15, а PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых воплощениях предложены рекомбинантные клетки-

хозяева по изобретению, в которых антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O16, а PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации Y77H, S80R, Q287P, K289R и N311V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В некоторых воплощениях предложены рекомбинантные клетки-хозяева по изобретению, в которых антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O18A, PglB<sub>y</sub> не содержит аминокислотные мутации в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669 по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В некоторых воплощениях предложены рекомбинантные клетки-хозяева по изобретению, в которых антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O75, а PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотную мутацию N311V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В некоторых воплощениях предложены рекомбинантные клетки-хозяева по изобретению, в которых белок-носитель выбран из группы, состоящей из обезвреженного экзотоксина A *P. aeruginosa* (EPA), флагеллина *E. coli* (FliC), CRM197, 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* (OMP) и белка D из нетипируемого *Haemophilus influenzae*. В некоторых воплощениях предложены рекомбинантные клетки-хозяева по изобретению, в которых белок-носитель представляет собой обезвреженный экзотоксин A *P. aeruginosa* (EPA). В некоторых воплощениях белок-носитель EPA содержит 1-10, предпочтительно 2-4, более предпочтительно 4 сайта гликозилирования. В некоторых воплощениях каждый сайт гликозилирования содержит консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 2. В некоторых воплощениях белок-носитель EPA содержит SEQ ID NO: 3.

В некоторых воплощениях предложены рекомбинантные клетки-хозяева по изобретению, где рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой клетку *E. coli*, например, штамм *E. coli* K-12, такой как штамм W3110.

В некоторых воплощениях клеток-хозяев и способов получения биоконъюгата гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем по изобретению, генный кластер *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 генный кластер *gfb* содержит SEQ ID NO: 9.

В некоторых воплощениях клеток-хозяев и способов получения биоконъюгата гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем по изобретению, 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%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, предпочтительно по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 4. В некоторых воплощениях гликозилтрансфераза содержит SEQ ID NO: 4.

В некоторых воплощениях клеток-хозяев и способов получения биоконъюгата гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем по изобретению, транслоказа, которая способна перемещать глюкозу, связанную с бактопреолом, и имеет последовательность, которая по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, предпочтительно по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 7. В некоторых воплощениях транслоказа содержит SEQ ID NO: 7.

В некоторых воплощениях клеток-хозяев и способов получения биоконъюгата гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем по изобретению, гликозилтрансфераза способна гликозировать бактопреол и имеет последовательность, которая по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, предпочтительно по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 8. В некоторых воплощениях гликозилтрансфераза содержит SEQ ID NO: 8.

#### **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. 1 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 (твердофазный иммуноферментный анализ) в четырех повторностях;

на фиг. 2 показаны титры IgG в ELISA с цельными клетками и объединенной сывороткой кроликов, иммунизированных биокоњугатом 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. 3 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. 4А и 4В показаны гуморальные ответы, индуцированные гликозилированными биокоњугатами O4 (O4-Glc+)-EPA; на фиг. 4А показаны уровни антител в сыворотке, измеренные методом ELISA на 0, 14 и 42 дни после иммунизации; показаны индивидуальные титры ( $\log_{10} EC_{50}$ ) и GMT (средний геометрический титр)  $\pm 95\%$  ДИ (доверительный интервал); серая пунктирная линия указывает порог, выше которого кривые разведения образцов описываются 4-параметрической логистической регрессионной моделью; на фиг. 4В показаны результаты опсонофагоцитарного анализа (ОПК) для определения функциональности антител в образцах сыворотки, полученных на 42 день после иммунизации биокоњугатом гликозилированного O4 (O4-Glc+)-EPA (4,0 мкг); критерий суммы рангов Вилкоксона и поправка Бонферрони; \*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $P \leq 0,0001$ ;

на фиг. 5 показан бустерный эффект гликозилированного биокоњугата 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 ( $\log_{10} EC_{50}$ ) 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 биокоњугатом O4-Glc+-EPA; крыс Спрег-Доули (Sprague Dawley) иммунизировали 3 раза внутримышечно буфером для приготовления композиции или биокоњугатом O4 (Glc+)-EPA в дозе 4,00 мкг/доза; функциональность антител определяли 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. 7 показаны электрофореграммы, по виду напоминающие блот, полученные при скрининге PglB при помощи капиллярного электрофореза с использованием моноклональных антител для детекции биокоњугата Q4-Glc+ в периплазматической фракции, позволяющие визуализировать продуцирование биокоњугата 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, wt - дикий тип. 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. 8 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  $EC_{50}$ ) 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. 9 показан гуморальный ответ, индуцированный ExPEC10V. Новозеландские белые кролики получали 3 внутримышечных иммунизации ExPEC10V (суммарно 105,6 мкг полисахарида) или 0,9% (мас./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. \* $P \leq 0,05$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ . LOD: предел обнаружения;

на фиг. 10 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 состоящий 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, от-

ветственный 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 "O-антиген", "полисахаридный O-антиген", "сахаридный O-антиген" и "OPS" относятся к O-антигену грамотрицательных бактерий. Обычно O-антиген представляет собой полимер иммуногенных повторяющихся полисахаридных единиц. В конкретном воплощении термины "O-антиген", "полисахаридный O-антиген" и "OPS" относятся к O-антигену *Escherichia coli*. Различные серотипы *E. coli* экспрессируют разные O-антигены. В *E. coli* продукты генов, участвующие в биогенезе O-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 O-антигена. Термин кластер *gfb* может применяться к любому кластеру биосинтеза O-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" относится 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 <sup>1</sup>
Негликозилированный полисахаридный	$[-\rightarrow 2)-\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 6)-\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 3)-\alpha\text{-L-FucpNAc-(1}\rightarrow 3)-\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow ]_n$

антиген O4 (O4-Glc-)	
Гликозилированный полисахаридный антиген O4 (O4-Glc+)	$\begin{array}{c} \alpha\text{-D-Glcp} \\ \downarrow \\ 1 \\ \downarrow \\ 3 \\ [\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-FucpNAc}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow ]_n \end{array}$
Полисахаридный антиген O1A (O1A)	$\begin{array}{c} [\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow ]_n \\ \uparrow \\ 2 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta\text{-D-ManpNAc} \end{array}$
Полисахаридный антиген O2 (O2)	$\begin{array}{c} [\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow ]_n \\ \uparrow \\ 2 \\ \uparrow \\ 1 \\ \alpha\text{-D-Fucp3NAc} \end{array}$
Полисахаридный антиген O6A (O6)	$\begin{array}{c} [\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpNAc}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Manp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Manp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow ]_n \\ \uparrow \\ 2 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta\text{-D-Glcp} \end{array}$
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)	$\begin{array}{c} [\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Galf}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow ]_n \\ \uparrow \\ 2 \\ \uparrow \\ \text{Ac} \end{array}$
Полисахаридный антиген O18A (O18A)	$\begin{array}{c} [\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow ]_n \\ \uparrow \\ 3 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta\text{-D-GlcpNAc} \end{array}$
Полисахаридный антиген O25B (O25B)	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Glcp} \\ \downarrow \\ 1 \\ \downarrow \\ 6 \\ [\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow ]_n \\ \uparrow \qquad \qquad \uparrow \\ 3 \qquad \qquad \qquad 2 \\ \uparrow \qquad \qquad \qquad \uparrow \\ 1 \qquad \qquad \qquad \text{Ac} \\ \alpha\text{-L-Rhap} \end{array}$
Полисахаридный антиген O75 (O75)	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Manp} \\ \downarrow \\ 1 \\ \downarrow \\ 4 \\ [\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow ]_n \end{array}$

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-О-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 О-антигена, относятся к биологической повторяющейся единице (BRU) О-антигена, поскольку он синтезируется *in vivo* клеточными механизмами (например, гликозилтрансферазами). Количество RU О-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 О-антигена может составлять 1-2. Структура каждого О-антигена, который конкретно описан в данном документе, показана содержащей одну RU с переменной "n", обозначающей количество RU. В каждом полисахаридном О-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 О-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 О-антигенов, содержащихся в композиции, имеет 5-40 повторяющихся единиц, но также могут содержаться некоторые полисахаридные О-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 О-антигеном, предпочтительно 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  $\pm 1$ ,  $\pm 5$  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, ClustaS 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) (TED)" 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 *E. 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 O-антигена. В частности, некоторые серотипы O4 экспрессируют модифицированный O-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-рамной 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<sup>n</sup>), 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 гликозилтрансферазу 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 гликозировать 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 клетка-хозяева, содержащие последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующую ген гликозилтрансферазы *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 гликозилтрансферазы (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 гликозилтрансферазы, 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* (FlhC), CRM197, мальтозосвязывающий белок (МВР), дифтерийный анатоксин, столбнячный анатоксин, обезвреженный гемолизин *A. S. aureus*, агглютинирующий фактор А, агглютинирующий фактор В, термолabileный энтеротоксин *E. coli*, обезвреженные варианты термолabileного 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 гликозировать 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 A P. aeruginosa (EPA). В литературе описаны различные обезвреженные варианты EPA, и их можно применять в качестве белков носителей. Например, обезвреживания можно достигать за счет мутации и делеции важных для каталитической активности остатков, таких как L552V и DE553 согласно Lukac et al., 1988, Infect Immun, 56: 3095-3098, и Ho et al., 2006, Hum Vaccin, 2:89-98. В данном описании "EPA" относится к обезвреженному экзотоксину A из P. aeruginosa. В тех воплощениях, где белок-носитель представляет собой EPA, 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 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, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В некоторых воплощениях белок-носитель EPA содержит четыре сайта гликозилирования, каждый из которых содержит консенсусную последовательность гликозилирования, например, сайт гликозилирования содержащий консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 2. Используемые в данном документе термины "белок-носитель EPA-4" и "EPA-4" относятся к белку-носителю, представляющему собой обезвреженный экзотоксин A 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 EPA, 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, EPA), описанным 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 EРА).

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 гликозидной связи ферментативно посредством аппарата клетки-хозяина. В некоторых воплощениях композиции, предложенные в данном документе, могут содержать 1-20 дополнительных гликоконъюгатов, более предпочтительно биоконъюгатов полисахаридных O-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 O-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 O-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 O-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, EРА.

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 биоконъю-



O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75 *E. coli*, предпочтительно биоконъюгаты полисахаридных антигенов O1A, O2, гликозилированного O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75, ковалентно связанных с белком-носителем (например, 10-валентная композиция). В настоящем документе также рассматриваются композиции, которые возможно дополнительно содержат дополнительные O-антигены (например, в выделенной форме или являющиеся частью гликоконъюгата или биоконъюгата) *E. coli* других серотипов.

В некоторых воплощениях каждый дополнительный полисахаридный антиген O1A, O2, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и/или O75 *E. coli* ковалентно связан с белком-носителем. Полисахаридный O-антиген может быть связан с белком-носителем химическими или другими способами синтеза, или полисахаридный O-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 A *P. aeruginosa* (EPA), флагеллин *E. coli* (FliC), CRM197, 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*, пассажирский домен 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 ограничиваются перечисленным. Предпочтительно, белок-носитель представляет собой EPA.

В некоторых воплощениях каждый из дополнительных полисахаридных антигенов *E. coli* O1A, O2, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и/или O75, 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 EPA-4, например, белок-носитель EPA-4, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В конкретном воплощении предложена композиция (например, фармацевтическая и/или иммуногенная композиция), содержащая: (1) биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем обезвреженным экзотоксином A *P. aeruginosa*, содержащим SEQ ID NO: 3 (белок-носитель EPA-4), где гликозилированный полисахаридный антиген O4 *E. coli* содержит структуру формулы (O4-Glc+); (2) биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O1A *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем EPA-4, где полисахаридный антиген O1A *E. coli* содержит структуру формулы (O1A); (3) биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O2 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем EPA-4, где полисахаридный антиген O2 *E. coli* содержит структуру формулы (O2); (4) биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O6A *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем EPA-4, где полисахаридный антиген O6A *E. coli* содержит структуру формулы (O6A); (5) биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O8 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем EPA-4, где полисахаридный антиген O8 *E. coli* содержит структуру формулы (O8); (6) биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O15 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем EPA-4, где полисахаридный антиген O15 *E. coli* содержит структуру формулы (O15); (7) биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O16 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем EPA-4, где полисахаридный антиген O16 *E. coli* содержит структуру формулы (O16); (8) биоконъюгат гликозилированного 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 гликозилированного полисахаридного антигена O75 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем EPA-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 EPA-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 при-

близительно 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 адъювант или вводятся в комбинации с адъювантом. Адъювант для введения в комбинации с композицией, описанной в данном документе, может вводиться до (например, за 72 ч, 48 ч, 24 ч, 12 ч, 6 ч, 2 ч, 1 ч, 10 мин), одновременно или после (например, через 72 ч, 48 ч, 24 ч, 12 ч, 6 ч, 2 ч, 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 B и/или T 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, монофосфориллипид A (MPL) или 3-де-O-ацилированный монофосфориллипид A (3D-MPL) (см., например, патент Великобритании GB2220211, EP0971739, EP1194166, US6491919), AS01, AS02, AS03 и AS04 (все GlaxoSmithKline; см., например, EP1126876, US7357936 для AS04, EP0671948, EP0761231, US5750110 для AS02), MF59 (Novartis), имидазопиридиновые соединения (см. WO2007/109812), соединения имидазохиноксалина (см. WO2007/109813), дельта-инулин, STNG-активирующие синтетические циклические динуклеотиды (например, US20150056224), комбинации лецитина и гомополимеров карбомера (например, US6676958) 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 A (см. Stoute et al., N. EngS. 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 A или его аналог или производное, такие как MPL, 3D-MPL, RC529 (например, EP1385541), PET-липид A, GLA (адъювант гликопираниозил липид, синтетический дисахаридный гликолипид; например, US20100310602, US8722064), 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)-PHAB (3D(6A)-PHAD) (PHAD, 3D-PHAD и 3D(6A)PHAD являются синтетическими вариантами липида A, см., например, [avantilipids.com/divisions/adjuvants](http://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, интраназального, интраклеточного, 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 за исключением человека, таких как обезьяны или человекообразные обезьяны, 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, имевший 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, имевший в анамнезе ИМП в течение последних двух лет. В некоторых воплощениях субъект представляет собой человека, имевший 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, имевший 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, ELISA (иммуноферментный анализ), иммуноанализы на основе электрохемилюминесценции (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, можно применять 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 О-антигеном ExPEC, можно исследовать, например, при помощи иммунологического анализа, такого как ELISA (см., например, Van den Dobbelen 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 опсонофагочитательного 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 О-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 О-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 антител, предпочтительно антител, обладающих опсонофагочитательной 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 О-антигены *E. coli* и биоконъюгаты, содержащие такие О-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 О-антигенов *E. coli* и/или их биоконъюгатов.

Для получения полисахаридных О-антигенов *E. coli*, описанных в данном документе (например, гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*) и биоконъюгатов, содержащих полисахаридные О-антигены *E. coli*, описанных в данном документе (например, биоконъюгата гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*) могут применяться любые клетки-хозяева, известные специали-

стам 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 О-антигенов *E. coli*, описанных в данном документе, и биоконъюгатов, содержащих описанные здесь полисахаридные О-антигены *E. coli*, включают виды *Escherichia*, виды *Shigella*, виды *Klebsiella*, виды *Xantomonas*, виды *Salmonella*, виды *Yersinia*, виды *Lactococcus*, виды *Lactohacillus*, 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 О-антигенов *E. coli*, описанных в данном документе, и биоконъюгатов, содержащих описанные здесь полисахаридные О-антигены *E. coli*, является прокариотической клеткой-хозяином и предпочтительно представляет собой *E. coli*. В некоторых воплощениях клетки-хозяева, используемые для получения полисахаридных О-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 О-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 О-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 О4 *E. coli*, полисахаридного антигена О1А, полисахаридного антигена О2, полисахаридного антигена О6А, полисахаридного антигена О8, полисахаридного антигена О15, полисахаридного антигена О16, полисахаридного антигена О18А, полисахаридного антигена О25В или полисахаридного антигена О75. Предложенные клетки-хозяева содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие ферменты (например, гликозилтрансферазы), способные продуцировать полисахаридный О-антиген *E. coli*. Клетки-хозяева, предложенные в данном документе, могут естественным образом экспрессировать нуклеиновые кислоты, которые способны продуцировать интересующий О-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 О4 *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 О4 *E. coli* (т.е. глюкозилтрансферазу, специфичную к полисахаридному антигену О4 *E. coli*), и, в частности, к L-Rha посредством  $\alpha$ -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 О4 *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 О4 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 О4 *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, связанную 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 прокариотическая 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 сконструированы 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 гликозилтрансферазу, 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 В *E. coli* (в качестве неограничивающего примера, штаммом В 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 гликозилтрансферазу, 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* В, 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 гликозилтрансферазу SEQ ID NO: 4 или гликозилтрансферазу, 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 бактопенрол-связанной глюкозы и бактопенрол-гликозилтрансферазы 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 технологии 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: PSos 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-производителях для биоконъюгатов с полисахаридными антигенами серотипов, раскрытых в дан-

ном 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 О-антигена, а также 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 О-антигена, чтобы обеспечить продукцию биоконъюгата интересующего О-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, PglI 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* (г.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 пред-

ложены способы получения биоконъюгатов специфических O-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* (Flc), CRM197, 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*, 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 непатогенного *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, содержащий 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 (гемагглютинино-

вые). 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 эндоксилаказы (XynA) *Bacillus* sp., термолabileного энтеротоксина LTIIb *E. coli*, эндоксилаказы 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 *waaL* (см., например, Feldman et al., 2005, PNAS USA 102: 3016-3021), кластер биосинтеза ядра липида A (*waa*), кластер галактозы (*gal*), кластер арабинозы (*ara*), кластер колановой кислоты (*wc*), кластер капсульного полисахарида, гены биосинтеза ундекапренола-р (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. Кодированный фермент переносит O-антиген, связанный с ундекапренилфосфатом (UPP), в ядро липида A, образуя липополисахарид. Делеция или разрушение эндогенного гена *waaL* (например, у штаммов ΔwaaL) 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 олигосахарилтрансферазу, 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*), последовательности которых по меньшей мере на 80% идентичны 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 *C. 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 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 посредством

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 (мас./мас.). 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 полисахарида 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 O-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 O-антигена. В некоторых воплощениях соотношение гликан/белок составляет от примерно 0,15 до примерно 0,45. В общем, более высокое соотношение гликан/белок полисахаридного O-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 O-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 O-антигенов, по меньшей мере 5 различных O-антигенов, по меньшей мере 6 различных O-антигенов, по меньшей мере 7 различных O-антигенов, по меньшей мере 8 различных O-антигенов, по меньшей мере 9 различных O-антигенов, по меньшей мере 10 различных O-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 O-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 O-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 O-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 O-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 некоторых воплощениях способ дополнительно включает выделение биоконъюгата из рекомбинантной клетки-хозяина. В одном конкретном воплощении, когда O-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 O-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 O-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 O-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 O-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 белок-носитель выбран из группы, состоящей из обезвреженного экзотоксина *A. P. aeruginosa* (EPA), флагеллина *E. coli* (FliC), CRM197, 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 некоторых воплощениях белок-носитель представляет собой обезвреженный экзотоксин *A. P. aeruginosa* (EPA). Предпочтительно белок-носитель EPA содержит 1-10, предпочтительно 2-4, более предпочтительно 4 сайта гликозилирования. Предпочтительно каждый сайт гликозилирования содержит консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 2. В конкретном воплощении клетка-хозяин содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-носитель EPA-4, содержащий SEQ ID NO: 3.

В некоторых воплощениях рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой клетку *E. coli*, например, штамм *E. coli* K-12, такой как штамм W3110. Также предложены биоконъюгаты полисахаридных O-антигенов, полученные с применением рекомбинантных клеток-хозяев, кодирующих ферменты олигосахарилтрансферазы из пар O-антиген/олигосахарилтрансфераза PglB, указанных выше. Также предложены композиции, содержащие такие биоконъюгаты. В некоторых 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.

В некоторых воплощениях биоконъюгаты полисахаридных O-антигенов, продуцируемые рекомбинантными клетками-хозяевами, кодирующими ферменты олигосахарилтрансферазы из пар O-антиген/олигосахарилтрансфераза PglB, указанных выше, предпочтительно имеют одну или несколько

предпочтительных характеристик, описанных в данном документе, например, соотношение гликан/белок и/или количество или соотношение мультигликозилированного белка-носителя.

Воплощения.

Воплощение 1 представляет собой способ получения биоконъюгата полисахаридного антигена O<sub>x</sub> E. coli, ковалентно связанного с белком-носителем, способ включает:

(1) получение рекомбинантной клетки-хозяина, содержащей:

а) нуклеотидную последовательность генного кластера *rfb* для полисахаридного антигена O<sub>x</sub>;

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<sub>y</sub>, и

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

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O1A, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотную мутацию N311V или аминокислотные мутации Y77H и N311V, а рекомбинантная клетка-хозяин дополнительно содержит последовательность, кодирующую глюкозилтрансферазу GtrS, последовательность которой по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 4, и которая способна модифицировать полисахаридный антиген O4 E. coli путем добавления глюкозы для получения гликозилированного полисахаридного антигена O4 E. coli, и нуклеотидные последовательности, кодирующую транслоказу GtrA и глюкозилтрансферазу GtrB, последовательности которых по меньшей мере на 80% идентичны SEQ ID NO: 7 и 8, соответственно, где транслоказа способна транслоцировать связанную с бактопренолом глюкозу, а глюкозилтрансфераза способна гликозилировать бактопренол;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O6A, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O8, PglB<sub>y</sub> не содержит аминокислотные мутации в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O15, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O16, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации Y77H, S80R, Q287P, K289R и N311V;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O18A, PglB<sub>y</sub> не содержит аминокислотные мутации в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669; и

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O75, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотную мутацию N311V,

где в каждом случае аминокислотные мутации относятся к PglB<sub>y</sub> дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и где полисахаридные антигены O1A, гликозилированный O4, O6A, O8, O15, O16, O18A и O75 имеют структуры формул (O1A), (O4-Glc+), (O6A), (O8), (O15), (O16), (O18A) и (O75), соответственно, показанные в табл. 1, и 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 2 представляет собой способ по воплощению 1, где антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O1A, а PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Воплощение 3 представляет собой способ по воплощению 1, где антиген O<sub>x</sub> представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, а PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотную мутацию N311V или аминокислотные мутации Y77H и N311V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. Воплощение 4 представляет собой способ по воплощению 3, где рекомбинантная клетка-хозяин дополнительно содержит последовательность, кодирующую GtrS, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и нуклеотидную последовательность, кодирующую GtrA и GtrB, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7 и 8 соответственно.

Воплощение 5 представляет собой способ по воплощению 1, где антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O6A, а PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Воплощение 6 представляет собой способ по воплощению 1, где антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O8, PglB<sub>y</sub> не содержит аминокислотные мутации в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669 по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Воплощение 7 представляет собой способ по воплощению 1, где антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O15, а PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V

по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Воплощение 8 представляет собой способ по воплощению 1, где антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O16, а PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации Y77H, S80R, Q287P, K289R и N311V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Воплощение 9 представляет собой способ по воплощению 1, где антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O18A, PglB<sub>y</sub> не содержит аминокислотные мутации в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669 по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Воплощение 10 представляет собой способ по воплощению 1, где антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O75, а PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотную мутацию N311V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Воплощение 11 представляет собой способ получения биоконъюгата полисахаридного антигена O<sub>x</sub> E. coli, ковалентно связанного с белком-носителем, способ включает стадии:

(1) получения рекомбинантной клетки-хозяина, содержащей:

(а) нуклеотидную последовательность генного кластера *gfb* для полисахаридного антигена O<sub>x</sub>;

(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<sub>y</sub>, и

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

где PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотную мутацию N311V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6,

где антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O1A, гликозилированный полисахаридный антиген O4, полисахаридный антиген O6A, полисахаридный антиген O15, полисахаридный антиген O16 или полисахаридный антиген O75, и когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, рекомбинантная клетка-хозяин дополнительно содержит последовательность, кодирующую гликозилтрансферазу GtrS, последовательность которой по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 4, и которая способна модифицировать полисахаридный антиген O4 E. coli путем добавления глюкозы для получения гликозилированного полисахаридного антигена O4 E. coli, и нуклеотидные последовательности, кодирующие транслоказу GtrA и гликозилтрансферазу GtrB, последовательности которых по меньшей мере на 80% идентичны SEQ ID NO: 7 и 8, соответственно, где транслоказа способна транслоцировать связанную с бактопренолом глюкозу, а гликозилтрансфераза способна гликозилировать бактопренол, и

где полисахаридные антигены O1A, гликозилированный O4, O6A, O15, O16 и O75 имеют структуры формул (O1A), (O4-Glc+), (O6A), (O15), (O16) и (O75), соответственно, показанные в табл. 1, и каждый из них 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 12 представляет собой способ по воплощению 11, дополнительно включающий выделение биоконъюгата из рекомбинантной клетки-хозяина. Воплощение 13 представляет собой способ по любому из воплощений 1-12, где белок-носитель выбран из группы, состоящей из обезвреженного экзотоксина A P. aeruginosa (EPA), флагеллина E. coli (FliC), CRM197, 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 14 представляет собой способ по воплощению 13, где белок-носитель представляет собой обезвреженный экзотоксин A Pseudomonas aeruginosa (EPA).

Воплощение 15 представляет собой способ по воплощению 14, где белок-носитель EPA содержит 1-10, предпочтительно 2-4, более предпочтительно 4 сайта гликозилирования.

Воплощение 16 представляет собой способ по воплощению 15, где каждый сайт гликозилирования содержит консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 2.

Воплощение 17 представляет собой способ по воплощению 16, где белок-носитель EPA содержит SEQ ID NO: 3.

Воплощение 18 представляет собой способ по любому из воплощений 1-17, где рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой клетку E. coli, например, штамм E. coli K-12, такой как штамм W3110.

Воплощение 19 представляет собой биоконъюгат, полученный способом по любому из воплощений 1-18.

Воплощение 20 представляет собой композицию, содержащую биоконъюгат по воплощению 19.

Воплощение 21 представляет собой композицию, содержащую по меньшей мере 2, предпочтительно по меньшей мере 3, более предпочтительно по меньшей мере 5, еще более предпочтительно по меньшей мере 7 биоконъюгатов по воплощению 19. Воплощение 22 представляет собой композицию по воплощению 20 или 21, содержащую биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 E. coli, ковалентно связанного с белком-носителем, где гликозилированный полисахаридный антиген O4 имеет структуру формулы (O4-Glc<sup>+</sup>), 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.

Воплощение 23 представляет собой композицию по любому из воплощений 20-22, дополнительно содержащую по меньшей мере биоконъюгат полисахаридного антигена O25B E. coli, ковалентно связанного с белком-носителем, где полисахаридный антиген O25B имеет структуру формулы (O25B), показанную в табл. 1, а 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 24 представляет собой композицию по любому из воплощений 20-23, дополнительно содержащую по меньшей мере биоконъюгат полисахаридного антигена O2 E. coli, ковалентно связанного с белком-носителем, где полисахаридный антиген O2 имеет структуру формулы (O2), показанную в табл. 1, а 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 25 представляет собой композицию по любому из воплощений 20-24, содержащую: (1) биоконъюгат полисахаридного антигена O1A E. coli, ковалентно связанного с белком-носителем; (2) биоконъюгат полисахаридного антигена O2 E. coli, ковалентно связанного с белком-носителем; (3) биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 E. coli, ковалентно связанного с белком-носителем; (4) биоконъюгат полисахаридного антигена O6A E. coli, ковалентно связанного с белком-носителем; (5) биоконъюгат полисахаридного антигена O8 E. coli, ковалентно связанного с белком-носителем; (6) биоконъюгат полисахаридного антигена O15 E. coli, ковалентно связанного с белком-носителем; (7) биоконъюгат полисахаридного антигена O16 E. coli, ковалентно связанного с белком-носителем; (8) биоконъюгат полисахаридного антигена O25B E. coli, ковалентно связанного с белком-носителем и (9) биоконъюгат полисахаридного антигена O75 E. coli, ковалентно связанного с белком-носителем, где полисахаридные антигены имеют структуры формул (O1A), (O2), (O4-Glc<sup>+</sup>), (O6A), (O8), (O15), (O16), (O25B) и (O75), соответственно, показанные в табл. 1, и 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 26 представляет собой композицию по воплощению 25, дополнительно содержащую: (10) биоконъюгат полисахаридного антигена O18A E. coli, ковалентно связанного с белком-носителем, где полисахаридный антиген O18A имеет структуру формулы (O18A), показанную в табл. 1, а 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 27 представляет собой композицию по любому из воплощений 20-26, где композиция представляет собой иммуногенную композицию.

Воплощение 28 представляет собой способ вакцинации субъекта против E. coli, в частности, внекишечной патогенной E. coli (ExPEC), включающий введение субъекту биоконъюгата по воплощению 19 или композиции или иммуногенной композиции по любому из воплощений 20-27.

Воплощение 29 представляет собой биоконъюгат по воплощению 19 или композицию или иммуногенную композицию по любому из воплощений 20-27 для применения в вакцинации против внекишечной патогенной E. coli (ExPEC).

Воплощение 30 представляет собой рекомбинантную клетку-хозяина для получения биоконъюгата полисахаридного антигена O<sub>x</sub> E. coli, ковалентно связанного с белком-носителем, рекомбинантная клетка-хозяин содержит:

- (а) нуклеотидную последовательность генного кластера gfb для полисахаридного антигена O<sub>x</sub>;
- (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<sub>y</sub>, где: когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O1A, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотную мутацию N311V или аминокислотные мутации Y77H и N311V, а рекомбинантная клетка-хозяин дополнительно содержит последовательность, кодирующую глюкозилтрансферазу GtrS, последовательность которой по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 4, и которая способна модифицировать полисахаридный антиген O4 E. coli путем добавления глюкозы с получением гликозилированного полисахаридного антигена O4 E. coli, и нуклеотидные последовательности, кодирующие транслоказу GtrA и глюкозилтрансферазу GtrB, последовательности которых по меньшей мере на 80% идентичны SEQ ID NO: 7 и 8, соответственно, где транслоказа способна транслоцировать связанную с бактопренолом глюкозу, а глюкозилтрансфераза способна гликозилировать бактопренол;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O6A, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O8, PglB<sub>y</sub> не содержит аминокислотные мутации в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O15, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O16, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации Y77H, S80R, Q287P, K289R и N311V;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O18A, PglB<sub>y</sub> не содержит аминокислотные мутации в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669; и

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O75, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотную мутацию N311V,

где в каждом случае аминокислотные мутации относятся к PglB<sub>y</sub> дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и где полисахаридные антигены O1A, гликозилированный O4, O6A, O8, O15, O16, O18A и O75 имеют структуры формул (O1A), (O4-Glc+), (O6A), (O8), (O15), (O16), (O18A) и (O75), соответственно, показанные в табл. 1, и 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 31 представляет собой рекомбинантную клетку-хозяина по воплощению 30, где антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O1A, а PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. Воплощение 32 представляет собой рекомбинантную клетку-хозяина по воплощению 30, где антиген O<sub>x</sub> представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, а PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотную мутацию N311V или аминокислотные мутации Y77H и N311V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Воплощение 33 представляет собой рекомбинантную клетку-хозяина по воплощению 32, где рекомбинантная клетка-хозяин дополнительно содержит последовательность, кодирующую GtrS, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и нуклеотидные последовательности, кодирующие GtrA и GtrB, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7 и 8 соответственно.

Воплощение 34 представляет собой рекомбинантную клетку-хозяина по воплощению 30, где антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O6A, а PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. Воплощение 35 представляет собой рекомбинантную клетку-хозяина по воплощению 30, где антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O8, PglB<sub>y</sub> не содержит аминокислотные мутации в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669 по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Воплощение 36 представляет собой рекомбинантную клетку-хозяина по воплощению 30, где антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O15, а PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. Воплощение 37 представляет собой рекомбинантную клетку-хозяина по воплощению 30, где антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O16, а PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации Y77H, S80R, Q287P, K289R и N311V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Воплощение 38 представляет собой рекомбинантную клетку-хозяина по воплощению 30, где антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O18A, PglB<sub>y</sub> не содержит аминокислотные мутации в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669 по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Воплощение 39 представляет собой рекомбинантную клетку-хозяина по воплощению 30, где антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O75, а PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотную мутацию N311V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Воплощение 40 представляет собой рекомбинантную клетку-хозяина по любому из воплощений 30-39, где белок-носитель выбран из группы, состоящей из обезвреженного экзотоксина *A. P. aeruginosa* (EPA), флагеллина *E. coli* (FliC), CRM197, 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* (QMPC) и белка D из нетипируемого *Haemophilus influenzae*.

Воплощение 41 представляет собой рекомбинантную клетку-хозяина по воплощению 30-40, где белок-носитель представляет собой обезвреженный экзотоксин *A. Pseudomonas aeruginosa* (EPA).

Воплощение 42 представляет собой рекомбинантную клетку-хозяина по воплощению 41, где белок-

носитель EPA содержит 1-10, предпочтительно 2-4, более предпочтительно 4 сайта гликозилирования.

Воплощение 43 представляет собой рекомбинантную клетку-хозяина по воплощению 42, где каждый сайт гликозилирования содержит консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 2.

Воплощение 44 представляет собой рекомбинантную клетку-хозяина по воплощению 43, где белок-носитель EPA содержит SEQ ID NO: 3.

Воплощение 45 представляет собой рекомбинантную клетку-хозяина по любому из воплощений 30-44, которая представляет собой клетку *E. coli*, например штамм *E. coli* K-12, такой как штамм W3110.

Воплощение 46 представляет собой биоконъюгат по воплощению 19, который представляет собой биоконъюгат гликозилированного полисахарида O4 антигена *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем.

Воплощение 47 представляет собой биоконъюгат по воплощению 46, где белок-носитель представляет собой белок-носитель EPA, содержащий SEQ ID NO: 3.

Воплощение 48 представляет собой биоконъюгат по воплощению 46 или 47, где гликозилированный полисахаридный антиген O4 имеет структуры формулы (O4-Glc<sup>+</sup>), показанные в табл. 1, а n представляет собой целое число от 5 до 40.

Воплощение 49 представляет собой композицию, содержащую биоконъюгат по любому из воплощений 46-48.

Воплощение 50 представляет собой композицию по воплощению 49, дополнительно содержащую один или несколько конъюгатов, каждый из которых содержит полисахаридный антиген *E. coli*, ковалентно связанный с белком-носителем.

Воплощение 51 представляет собой композицию по воплощению 50, где один или несколько конъюгатов содержит полисахаридный антиген *E. coli* одного или нескольких следующих серотипов *E. coli*: O1A, O2, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75, где полисахаридные антигены O1A, O2, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75 имеют структуры формул (O1A), (O2), (O6A), (O8), (O15), (O16), (O18A), (O25B) и (O75), соответственно, показанные в табл. 1, и 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 52 представляет собой композицию по воплощению 51, содержащую конъюгаты *E. coli* серотипов: O1A, O2, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75.

Воплощение 53 представляет собой композицию по воплощению 52, где каждый конъюгат представляет собой биоконъюгат.

#### **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 (время-пролётная ионизация лазерной десорбцией с использованием матрицы). 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 *wzu* 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

O-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 нетипизируемых 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 изготовить 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, специфичный 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, представлен 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 ПНР 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 *gfb* O16 в штамме *E. coli* W3110  $\Delta$ wzzE-wecG  $\Delta$ waal  $\Delta$ wbbI-J-K заменяли кластером *gfb* O4 путем гомологичной рекомбинации. В альтернативном варианте в некоторых штаммах кластер *gfb* 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 EPTG (изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозидом) 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 (ядерно-магнитный резонанс) 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 ID, 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  $\alpha$ -Rha и у H6 с H5 для  $\alpha$ -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 (гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия с усилением без искажений путем переноса поляризации) дал инвертированные пики для групп CH<sub>2</sub>. 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 отнесения 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). Сыворотки 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. Объединенная сыворотка кроликов, иммунизированных биоконъюгатом O4, модифицированным Glc, содержала 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 мкг, 0,40 мкг 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 мкг, 0,40 мкг 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 (ОРКА) 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). 6).

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

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

Помимо биоконъюгатов (O4-Glc+)-ЕРА, полученных, как описано выше, были получены девять (9) других биоконъюгатов. В частности, дополнительно полученные биоконъюгаты включали биоконъюгат *E. coli* O1A-ЕРА, биоконъюгат O2-ЕРА, биоконъюгат O6A-ЕРА, биоконъюгат O8-ЕРА, биоконъюгат O15-ЕРА, биоконъюгат O16-ЕРА, биоконъюгат O18A-ЕРА, биоконъюгат O25B-ЕРА и биоконъюгат O75-ЕРА. Химические структуры гликанов этих конъюгатов можно увидеть в соответствующих формулах в табл. 1. Композиция, содержащая 10 биоконъюгатов, в данном документе обозначается "ExPEC10V". Композиция, содержащая биоконъюгаты O1A-ЕРА, O2-ЕРА, O6A-ЕРА и O25B-ЕРА, в данном документе обозначается "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-, M(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-ЕРА и O25B-ЕРА из одних и тех же продуцирующих штаммов. Композиция "ExPEC4V" содержит биоконъюгат O1A-ЕРА из продуцирующих штаммов stGVXN4411 или stLMTB10217, тогда как композиция "ExPEC10V" содержит биоконъюгат O1A-ЕРА из продуцирующего штамма stLMTB10217. Композиция "ExPEC4V" содержит биоконъюгат O6A-ЕРА из продуцирующего штамма stGVXN4112, тогда как композиция "ExPEC10V" содержит биоконъюгат O6A-ЕРА из продуцирующего штамма stLMTB10923. Кроме того, композиция "ExPEC10V" содержит биоконъюгаты O4-ЕРА (т.е. (O4-Glc+)-ЕРА), O8-ЕРА, O15-ЕРА, O16-ЕРА, O18A-ЕРА и O75-ЕРА из продуцирующих штаммов, которые не используются для "ExPEC4V". Различные продуцирующие штаммы могут варьироваться в плаزمиды для экспрессии белка-носителя ЕРА 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> urecGVXN_032	$\Delta waaL$	-	pGVXN970	pGVXN1076
O1A (ExPEC4V; ExPEC10V)	stLMTB10217	$\Delta rfb::O1A$ <i>rfb</i> urecGVXN_032	$\Delta waaL$	-	pGVXN1221	pGVXN1076
O2	stGVXN4906	$\Delta rfb::O2$ <i>rfb</i> urecGVXN_116	$\Delta waaL$	-	pGVXN971	pGVXN1076
O4	BVEC-L-00684	$\Delta rfb::O4$ <i>rfb</i> CCUG11450	$\Delta waaL$	$\Delta gtrS::gt$ <i>rS</i> O4	pGVXN1217	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	$\Delta waaL$	-	pGVXN1221	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	$\Delta waaL$	$\Delta gtrABS$	pGVXN1221	pGVXN1076
O16	stLMTB11739	$\Delta rfb::O16$ <i>rfb</i> OC24208	$\Delta waaL$	$\Delta gtrABS$	pGVXN2381	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> urecGVXN_138	$\Delta waaL$	$\Delta gtrABS$	pGVXN970	pGVXN1076
O75	stLMTB11737	$\Delta rfb::O75$ <i>rfb</i> CCUG31	$\Delta waaL$	$\Delta gtrABS$	pGVXN1217	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 генного кластера *rfb* O16::IS5 W3110, который является дефектным по биосинтезу О-антигена, достигалась благодаря единственному акту гомологичной рекомбинации. В случае генных кластеров *rfb* O16 и O18A донорскую ДНК рекомбинировали через фланкирующие гены *grid* и *gmlCA*, тогда как генный кластер *rfb* для других штаммов рекомбинировали через фланкирующие гены *gnd* и *galF*. Последовательности кластеров *rfb* в штаммах-продуцентах представлены в SEQ ID NO: 9 и 11-19.

Ген лигазы О-антигена (*waaL*).

Все штаммы *E. coli*, продуцирующие О-антиген, несут искусственно введенную делецию лигазы

геномного О-антигена *E. coli* W3110, кодируемой геном *waalL*. В штаммах  $\Delta$ *waalL* 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 глюкозилтрансферазу. В *E. coli* W3110 *GtrS* может переносить остаток глюкозы (Glc) на сахар GlcNAc в мотиве  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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* *C. 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* размещался на плазмиде после промотора, индуцируемого изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозидом (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 <sup>1</sup>
pGVXN114	<i>pglB</i>	Частота использования кодонов <i>C. jejuni</i> ; SpR
pGVXN970	<i>pglB</i>	Частота использования кодонов оптимизирована для <i>E. coli</i> ; SpR
pGVXN971	<i>pglB</i> <sup>N534Q</sup>	Частота использования кодонов оптимизирована для <i>E. coli</i> ; природный сайт гликозилирования <i>PglB</i> инактивирован; SpR
pGVXN1217	<i>pglB</i> <sup>N311V</sup>	Частота использования кодонов оптимизирована для <i>E. coli</i> ; <i>PglB</i> с оптимизацией по субстрату; SpR

pGVXN1221	<i>pglB</i> <sup>N311V,K482R,D483H,A669V</sup>	Частота использования кодонов оптимизирована для <i>E. coli</i> ; PglB с оптимизацией по субстрату; SpR
pGVXN2381	<i>pglB</i> <sup>Y77H,S80R,Q287P,K289R,N311V</sup>	Частота использования кодонов оптимизирована для <i>E. coli</i> ; PglB с оптимизацией по субстрату; SpR
pGVXN659	EPA-4	EPA с четырьмя сайтами биоконъюгации; AmpR
pGVXN1076	EPA-4	EPA с четырьмя сайтами биоконъюгации; KanR

<sup>1</sup> SpR - устойчивость к спектиномицину; AmpR - устойчивость к ампициллину; KanR устойчивость к канамицину.

Белок носитель (EPA).

Все штаммы, продуцирующие О-антиген *E. coli*, экспрессировали в качестве белка-носителя для О-антигена генетически обезвреженный анатоксин АДФ-рибозилтрансферазу (EPA) *P. aeruginosa*. Анатоксин EPA отличается от токсина EPA 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 (EPA-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 EPA, например, различающиеся по количеству консенсусных мотивов сайта N-гликозилирования (например, имеющие два таких мотива, EPA-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 EPA. 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 EPA, 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). Плазмида 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 O-антигенов и что невозможно предсказать оптимальный вариант PglB для получения биоконъюгата с заданным полисахаридным O-антигеном.

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

O-гликановые остатки O-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. Правильная 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 O-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 с по меньшей мере 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 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 O-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 (обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография)), была выше 95%, (2) соотношение полисахарид/белок варьировалось 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. 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 O-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 EPA-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 O-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 внутримышечные 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 EPA, содержащим 4 сайта гликозилирования (EPA-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 биоконъюгатов, включенным в вакцину, и белком-носителем EPA, измеряли с помощью ELISA (общий IgG) с использованием типоспецифичного LPS в качестве иммобилизуемого вещества. Титры антител представляли в виде значений EC<sub>50</sub>, 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)									Размер выборки
	O1A:O2:O6A:O25B:O4:O8:O15:O16:O18A:O75									
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 <sup>¶</sup>									
доза <sup>¶</sup>	O1A	O2	O6A	O25B	O4	O8	O15 <sup>#</sup>	O16	O18A	O75
высокая <sup>¶</sup>	*	**	**	*	**	ns	**	**	*	ns
средняя <sup>¶</sup>	*	**	**	**	**	ns	**	**	ns	ns
низкая <sup>¶</sup>	*	*	*	*	*	ns	**	**	ns	ns
высокая <sup>¶</sup>	**	**	**	**	**	*	**	**	**	**
средняя <sup>¶</sup>	**	**	**	**	**	*	**	**	*	**
низкая <sup>¶</sup>	**	**	**	**	**	*	**	**	**	**
высокая <sup>¶</sup>	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
средняя <sup>¶</sup>	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
низкая <sup>¶</sup>	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**

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). \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ . \* 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 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 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 с 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 уничтожить 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 лечения (день 1), а также на 31 и 50 дни после иммунизации.

Значительное усиление гуморального ответа против всех О-антигенов и белка-носителя ЕРА наблюдалось на 31 и 50 день после вакцинации в группе, получавшей ЕхРЕС10V, по сравнению с контрольной группой, получавшей только физиологический раствор (фиг. 9, табл. 8). Для серотипа О1А 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 антигена, перекрестно реагирующие с О1А-LPS.

Таблица 7  
Экспериментальные группы и доза ЕхРЕС10V, 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	ЕхРЕС10V	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 О1А, О2, О4, О6А, О8, О15, О16, О18А, О25В, О75, соответственно (176 мкг общего PS/мл). Каждая доза содержит 382,8 мкг белка ЕРА (638 мкг ЕРА/мл).

Таблица 8  
Иммуногенность ЕхРЕС10V у кроликов NZW в рамках токсикологического исследования.

Воздействие	Гуморальные ответы на 31 день после вакцинации										
	ЕхРЕС10V	О1А	О2	О6А	О25В	О4	О8	О15	О16	О18А	О75
31 день	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
50 день	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****

Гуморальные ответы, индуцированные ЕхРЕС10V. 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 ЕхРЕС10V у людей.

В настоящее время вакцин для предотвращения IED не существует. Серотипы, составляющие вакцину ЕхРЕС10V (О1А, О2, О4, О6А, О8, О15, О16, О18А, О25В и О75), отбирали для решения проблемы инвазивных заболеваний, вызываемых большинством клинически значимых штаммов ЕхРЕС, которые также представляют большинство изолятов ЕхРЕС, вызывающих устойчивые к противомикробным препаратам IED, в том числе ST131. Выбранные серотипы являются репрезентативными для десяти преобладающих О-серотипов ЕхРЕС, вызывающих инфекции циркулирующей крови у пожилого населения и отвечающих примерно за 70% инфекций циркулирующей крови, вызываемых ЕхРЕС.

Поскольку не ожидается, что при профилактике инвазивных заболеваний механизм действия конъюгированных вакцин будет зависеть от механизмов устойчивости к антибиотикам, считается, что вакцина ЕхРЕС10V обеспечивает защиту от IED, вызванных лекарственно-устойчивыми и чувствительными к лекарственным средствам серотипами О1А, О2, О4, О6А, О8, О15, О16, О18А, О25В и О75.

Имеется предшествующий клинический опыт с ЕхРЕС4V, более ранней вакциной-кандидатом, которая содержала набор из четырех конъюгатов О-антигена *E. coli* (О1А, О2, О6А и О25В), также присутствующих в ЕхРЕС10V. Основываясь на результатах четырех клинических исследований (два завершённых исследования фазы 1, одно завершённое исследование фазы 2 и текущее исследование фазы 2), ЕхРЕС4V хорошо переносилась участниками исследования, и при дозах до 16 мкг полисахарида (PS) на серотип (О1А, О2, О6А и О25В) 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 ЕхРЕС4V. В каждом исследовании было показано, что вакцина ЕхРЕС4V является иммуногенной, демонстрируя дозозависимый иммунный ответ на вакцину, а титр иммуноглобулинов G (IgG), специфичных к О-антигену, возрастает, о чем свидетельствуют результаты иммуноферментного анализа (ELISA). Анализ опсонофагоцитарной активности (ОРКА), оптимизированный для ЕхРЕС4V, 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-ВАС2001]), обосновывая использование ELISA в качестве первичного измерения титров антител к ЕхРЕС4V и для прогнозирования функциональной активности антител. Анализ данных по иммуногенности продемонстрировал стойкость иммунного ответа на протяжении трех лет после вакцинации ЕхРЕС4V. На данный момент также показано, что сыворотки людей, вакцинированных ЕхРЕС4V и имевших высокие титры се-

ротип-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 ExPEC10V, 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 фазе 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 и старше до 85 лет включительно 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 A (EPA), 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
<b>Основные</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Оценка безопасности и реактогенности различных доз ExPEC10V у участников в возрасте <math>\geq 60</math> и <math>\leq 85</math> лет</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Полученные по запросу местные и системные нежелательные явления (НЯ), регистрируемые в течение 14 дней после вакцинации (с 1 дня до 15 дня)</li> <li>Сообщенные спонтанно НЯ, регистрируемые с момента введения исследуемой вакцины до 29 дня после вакцинации (с 1 дня до 30 дня)</li> <li>Серьезные нежелательные явления (НЯ), регистрируемые с момента введения исследуемой вакцины до 181 дня</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Оценка дозозависимой иммуногенности ExPEC10V на 15 день у участников в возрасте <math>\geq 60</math> и <math>\leq 85</math> лет</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Титры антител к ExPEC10V, измеренные в мультиплексном иммуноанализе на основе электрохемилюминесценции (ECL) и мультиплексном анализе опсонофагоцитарной активности (MOPA) на 15 день</li> </ul>
<b>Второстепенные</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Оценка корреляции между сывороточными титрами, полученными в мультиплексном иммуноанализе на основе ECL (общие антитела) и MOPA (функциональные антитела) на 15 день</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Титры антител к ExPEC10V, измеренные в мультиплексном иммуноанализе на основе ECL и MOPA на 15 день</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Оценка дозозависимой иммуногенности ExPEC10V на 30 и 181 день у участников в возрасте <math>\geq 60</math> и <math>\leq 85</math> лет</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Титры антител к ExPEC10V, измеренные в мультиплексном иммуноанализе на основе ECL и MOPA на 30 и 181 день</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>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 <math>\geq 60</math> и <math>\leq 85</math> лет</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Серьезные НЯ, связанные с исследуемой вакциной или предусмотренными исследованием процедурами, от 182 дня и до конца исследования</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Оценка в периоде ДН иммуногенности дозы ExPEC10V, выбранной для дальнейших клинических разработок на основе первичного анализа на 30 день</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Титры антител к ExPEC10V, измеренные в мультиплексном иммуноанализе на основе ECL и MOPA через 1 год (366 день), 2 года (731 день) и 3 года (1096 день)</li> </ul>

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

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

<ul style="list-style-type: none"> <li>Оценка в периоде ДН безопасности выбранной дозы ExPEC10V у участников в возрасте <math>\geq 60</math> лет с ИМП в анамнезе за последние 5 лет</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Серьезные НЯ, связанные с исследуемой вакциной или предусмотренными исследованием процедурами, от 182 дня и до конца исследования</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Оценка в периоде ДН иммуногенности выбранной дозы ExPEC10V у участников в возрасте <math>\geq 60</math> лет с ИМП в анамнезе за последние 5 лет</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>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)</li> </ul>
<b>Поисковые</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Оценка влияния ExPEC10V на кишечный микробиом (стул) по результатам метагеномного анализа</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Метагеномный анализ образцов стула у отобранной подгруппы участников для оценки влияния ExPEC10V на: <ul style="list-style-type: none"> <li>Распространенность патогенов (например, <i>Clostridium difficile</i>) в кишечной флоре</li> <li>Распространенность серотипов ExPEC10V в кишечной флоре</li> </ul> </li> </ul>

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 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 долгосрочного последующего наблюдения с маскированием данных для исследователя с вакцинацией в 1-й день и открытый период ДН (долгосрочного наблюдения), 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 Plevnar 13 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 данные 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 сигнальную 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 Prevnar 13.

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

Этап 5: отбирали и рандомизировали первую сигнальную четверку участников; двоих участников в группу высокой дозы ExPEC10V (табл. 11) и по одному участнику в группы ExPEC4V и Prevnar 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 Prevnar 13. В 1 день все участники получали однократную внутримышечную (в/м) инъекцию либо ExPEC10V (1 из 3 доз), либо ExPEC4V, либо Prevnar 13 в соответствии с группой вакцинации, в состав которой их включили в рамках исследования. С первой сигнальной 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 Prevnar 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), установленных DRC после анализа данных по безопасности на 14 день после вакцинации для первых 84 участников, рандомизировали оставшихся 320 участников из когорты 1 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 Prevnar 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 Prevnar 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. 11).

Для когорты 2 первичный анализ включает данные по безопасности и иммуногенности и 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 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 полисахаридный O-антиген серотипов ExPEC O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75, биоконъюгированных по-отдельности с белком-носителем EPA. 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 полисахаридный O-антиген серотипов ExPEC O1A, O2, O6A, O25B (4:4:4:8 мкг PS/серотипы ExPEC), биоконъюгированных по-отдельности с белком-носителем EPA. Однократная в/м (в дельтовидную мышцу) инъекция 0,5 мл ExPEC4V в день 1.

Prevear 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)	O25 B (мкг)	O75 (мкг)	EP A (мкг)	PS (суммарно) (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

EPA - 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 EPA.

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 EPA.

Доза определяется только PS. EPA (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 1/2а

Ингредиент	Количество (мкг/мл) <sup>а</sup>		
	Низкая концентрация <sup>б</sup>	Средняя концентрация	Высокая концентрация
<i>Полисахаридный</i>			
<i>О-антиген</i>			
ЕсоО1А	8	16	16
ЕсоО2	8	8	16
ЕсоО4	8	8	16
ЕсоО6А	8	16	16
ЕсоО8	8	8	16
ЕсоО15	8	8	16
ЕсоО16	8	8	16
ЕсоО18А	8	8	16
ЕсоО25В	16	32	32
ЕсоО75	8	8	16
<i>Белок-носитель</i>			
ЕРА	320	441	640
<i>Экспципенты</i>			
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	6,19 мМ		
Na <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub>	3,81 мМ		
Сорбит	5% (мас./мас.)		
Метионин	10 мМ		
Полисорбат 80	0,02% (мас./мас.)		

ЕРА - генетически обезвреженный экзотоксин *A. P. aeguginosa*, используемый в качестве белка-носителя <sup>а</sup>Активный ингредиент представляет собой биологически синтезированный конъюгат, состоящий из PS антигена и белка-носителя (ЕРА); доза рассчитывается только по PS группировке, "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 МОРА, а также к ЕРА, 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  $\geq 2$ -кратным и  $\geq 4$ -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

Исследуемая группа вакцинации	Вакцинация в 1-й день.	Фаза 1						Фаза 2а	Суммарно
		Этап 1	Этап 2	Этап 3	Этап 4	Этап 5	Этап 6	Этап 7	
		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 ExPEC10V*	2	18					80	100
G2	Средняя доза ExPEC10V*			2	18			80	100
G3	Высокая доза ExPEC10V*					2	18	80	100
G4	ExPEC4V**	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 (ЕРА), 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 (ЕРА), 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 нетоксичным дифтерийным белком CRM197.

Таблица 12  
Когорта 2: схема вакцинации

Исследуемая группа вакцинации	Вакцинация в 1-й день	Суммарно
G6	ExPEC10V <sup>a</sup>	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 А (ЕРА), 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 приемле-

мый 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 SGGGDQ<sup>1</sup>NATG SGGGKLAEEA FDLWNECAKA CVLCLKDQVSR SRMSVDPAL ADTNGQGVHL YSMVLEGGND  
 ALKLAIDNAL SITSDGLTIR LEGGVEPNKP VRYSYTRQAR GSWSLNWLVP IGHEKPSNIK VFIHELNAGN QLSHMSE  
 IEMGDPELLAK LARDATFFVR AHESNEMQPT LAISHAGVSV VMAQAQPRRE KRWSEWASGK VLCLLDPLDG VYNYLAQ  
 NLDLDTWEGKI YRVLAGNPAK HDLDIKD<sup>2</sup>NNN STPTVISHRL HFPEGGSLAA LTAHQACHLP LEAFTRHRQP RGWEQLE  
 YPVQRLVALY LAARLSWNQV DQVIRNALAS PGSGGDLGEA IREQPEQARL ALTLAAAESE RFVRRQGTGND EAGAASF  
 SLTCEPAK<sup>3</sup>DQ NRTKGECAEP ADSGDALLER NYPTGAEFLG DGGDVSFSTR GTQNWTVREL LQAHRQLEER GYVFGY  
 FLEAAQSI<sup>4</sup>VF GQVRRASQDL DAIWRGFYIA GDPALAYGYA QDQEPDARGR IRNGALLRVY VPRWSLPGFY RTGLTLF  
 AAGEVERLIG HPLPLRLDAI TGPEEEGGRV TILGWPLAER TVVIPS<sup>5</sup>AIPT DPRNVGGDL D PSSIPDKEQA ISALPDY  
 PGKPPREDLK LSGGGDQ<sup>6</sup>NA T

##### SEQ ID NO: 4 (аминокислотная последовательность GtrS O4)

MNNLIMNWNCKLSIFIIAFILLWLRPPDILTNAQFWAEDSVFWYKDAYENGLFSSSLTTPRNGYFQTVSTFIVGLT  
 ALLNPDYAPFVSNFFGMIRSVI IWFLF<sup>1</sup>TERFNFLTLTRIFLSIYFLCMPGLDEVHANITNAHWYLSLYVSMIL  
 IARNPSSKSWRFHDIFFILLSGLSGPFII<sup>2</sup>FILAASC<sup>3</sup>FKFINNCKDHSVRSFINFYLRQPYALMIVCALIQGT<sup>4</sup>SI  
 ILTFNGTRSSAPLGF<sup>5</sup>SFDVISSIISSNIFLFTFVPWDIAKAGWDNLLLSYFLSVSILS<sup>6</sup>CAAFV<sup>7</sup>VKGTWRMKVFA  
 TLP<sup>8</sup>LLIIIF<sup>9</sup>SMAKPQLTDSAPQLPTLINGQGSRYFVNIHIAIFSLLCVYLLECVRGKVATLFSKIYLTILLFVMG  
 CLNFVITPLPNMNWREGATLINNAKTGDV<sup>10</sup>ISIQVLPGLTLELRK

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

ATGAATAATTAAATATGAATAACTGGTG<sup>1</sup>TAAATATCTATATTTATTATTGCATTTATTTTGCATAGGCTTAGA  
 AGGCCGGATATACTCACAACGCACAATTTGGGCAGAAGATCCGTTTTCTGGTATAAGGACGCCTATGAGAAC  
 GGATTTCTAAGTTCACTAACAACGCCTAGGAATGGGATTTCCAGACTGTTCTACATTTATAGTTGGTCTGACT  
 GCTTTATTAATCCAGATTTATGCACCTTTGTTTCTAAATTTTTTGGCATAATGATTCGCTCAGTAATATATGG  
 TTTTATTTACAGAAAGATTC<sup>2</sup>AACTTCCATTCATTCAGTATTTCTATCTATTTATTTCTATGCATG  
 CCTGGATTTGGATGAAGTT<sup>3</sup>CATGCAAATATAACAATGCACATTTGGTATTTGTCAATATATGATCAATGATCCTG  
 ATAGCTCGCAATCSAAGTTCAAATCATGGAGGTTT<sup>4</sup>CATGATATATTTCTTTATCTTGTATCCGGGCTCAGTGGC  
 CCATTTATAATTTT<sup>5</sup>CATTTTAGCAGCTT<sup>6</sup>CATGCTTTAAATTTATAAATAATGTAAAGATCATATAGTGTAGA  
 TCTTT<sup>7</sup>CATAAATTTCTACTTGCCTCAGCCATACGCAATTAATGATTTGTTTGCCTTTAATCAAGGAACTTCTATA  
 ATTTCTAACTTTCAATGGCACACGTTCTCAGCACCGTAGGATTCAGTTTGTATGTGATTTCTGTTATTTATATCA  
 TCGAATATTTTTTTATTTACATTTGTCCCATGGGATATTGCAAAGGCTGGGTGGGATAATTTACTGTTATCTTAT  
 TTTTTGTCTGTTTCGATTTTGTCTGTGCGGCCTTTGTTTTTTGTTAAAGGTACGTGGCGAATGAAAGTATTTGCA

ACTTTACCATTGCTAATTATAATATTTTCAATGGCAAACCACAATTTGACAGACTCGGCACCTCAATTGCCAACA  
 CTTATTAATGGGCAAGGTTCAAGATACTTCGTAAATATACATATTTGCGATATTTCTTTGCTATGTGTTTACTTA  
 CTTGAGTGCCTCAGGGGGAAAGTGGCAACTTTATTTTCCAAAATATACTTAACAATTTTGCATTCGTGATGGGA  
 TGTTTGAATTTTGTATCACCCCACTCCCAAACATGAAGTGGAGGGAAGGTGCTACTTTGATTAATAATGCAAAA  
 ACTGGTGATGTCATTTGATTCAGTGCTACCACCTGGCTAACACTTGAACATAAGGAAAAATAA

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

MLKKEYLKNPYLVLFAMII LAYVFSVFCRFYVWVWASEFNEYFFNNQLMII SNDGYAFAEGARDMIAGFHQPNDL  
 SYYGSSLSALTYWLYKITPFSFESIILYMSSTFLSSLVVIPTILLANEYKRPLMGFVAALLASIANSYNRTMSGY  
 YDITDMLVIVLPMFILFFMVRMILKKDFFSLIALPLFIGIYLWYPPSSYTLNVALI GLFLIYTLI FHRKEKIFYIA  
 VILSSLTLSNIAWFYQSII I VILFALFALEQKRLNFMII GILGSATLI FLILSGGVDPI ILYQLKFYIFRDESAN  
 LTQGFMYFNVNQTIQEVENVDLSEFMRI SGSEIVFLSFLGFVWLLRKHKSMIMALPI I LVLGFALKGGIRFTI  
 YSVPVMAFGFLLSEFKAIMVKYSQLTSNVICVFATILTLAPVFIHI YNYKAPT VFSQNEASLLNQLKNIANR  
 EDYVVTWWDYGYPVRYSDVKT LVDGGKHLGKDNFFPSFALS KDEQAAANMARLSVEYTEKS FYAPQNDI LKTDI  
 LQAMMKDYNQSNVDLFLASLSKPDFKIDTPKTRDI YLYMPARMSLI FSTVASFSFINLDTGVLDKPFSTAYPL  
 DVKNGEII YLSNGVVLSDDFRSFKI GDNVVS VNSIVEINSIKQGEYKITPIDDKAQFYI FYLKD SAI PYAQFILMD  
 KTMFNSAYVQMFFLGNVDK NLFDLVINSRDAKVFKLKI

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

GenBank: BAA16209.1)

MLKLEFAKYTSIGVLNTLIHWVVFVGVCIYVAHTNQALANFAGFVAVSFSFFANAKFTFKASTTTRYMMLYVGFMG  
 TLSATVWGAADRCALPPMITLVTFSAISLVCGFVYSKFI VFRDAK

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

GenBank: BAA16210.1)

MKISLVVPVFNEEEAIPIFYKTVREFEELKSYEVEIVFINDGSKDATEESIINALAVSDPLVPLSFTRNFGKEPA  
 LFAGLDHATGDALIPIDVDLQDPIEVI PHLIEKWQAGADMVLAKRSDRSTDGRLKRKTAEFWFKLHNKISNPKIE  
 ENVGDFRLMSRDVVENIKLMPERNLFMKIILSWVGGKTDIVEYVRAERIAAGDTKFNWKLWNLALEGITSFSTFP  
 LRIWTYI GLVVASVAFIYGAWMILDTIIFGNAVRGYPSSLVSI LFLGGIQMIGI GVLGEYIGRTYIETKKRPKYI  
 IKRVKK

**SEQ ID NO: 9** (пример нуклеотидной последовательности локуса *rfb* O4 – штамм-

продуцент O4-EPA BVEC-L-00684f)

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCTCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCGATACCC  
 AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTAGTACATTTGTTGACGAGATTTGGCTGCAGGGATCAAA  
 GAAATCCTCCTGGTAACTCAGCGCTCCAAGAACGGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA  
 CTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGCGGTGACCATATG  
 AACGTGCGTCAAGGGCAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCA  
 TTTGTCTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATG  
 ATTGACAGTTTCAACGAAACGGCCGCGAGCCAGGTGCTGGCAAAACGATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCC  
 GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAAGCCGATTTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGAT  
 CAGCCGACAGCGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGTTCGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAAGT  
 GAACGTAAGTCAAGCGTGGTGCATGGGGACGATTCAGCTGACTGATGCTATTGCGGAGCTGGCGAAAAACAATCC  
 GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCCAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG  
 TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCTGTAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA  
 TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATATAACGGCAGTGAATAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAA  
 TCTTCTGCGGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA  
 GGATTTTCTTGTTCAGAGCGGATTTGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA  
 ACGTCTGCATCATAGGCATGCATGCAGTGTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC  
 CTCTATTAATCAAAGTGAAGCCGCTTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGTGAATAA  
 CTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTGGTTCAAGTTCGTCATATATAATAATACGCAGGATAGTGT

GTTAATGTCGATAAATTAACGTACGCCGAAACCGGGAATCACTTGCTGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATGTT  
 TTTGAACATGCGGATATTTGCGATGCACCTGCAATGGCACGGATTTTGGCTCAGCATCAGCCGGATGCAGTGATG  
 CACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTTGGT  
 ACTTATGCTCCTTTTGAAGCCGCTCGCAATTACTGGTCTGCTCTTGATAGCGACAAGAAAATAGCTTCCGTTT  
 CATCATATTTCTACTGACGAAGTATATGGTGATTTGCCTCATCTGACGAGGTAAATAATACAGAAGAATTACCC  
 TTATTTACTGAGACAACAGCTTACGCGCCAAGCAGCCCTTATTCGCATCCAAAGCATCCAGCGATCATTTAGTC  
 CGCGCGTGGAAACGTACCTATGGTTTACCAGCATTGTGACTAATTGCTCTAACAATTATGGTCCTTATCATTTT  
 CCGGAAAAATTGATCCATTGGTTATCTCAATGCTCTGGAAGGTAAAGCATTACCTATTTATGGTAAAGGGGAT  
 CAAATTCGCGACTGGCTGTATGTTGAAGATCATGCGCGTGGCTTATATACCGTCTGTAACCGAAGGTAAAGCGGGT  
 GAACTTATAACATTTGGTGGGCACAACGAAAAGAAAACATAGATGTAGTGCTCACTATTTGTGATTTGCTGGAT  
 GAGATTGATCCGAAAGAGAAATCTTTCGTGAGCAAACTACTTATGTTGCCGATCGTCCGGACACGATCCCGCT  
 TATGCGATTGATGCTGAGAATATTTGGTCGCGAATTTGGGATGGAAACCACAGGAAACGTTTGGAGCGGGATTCCG  
 AAGACAGTGAATGGTATCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAATGTGAAAAGTGGTGCCTATCAATCGTGGATT  
 GAAGAGAATATGAGGGCCGCCAGTAATGAATATCCTCCTTTTGGCAAACAGGGCAGGTAGGTTGGGAACCTAC  
 AGCGTCTGCGCACTCTGGGTAACCTGATTGCTCTTGATGTTTCACTGATTATTTGGCGATTTTCAAGTA  
 ACCCGAAGGTGTGGCTGAAACCGTCAAAAAATTCGCCAGATGTTATTTGTTAATGCTGCTCATACCGCGG  
 TAGATAAGGCTGAGTCAAGACAGAAATTTGCACAATTACTCAATGCGACCAGCGTTGAAGCAATTGCAAAAGCGG  
 CTAATGAAGTTGGGCTTGGGTAATCATTACTCACTCACTACTGCTTCCCTGGAAATGGGACACGATCCCGCT  
 TCGAGACTGATGTAACCGCTCCGCTCAATGTTTATGGCAAACCAAATTTGGCTGGAGAAAGAGCATTACAAGAAC  
 ATTGCGCAAAGCATCTTATTTTCCGTACCAGCTGGGTATATGCAGGTAAAGGAAATAACTTTGCCAAAACAATGT  
 TACGCTGGCAAAGAGCGCGAAGAATGGCTGTGATAAACGATCAGTTTGGCGCACCAACAGGTGCTGAATTCG  
 TGGCTGATTGCACCGCTCATGCCATTCGCGTGGCATTAACAAAACAGAAAGTTGCTGGCTGTACCATCTGGTAG  
 CAAATGGCACAACAACCTGGCAGATTACGCCGCGTAGTATTCGAAGAAGCCCGTAAAGCAGGGATTGACCTTG  
 CACTTAACAAAACCTCAACGCCGTACCAACAACGGCTTATCCTACTCCAGCCCGCTCCTCATAATTTCCGCTCA  
 ATACCGAAAAGTTTTCAGCAGAACTTTGCGCTTGTCTTGGCTGACTGGCAGGTGGGCGTGAACGATGCTCAACG  
 AATTATTTACGACTACGGCAATTTAACAAAATTTTGCATCTCGCTCATGATGCCAGAGCGGGATGAATTAAGG  
 AATGGTGAATGAAAACCGTAAAGGTATTATTCTGGCTGGTGGTCCGGCACTCGTCTTTATCCTGTGACGATG  
 GCAGTGAGTAAACAACCTGCTGCCGATTTATGATAAGCCGATGATTTATTTATCCGCTTTCAACGCTTATGTTAGCG  
 GGTATTCGCGATATTTCTTATTATCAGTACGCCACAGGATACACCGCGTTTCCAACAATTTGTTGGGGGACGGGAGT  
 CAGTGGGGGCTTAATCTACAGTATAAAGTACAACCGAGTCCGGATGGCTGGCGCAAGCGTTTATTATTTGGTGAA  
 GACTTTATTGGTGGTGATGATTGTGCACTCGTACTTGGCGATAAATATCTTCTATGGACACGACTTCCGCAAAATTA  
 ATGGAAGCTGCTGTTAAACAAAGAAATCGGTGCAACGGTATTTGCTTATCACGTCAATGATCCTGAACGTTATGGT  
 GTCGTGGAGTTTGATAATAACGGTACTGCAATTAGCCTGGAAGAAAACCGCTGGAACCAAAAAGTAACCTATGCG  
 GTTACTGGGCTTTATTTCTATGACAATGATGTTGTAGAAATGGCGAAAAACCTTAAGCCTTCTGCCCGTGGCGAA  
 CTGGAAATTACCGATATTAACCGTATTTATATGGAGCAGGGACGTTTGTCTGTGCTATGATGGGGCGTGGTTAT  
 GCCTGGTTGGTACTGGTACACATCAAAGTCTTATTGAAGCAAGTAACCTTCAATGCCACCATGAAGAGCGTCAAG  
 GGATTAAGGTATCTTGGCCGGAAGAGATTGCTTACCCTAAAGGGTTTATTTGATGCTGAGCAGGTGAAAGTATTA  
 CCGGAACCGCTGAAGAAAATGATTATGGTCAAGTATCTGCTAAAAATGATTAAGGTTATTAATAAAATGAACGTA  
 AATTAACCTGAAATTCCTGATGTGCTGATTTTTGAACCAAAAAGTTTTGGTGATGAACGTGGCTTCTTTTTTGA  
 GAGTTTTAACAGAAAGTATTTGAAGAAGCTGTAGGACGGAAGGTTGAATTTGTTTCAAGGATAACCATTCTAAGTC  
 TAAAATAAATGATTGCGTGGGATGCATTATCAAACACAAAATACTCAAGGAAAACCTGGTTCGGGTAATTTCTGG  
 TTCAGTATATGATGTTGCCGTAGATTTAAGAGAAAATCAAAGACATTTGGCAAATGGGTGGGTGTAGAATATC  
 TGGGAATAATAAAGACAATTTGGGATCCCCGAAGTTTTGCCCATGGTTTTATGTGTTGGAGGAGAATACCGA  
 ATTTGTTTATAAATGTACCGATACTTATAACCCTGCTCATGAACACACATGCTATGGAATGATCCAACATCAA  
 TATAAGTTGGCCAATCATACAAAACTGCAAGCCAATTTATTTCTGAAAAGATGCTAATGGACATCTTTTTTCA  
 TAAAACCTATTTCTGAAATGCAATATTATGAGTTTAAATAGAAAACAGTTTCTATAAATATGCTGGTTTTGCTGTG  
 CCGACATTAGTTGCAGTCCCTGCTTTGGGATTCTTGGCAGGCTGCTTGGACCGGAGAATTTTGGACTTTTCA  
 CTAGCATTCGCTTTGATAGGATATGCAAGTATTTTCGACGCCGGATTAGTCGAGCTGTAATCAGAGAAATCGCT  
 CTTTATCGAGAAAGTAAAAAGAGCAAATACAAATTTTTCGACAGCAAGTGAATCGTACTATTTTAGGGGTG  
 GTTGCAGCTTTGTTACTTTATTTTAGTAGTAATAAAGTTGTTGAGTTATTTGAATGTTAGTTCCGTTTATATTGAA  
 ACAGCAGTGGCTGCATTTCTGTTATTTCAATTTATAAATACCTGTGTATCTGATTAACAGATTTGGCTGGTTAT  
 CTGGAAGGGCTAGAAAAATTTGCAAAATATAAATGTTTCAAGAAATGATTTCTAGCACAAGCTTGGCTATATTACA  
 GTGATATTTGTTATTACAATCCCTCGTTGCTTTATGCTATGATGGGTTGGTGGTGGGCGTGTGATTTCAATTT  
 TTGATTAGCGCAATAAATTTGTCGAGATATTATTCTTAAAAGTAACTTTACTTTAATGTGGCAACTTGAATCGT  
 CTTATCTCTTTTGGTGGATGGATAACAGTTAGTAATATCATAAGCCCAATCATGGCATATTTGACCGCTTTATC  
 ATCTCTCATATTTGGGGGCTTCGAGAATTGCATTTTATACAGCGCCCTCAGAGGGTGTATCAAGGTTAATTAAT  
 ATCCCATATGCTTTGGCAAGAGCTCTATTTCTAAATTTGGCATATAGCAATAATGATGATGAACGAAAAAATTA  
 CAACCTACAGAGCTACGAATATAAGCATTGTATGCTTACCATAGTTGTTATTTGGTGCATTTTTTGCCTCATTC  
 ATAATGACAACATGGATGGGACCTGATTATGCTTAGAAGCAGCAACTATCATGAAAATACTTCTTGGTGGTTTT  
 TTCTTTAACTCTTTAGCGCAATACCTTATGCATACTTGAATCTATCGGAAAGTCAAAAATACCGCATTTTGTG

CATCTCATAGAACTTGC GCCACTTATTATTATTGTATTACTTCCAAATGCATTTCCGCATAAATTGGCACGGCA  
 ATCGCTTGGTCACTTAGAACATTTTGTGATTTTGTATACTACTTTTCGATATCGAGAAGAAAATGATTGCGGTTG  
 ATATTGGCGTCTCAACCTACAATGGTGTAAATTTTATTCGGCAACAGATTGAATCTATCCAGAAACAACTTATA  
 GAAATGGCGTCTTATAATAAGTGATGATAAATCGAGTGATGATACTGTTGATATTATTAAGGATATGATGCTA  
 ACGACAGTCGTATCTATTTGGTAGGAAATAAAAGACAAGGAGGGTTATTGAGAACTTAAATTATGCTCTTTCAC  
 AAACATACATCTGAAATTTGTACTATGTGACCAGGATGACATTTGGCCGGAGGAGCGTCTGGAAATTTCTATAG  
 ATAAATTAAGGCCTTGCAGCGTAATGATTTTGTCCGGCAATGATGTTACTGATTTGAAATTAGTAGACGAAA  
 ATAATTTGTTGATTGCAGAAAAGTTTTTATCGAACGAATAATATTAATCCACAAGATAATCTGAAAAATAATAATC  
 TTCTCTGGCGTTCAACGGTATATGGCTGTACTTGCATCATGAATAAGAACTTGTGATATTGCATTTGCCTATAC  
 CTACATATGCACATATGCATGATCAATGGTTGGCATTATTAGCGAAGCAATATGGTAACATTTTTTATTTCGACT  
 ATGCGTCTGTTTCGTTATAGGCAACATTCTACAAATGTTGTTGGTGGTAGAAAATAAACGCCATTTCAAATAATTA  
 ATTCACATACAAAAAACCTAAAAAGGATTAATTTGCTAGTGGATAGAACTGTTGCTTTAATTAATCAAATAACG  
 ATTTCTATCCAGGGAAATAAAATGGAAAATAAAATTTGATTACTTAAAATTTGGAGTGAATGAAGTATTACCTTATC  
 TTTTTAAAGGAAACAAGAAAGTTTTTTCATTTTGTGATTAATTAGTTTGGCATTACAAAAATGATATATTTATT  
 ATTTTTTTTTGCACTGTTTATGATCTGTACGTTTTTAAACACACAGGCGACAGGCATTATATGTTGTATCTGCGTT  
 AGTATTTCTTTTTTGGCTTTAACCTATCCATCAGGAGGGGACTGGATAGGTTATTTTCTCATTATGACTGCAT  
 GGTAAATGAGCAGTGAATAATGGTTTTATAATGTTTTGAACCTGGATATGAATTAATTTGTTTTCTTTATTTGGATA  
 TTTGGGATTTGAGACAATTATTATTTTTATAGCCGCTGTAATGTAATTTCAATATTAATTTTTGCAAAGCATT  
 TGAACCGGAAGTTTTGTTATTGTTGCGATAATGTGCATGTTCTTTGGAGTGTTTATGTTGAGGCGATTAGACA  
 GGCTCTGGCCTTATCTATAGTTATATTGGGATTCACTCTTTTTTTGGGTAGAAAAAGGAAATTTATAACATT  
 AGTATTTATTTGCGTCACTTTCCATATAACTGCTTTGATTTGTTTTCTTCAATGACTCCTCTATTTTCAAAGAA  
 ATTAAGCAAGATAAATAGTTATAGCCTATTAATTTCCAGTAGCTTCTTTTTCGCTTTTTCTGAAACCATATTAAG  
 TGCATCCTTGAATTTTTGCCAGAAGGATCCATTGCCAGTGAAAAATTAAGTTTTTACTTAGCAACCGAGCAATA  
 CAGGCCACAGTTATCTATTTGGGAGTGGCACTATTCTTGACATTATACTTATTTTTCTGATATGTGTAAGTTTTAA  
 ACGAATAAAGAAATATATGCTCGCTAATATAATGCTGCAATGAGATATTGCTTATTTGGTTGCTGTCTTTATAT  
 TTCTTTCCGTTATTTTTATCGGAAAATGATGCCAGTTATGACTCGCATTTGGTTGGTATGTTTTCCATTTGTTAT  
 AGTACTTCTTTATATTAACCTTGGGTTATTCAGAAATTTTAAGAGGTATATAAATAAAGAGGGTGTGGGTATAG  
 CAAATTTATTAATGCTTTTTATTTTTTGTACAAATTTTGGACCATTAAACATATGATTATAGCTATTTATAATAT  
 AATGCACCAGGATATTTGCTGAATAGGTTTATGATGATTAGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT  
 ATGTTTCGATTTGGGAAAGATAGGATATGGTTTTCTTATGTAGTATATAATATCCTGCATTCATTCCGATAATTTT  
 CTATGGAAGTGTCTTTGCTCTGTCTGTCTCTCATTGTTGAAATTTTATGTTAATAAGAAGCTTTAGATAACCAC  
 TTAGGAACTGTATGTTGATCTGTCCAAAATTTATATTTATGTAAGTGCAGCGGCTGGCTTCCGGAGGTGCAT  
 TAACTATATTAAGCAATTTATAAAACATGCATCACAAAATTTCAATGACTATATTTATGTTTGTATCTGCGGGAT  
 TGGAGTTGCCGGTCTGTGATAACATCATTACATAGAAAACACACAAAAGGATGGTTGAAAAGAATATATTTGGG  
 ATTTGTTCCGTTGCTGGAAGTTTTATCTCGAACATAAGATTAACTTAAAGAAAGTAATTTCTCTACAAAATTTCCA  
 GTTTTGAATGTTCTTACGAACAGATTATTTACTTGCCACAGCCAATTTCTTTTAGTAAAGTTGATTTTTTTTAA  
 AAAATATCACATCCGATAACGTAAGCTTTTTTTATATAAAAAGTTTTATTCTATTTTATATTTAAATATGTGA  
 ATGCCAATACAACCATCTAGTGCAACGAATTTGGATGAAAAAGGAGTGTGGAGCAATGTGATAAAATTAGTA  
 CCGAAAGGGTCTTGTATATAAAACCTGATATCAAAGCATTTAATAATACTAATTTTGTAGTAGATATGGATGAT  
 CTGCAAAAACACTCTTATATCCAGCGACACCACTTACCTATAAAAATCATTTGGTCATTCTGAAGGCGTTGGTTA  
 TTTTAAAGAAAAGTATTTATAGATGATCTGAAATTTCCAAGTACTTTTGAAGAATAGGTACAAAAATTTTG  
 ATAAGTTTGTCAATTAATAACTTAAGCAAAAACGTTGATATCTCGGCGTTCTTTTCACTAGCACTCGAAGG  
 AAAATATATAGGCGCATCTTTAATCGTTTTTCTAGCTATATCGAATCATATGGGTTACCACTCATCGAAGCTG  
 CTAGTTTAGGAAAAAAATCATTAGTAGTGATCTTCTTATGCCCGGATGTTTTAAAGGATTATAGCGGCGTAG  
 ATTTTGTAAATTTACAATAATGAAGATGGCTGGGCTAAGGCGTTGTTTTAATGTTTTAAATGGCAATTCGAAGCTCA  
 ATTTTAGGCCTTATGAAAAAGATAGTCGTTTCTTGGCCACAGTTCTTCTCTATTTTGAATAAGGTGATTTAT  
 GTTTTAATGGTAAAATATTGTTAATTACTGGTGGTACGGGGTCTTTCCGGTAATGCTGTTCTAAGACGTTTTCTTGA  
 CACTGATATCAAAGAAATACGTATTTTTTCCCGGATGAAAAAAAACAAGATGACATGAGGAAAAAATAATAA  
 TCCGAAACTTAAGTTCTATATAGGTGATGTTTCGCGACTATTTCGAGTATCCTCAATGCTTCTCGAGGTGTTGATTT  
 TATTTATCATGCTGCAGCTCTGAAGCAAGTACCTTCTGCGAATTCACCCAATGGAAGCTGTAAAAACGAATGT  
 TTTAGGTACGGAACGTAAGGAGCGCAATAGCTAATGGAGTTAGGCGAATTTGATGTTTGGAGTACAGATAA  
 AGCTGTATATCCTATCAATGCAATGGGATTTTCAAAGCGATGATGGAAAAAGTAATGGTAGCAAAATCGCGCAA  
 TGGTACTGCTCTAAAACGGTATTTGCGGTACACGTTATGGCAATGTAATGGCATCTCGTGGTTACGTTATCCC  
 ATTATTTGTCGATCTGATTAATCAGGTAGACCAATGACGATAACAGACCCTAATATGACTCGTTTTCATGATGAC  
 TCTCGAAGACGCTGTTGATTTGGTTCTTTACGCAATTTGAACATGGCAATAATGGTATATTTTTGTCCAAAAGGC  
 ACCTGCGGCTACCATCGAAACGTTGGCTATTGCACTCAAAGAATTACTTAATGTAACCAACACCCTGTAAATAT  
 AATCGGCACCCGACACGGGAAAAACTGTACGAAGCGTTATTGAGCCGAGAGGAAATGATTGCAGCGGAGGATAT  
 GGGTGTATTTATCGTGTCCACCAGATCTCCGCGATTTGAACTATGGAAAATATGTGGAACATGGTGACCGTCCG  
 TATCTCGGAAGTGAAGATTATAACTCTCATAATACTGATAGGTTAGATGTTGAGGGAATGAAAAAATTAAGTCT  
 AAAACTTCTTTTTATCCGGGCACCTTCCGTTCTGGTGAAGATTATGAGTTGGATTGATAATATGAAAATTTTAGTTA

CTGGCGCTGCAGGGTTTTATCGGTGAAATTTGGTATTCGGGCTTAAGGAAGCTGGATATAACGAACTCATTACGA  
TAGATCGTAACTCTTCTTTGGCGGATTTAGAGCAGGGACTTAAGCAGGCAGATTTTATTTTTACCTTGCTGGGG  
TAAATCGTCCCGTGAAGGAGTGTGAATTTGAAGAGGGAAATAGTAATCTAACTCAACAGATTGTTGATATCCTGA  
AAAAAACAAATAAAAACTCCTATCATGCTGAGTTCTTCCATCCAGGCTGAATGTGATAACGCTTATGGAAAGA  
GTAAAGCAGCTGCGGAAAAAATCATTGAGCAGTATGGGAAACGACAAAACGCTAAATATTATATTTATCGCTTGC  
CGAATGTATTCGGTAAGTGGTGTGACCAAATTTATACTCCTTTATAGCAACTTTCTGCCATCGCATTGCAAATG  
ATGAAGCTATTACAATTAATGATCCTTCAGCAGTTGTAATCTGGTGTATATAGATGACTTTTTGTTCTGACATAT  
TAAAGCTATTAGAAGGAGCGAACGAACTGGTTACAGGACATTTGGTCCAATTTATTTCTGTTACTGTTGGTGAAG  
TGGCACAAATTAATTTACCGGTTTAAAGAAAGTCGCCAAACATTAATCACCGAAGATGTAGGTAATGGATTTACAC  
GTGCATTGTACTCAACATGGTTAAGTTACCTGTCTCCTGAAACAGTTTGCATACCGGTTCTTCTTATAGTGATG  
ACAGAGGGGTATTCTGTGAAGTATTGAAAACGAAAACGCGGGCCAGTTTTCTGTTCTTTACTGCGCATCCAGGAA  
TTACTCGGGGTGGTCATTATCATCATTTCCAAAATGAGAAATTTATTGTGATCCGAGGAAGTGTCTGTTTCAAAT  
TTGAAAATATTGTGACGAGTGAACGATATGAACTTAATGTTTCTCTGATGATTTTAAAATGTTTGAACAGTTC  
CGGATGGACGCATAACATTAATAAATGGCTCGGATGAGCTAGTTGTTATGCTTTGGGCAAATGAAATATTTA  
ATCGTTCTGAACAGATACTATAGCGAGAGTTTTATCGTGAAAAAATGAAAGTCAATGTGCTGTTGTTGGACTCG  
TCCAGAAATTTATTCGACTCTCGCGTGTCTTGCAAAATTAGATGAATATTGTGACCACCTTATTGTTTATACACCGG  
GCAAACTACGATTATGAACTGAATGAAGTTTTTTTTCAAAGATTTGGGTGTTGCGAAAACCTGATTATTTCTTAA  
TGCCGCGAGTAAAAATGCAGCAGAGACTATTGGACAAGTTATCATTTAAAGTTGATGAGGTCCTTGAAACAGGAAAA  
ACCAGAAGCCATGTTAGTACTTGGCGATACTAACTCCTGTATTTGAGCAATACCAGCAAAGCGTCGGAAGAAATCC  
GATCTTCCATATGGAGGCTGGGAATCGTTGTTTTGACCAACGCGTACCGGAAGAACTAACAGAAAAATAGTTGA  
TCATACCGCTGATATCAATATGACATATAGTGATATCGCGCGTGAATATCTTCTGGCTGAAGGTTACAGGCCCGA  
TAGAATTTATAAAACCGGTAGCCCAATGTTTGAAGTACTCACTCATTATATGCGCGAGATTGATGGTTCCGATGT  
ACTTTCTCGCTGAATTTAACACCTGGGAATTTCTTTGTGGTAAGTGCACAGAGAAGAAAATGTTGATACCCC  
TAAACAACCTGTGAAACTGGCGAATATACTTAATACCGTGGCTGAAAAATATGATGTCCCGGTAGTTGTTTCTAC  
TCATCCTCGCACTCGTAACCGCATCAACGAAAACGGTATTCAATTCATAAAAAATATCTTGCTTCTTAAAGCCATT  
AGGATTTACAGATTACAACCATCTGCAAAAAATGCACGTGCTGTTTTATCGGATAGTGGGACTATTACAGAAGA  
GTCTCCATTATGAACTTCCCTGCACCTCAATATACGAGAAGCGCACGAAACGCCCCGGAAGGCTTCGAAGAAGGGCG  
AGTAATGATGGTGGTCTTGAATCTGATCGCGTTTTTACAGGCATTAGAAATATTGCAACACAGCCTCGTGGAGA  
AGTACGCTTACTTCGTGAGGTTAGTGACTATAGCATGCCAAATGTTTCAAGATAAAGTTCTGCGTATTATCCATT  
ATATACTGACTACGTTAAACGGGTTGTCTGGAAGCAATACTAATGAACTTGCATTAATCATTGATGATTATTTG  
CCCCATAGCACACGCGTTGGGGCTAAAATGTTTTATGAGTTAGGCCTTGAATTACTGAGCAGAGGCCATGATGTA  
ACTGTAATTACGCCTGACATCTCATTACAAGCAATTTATCTATTAGTATGATTGATGGTATAAAGGTTTGGCGCT  
TTCAAAGTGGACCTTTAAAGGATGTAGGTAAGGCTAAACGTCGCATAAATGAAACTTTTTATCTTTTCGCGCA  
TGGCGCGCATTTAAGCACCTCATTCAACATGATACATTTGATGGTATCGTTTTATTATTTCCCCCTCTATTTTTTG  
GGCGACTTGGTTAAAAAATAAAACAACGATGCCAGTGCCCAAGCTATCTGATCCTAAGGGATATGTTTCCACAG  
TGGGTCAATGATGACAGGTTGTTGAAAGCGGTTCCACCAATGAAAAATATTTTAGGTATTTGAAAAAAGTCA  
TATCAGCAGGCTGGCCGGATAGGGGTAATGTCTGATAAGAATCTTGAGATATTTGCGCCAGACCAATAAAGGTTAT  
CCGTGTGAAGTTTTACGTAATTTGGCCCTCAATGACTCCTGTGTCTGCCAGCGATGATTATCATTCACTTCGTCAA  
AAATACGATCTAAAAGATAAAGTCAATTTTTTTCTATTGGCGGTAATATTGGGCATGCTCAGGATATGGCAAACCTTA  
ATGCGCCTTGCAGCAATATGATGCGTTATCATGATGCTCATTTCCTGTTTATAGGGCAGGGTGTGAAGTTGAG  
CTGATAAAATCTCTTGCTGCAGAATGGAATTTAACTAATTTCACTCATCTACCTTCAGTGAACCAGGAAGAGTTT  
AAATTAATTTTATCTGAAGTTGATGTGCGCCTGTTCTCCCTTTCATCTCGCCATTCTTCACATAATTTCCCGGA  
AAATTAAGGATATGTTTCAATCAATCCCGATCCTTGGGAGTGTGAATGGCGGCAATGATTTAATGGATGTA  
ATTAATAAGCACAGAGCCGGTTTCAATCATGTTAATGGTGAAGATGATAAACTGTTTGAATCTGCACAATTTGCTT  
CTTAGTGATTCAGTTTTTAAAGAAACAGCTAGGTGAGAACGCTAATGTGTTGTTAAAGTCTCAATTTTCGGTTGAA  
TCGGCGGCACATACTATCGAAGTCCGACTGGAGGCTGGAGAATGCGTTTTAGTTGATGACAATATTTCTGGATGAAC  
TTTTTTCGCACTGCAGCAAATTTCTGAACGTTTGCAGGCTCATTATTTATTTGCACGCATCTCATCAGGAGAAGGTTT  
AACGTTTACTTATTGCATTTGTACGCGACAGCTATGTTGAACCCCATGGCATGAGTTACCGCATCAGTGGGAAA  
TGTTTGTGTCATGCAAGGGCAATTAGAAGTTTGTGTTGATGAGCAAATGGTGAAGATCCAAAACAGTTTGTG  
TTGGAGACGGTACGGGAATAAGCGTCTGGAATTTTCCCAGGAGATATACATAGTGTCAAATGCCGTGTACCCAA  
AAGCCCTTATGTTGGAGATAAAGGAGGGGCCATTTGACCCACTCAAAGCTAAGGCTTTTTCTAAGTGGTTATAGG  
GCGATACACCACCGTTTTATCTTCTATCTTATTCTATACATGCTGGGTTACCATCTTAGCTTCTTCAAGCCGCGC  
AACCCCGCGGTGACCACCCCTGACAGGAGTAGCTAGCATTTGACCACCCCTGACAGGATTAGCTAGCATATGAGC  
TCGAGGATATCTACTGTGGTACCCGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACCTTCTAGAGA  
ATAGGAACCTCGGAATAGGAACATAAGGAGGATATTCATAT

**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)

ATGACGAATTAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCGATACCC  
 AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAA  
 GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGTCAAAAACCACTTCGACACCTTTATGAGTTAGAATCA  
 CTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAACTACAGTCCATCTGTCCCGGGCGTGACCATTATG  
 AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGGACCTGCCATTGGTGACAACCCCA  
 TTTGTGCGTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGTGCCATG  
 ATTGCACGTTTCAACGAAACGGGCCGACCCAGGTGCTGGCAAAACCTATGCCGGTGACCTCTCTGAATACTCC  
 GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGAT  
 CAGCCGACAGCGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTGCGTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAACG  
 GAACGTAACCTCAGCTATAGGCATGCATGCGAGTGTCTGTGTAGCTGTAAGCCAGGGGCGGTAGCCTGCATTAATC  
 GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTCGCGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG  
 TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA  
 TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATATAACGGCAGTGAATAATCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAA  
 TCTTCTGCCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA  
 GGATTTTCTTGTTCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA  
 ACGCTCGTCACATCATAGGCATGCATGCGAGTGTCTGTGTAGCTGTAAGCCAGGGGCGGTAGCCTGCATTAATC  
 CTCTATTAATCAAACCTGAGAGCCGCTTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGCTAGCGTG  
 AAGATACTTGTACTAGGGGCGCAGGATTTATTGGTCTGCTGTAGTTCGTACATTATAAATAATACGCGAGGAT  
 AGTGTGTTAATGTCGATAAATTAACGTACGCCGAAACCTGGAATCACTTGTGATGTTTTCTGACTCTGAACGC  
 TATGTTTTTGAACATGCGGATATTTGCCGATGCTGCTGCAATGGCGCGGATTTTTGCTCAGCATCAGCCGGATGCA  
 GTGATGCACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTGGATCGTTCAATTACAGGCCCTGCCGCAATTTATTGAAACCAATAT  
 GTTGGTACTTATGTCCTTTTGGAAAGCGGCTCGCAATTAAGTCTGGTCTGCTCTTGTGATGGCGACAAGAAAAATAGCTTC  
 CGTTTTTCATCATATTTCTACTGACGAAGTCTATGGTGAATTTGCCCTATCCTGACGAAGTAAATAAAGAAACAA  
 TTACCCCTCTTACTGAGACGACAGCTTACGCGCCTAGTAGTCTTATTCGCATCAAAGCATCCAGCGATCAT  
 TTAGTCCGCGCGTGGAAACGTACCTATGGTTACCGACTATTTGTGACTAACTGTTGGAATAACTACGGTCTTAT  
 CACTTTCCGGAAAAATGATTCACACTAGTAATTTCTAATGCTCTGGAAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAA  
 GGGGATCAAATTCGTACTGGCTGTATGTTGAAGATCATGCGCGTGCCTTATATACCGTAGTTACTGAAGGTCAA  
 GCGGGTGAACCTATAACATTTGGCGGACACAACGAAAAAGAAAAACATCGATGTTGTGCTGACTATTTGTGATTTG  
 TTGGACGAGATAGTCCCAGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAAATTAATGTTGCTGATCGCCAGGGCATGAT  
 CGCCGTTATGCGATTGATGCTGAGAAGATTGGTTCGCGAATTTGGGATGAAACCACAGGAAACGTTTGAAGTGGG  
 ATTCGTAACCGGTGGAATGGTATTTGGCTAATGCAAAATGGGTTGATAATGTGAAAGTGGTGCCTATCAATCG  
 TGGATTGAACAGAACTATGAGGGCCGCCAGTAATGAATATCCTCCTTTTTGGCAAAACAGGGCAGGTAGGTTGGG  
 AACTACAGCGTGTCTGGCACCTCTGGTAATTTGATTGCTCTTGTGATTTCACTCCACTGATTACTGTGGTGAT  
 TTAGTAACCTGAAAGGTGTGGCTGAAACAGTCAAAAGAAATTCGACCTGATGTTATTGTTAATGCTGCGGCTCACA  
 CCGCAGTAGATAAGGCTGAGTCAGAACCAGAAATTTGCACAATTAATCAATGCGACTAGCGTTGAATCAATTGCAA  
 AAGCGGCAAAATGAAGTTGGGGCTTTGGGTAATTCATTACTCACTGACTACGTATTCCTGGAAATGGCGACACGC  
 CATGGCTGGAGATGGATGCAACCGCACCGCTAAATGTTTACGGTGAACCAAGTTAGCTGGAGAAAAAGCATTAC  
 AAGAGCATTTGTGCGAAGCACCTAATTTCCGTACCAGCTGGGTCTATGCAGGTAAGGAAATAATTTCCGCAAAA  
 CGATGTTGCGTCTGGCAAAAGAGCGTGAAGAAGTACCGCTTATTAATGATCAGTTTGGTGCGCCAACAGGTGCTG  
 AACTGCTGGCTGATTGTACGGCACATGCCATTCGTGTGCGACTGAATAAACCGGATGTCGAGGCTGTACCATT  
 TGGTAGCCAGTGGTACCACAACCTGGTACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAATGCAGGCATTC  
 CTCTGCACTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAACAACCTGCCTATCCTACACCAGCTCGTCCACATAACTCTC  
 GCCTTAATACAGAAAAATTTACAGCAGAAATTTGCGCTTGTATTGCCCTGACTGGCAGGTTGGTGTGAAACGCATGC  
 TCAACGAATTTATACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTGATGGTGGAGCAAGATGAATTA  
 AAAGGAATGATGAAATGAAAACGCGTAAAGGTATTTATTTAGCGGGTGGTCTGGTACTCGTCTTTATCCTGTGA  
 CTATGGTTCGTGAGTAAACAGCTATTACCTATATATGATAAACCGATGATCTATTATCCGCTTTCTACACTGATGT  
 TAGCGGGTATTCGCGATATCTGATTATTAGTACGCCACAGGATACTCCTCGTTTTCAACAACCTGCTGGGTGACG  
 GTAGCCAGTGGGGCTGAATCTTCAGTACAAAGTGAACCGAGTCCGGATGGTCTTGGCGAGGCATTTATTATCG  
 GTGAAGAGTTTATGGTGGTGTGATGTTGTCTTTGGTACTTGGTGATAATATCTTCTACGGTCAAGACCTGCCTA  
 AGTTAATGGATGCCGCTGTTAAACAAAGAAAGTGGTGAACCGGATTTGCCTATCACGTTAATGATCCTGAACGCT  
 ATGGTGTGCTTGTGATTTGATAAAAACGGTACGGCGATCAGCCTGGAAGAAAAACCGCTACAACCAAAAAGTAAT  
 ATGCGGTAACCGGGCTTTATTTTTATGATAACGACGTTGTGCAAAATGGCGAAAAATCTTAAGCCTTCTGCCCGG  
 GTGAACTGGAATACCAGATATTAACCGTATCTATATGGAACAAGGGCGTTTATCTGTTGCCATGATGGGGCGTG  
 GTTATGCGTGGTTAGACACGGGACACATCAGAGCCTGATTGAGGCAAGCAACTTTATTGCAACAATGGAAGAGC  
 GTCAGGGGCTGAAAGTTTTCTGCCCGGAAGAAATGCTTACCCTAAAGGGTTTTGTTGATGCTGAGCAGGTGAAAG  
 TATTAGCTGAACCTCTGAAAAAATGCTTATGGTCAGTATCTGCTGAAATGATTAAGGTTATTAATAAATG

AACGTAATTA AAAACAGAAATTCCTGATG TACTGATTTTTGAACCGAAAGTTTTTGGTGATGAGCGTGGTTTTCTTT  
TTTTGAGAGCTTTAACCAGAAGGTTTTTGGAGGAGCTGTAGGCCGCAAAGTTGAATTTGTTTCAGGATAACCATTCG  
AAGTCTAGTAAAGGTGTTTTACGCGGGCTGCATTATCAGTTGGAACCTTATGCACAAGGAAAATGGTGCCTTGC  
GTTGTCGGTGAAGTTTTGACGTAGCTGTTGATATTCTGTAATCGTAAATCGTCATCGACTTTTTGGCAAATGGGTTGGGTG  
AATTTATCTGCTGAGAATAAGCGGCAATTGTGGATTCTGAGGGATTTGCACATGGTTTTTTAGTGCTGAGTGAG  
ACGGCGGAGTTTTTGTATAAGACGACAAAATTATTATCATCCTCAGAGTGATAGAGGAATAAAAATGGGATGATCCA  
AGCATCAATATTTTCATGGCCAGTCGATTCACAAGTGTCTATCAGCTAAAGATAATAAGCATCCTCCATTAACA  
AAGATTGAAATGTATAGTTAAGATCAGGATAAATCTTGAAGGGTTGCAAAAATTGAATAAAATAGTGAGCAAAAG  
TGAATAAGGAACGTAATCCACAATGCTGGCTATATGATGATTACTCAGATAGCTTTATATGTTGCACCATTATT  
TATACTGAGTTATCTGTTAAAAACACTGGGGTTGCACAGTTTGGTAATTTATGCCTTAATACTATCAATCGTTGC  
ATATTTACAGATTATAACGGATTATGGTTTTCTTTTTGCAAGTGTGCGATCTCACAGAATAGAGAGGACAA  
AGAATATATATCAAAAATTTATCTGTCAACTATGACTATCAAGTTGGCGATATGCGCTTTCTTATTCTTATTGCT  
CATGCTATTTTTAAATCTTTTGCCTGTGCAAGCTGAATTAACAAGGAATATTATATGGATATCTTCTTGTAAAT  
AGGAAATACTTTCCAACCACAATGGTTTTTCCAAGGTATCGAAAAATTA AAAATCATAGCCCTTTCTAATGTTAT  
ATCAAGATGCGCCGGTGTTTACTTTGATTTATCTATGTGAGGAATAGCGAGGATTTACAAAAGCACTTTTGTAGT  
ACAGTCACTTCCATTAGTAATTTCTGCGATTGGATTAATATATTTATATTTGAAATATATCAATATTTTTC  
GGAAAAAATTTTAAAGGTAATTTTAAAAGAAGGTAAGGATTTTTTTCTTGCATCACTTTATTCTGTTATTCT  
CAATAATAGTGGCATTTTTCTATTAGGGATTTTTACTAATCCTGTTATTGTTGGTGTATATGCCCGCTGAAAA  
GATAGTCAAGGCCGTATTGTGCTATTACACCCTGACGCAAGCTATATATCCTTATAAATTTGTCGTAAGTTTTCT  
ACTATCCGATTTTACCGCATTGAGGCAGCAAAAAAACTGGTATACCAATATAAATTTTAGCATTTATAGCTGC  
GTTTATCGTTGCAATTACCTTACCTGTTGCAATCGACTATCTTAATTTTCCAAAAGAAACAAATTTTGTAGTCA  
AATATTAAGTGCATGGATCTTTTTTGGTGTCTTAAATAATGTATTCGGCATTCAGATATTGAGTGCATCAGGAAG  
AAGTAAAAATATATAGTAGGATGGTATTCGTATCAGCGCTTATAACATTACTTTTGATTACTCTATTATTGCAGTT  
TTGTAACGCCACTGGATGGCATGTGCAATATTTGGGTGAAATGTTCTTATCAATATTGTTACTTAAGCGATA  
TAAAAAATAAATTTAAGGAATAGTTATGAAGAAGTTATTTATAGTGTTCGGTACTAGGCCGAAAGCAATAAAGAT  
GGCCTCTATCATTTGAATTTAAAAAAGATTGTAGATTGCAATATAAAAATATGTGTGACAGGCCAACATAAAGA  
GATGCTTGATCAAGTTATGCAAGTATTTGATGTTAAACCTGATTATAATTTACGGATTATGCAGCCTGGGCAAC  
ATTAGTATCTATAGCAACAAATATACTCTCACGGTTAAGTGAAGTTTTAATATAGAAAAGCCAGATATTATACT  
TGTGCATGGGGATACAACGACTACCCTTGGCTGCTACTTTAGCTGGGTATTACCACCAATAAAAAGTTTTGTCATGT  
GGAAGCAGGATTAAGAACAGGGGATATTTACTCTCCTTGGCCTGAAGAGGGCAATCGTAAAGTTACAGGGGCATT  
AGCATGTTATTCATTTCCGCCAACAGAGAGATCAAAAGATAATCTCCTGAGGGAGGGGTCAAAGTAAATAATAT  
ATTTGTAACGGTAATACCGTCACTCGACTCTTTATTTATTGCAAAAGATATCATAGATAATGACCCTAATATAAA  
GAACGCTTTACATAATAAATTTAATTTTCTTGATAAAAGCCGACGAGTAGTACTTATAACAGGTCATCGAAGAGA  
AAATTTCCGGAAAGGTTTTGAAGATATATGCTTTGCAATAAAGGAATTAGCTTTTATTATCCTAATGTAGATTT  
TATTTATCCGGTGCATCTTAATCCCAATGTAATGGAACCAGTACATCGTATATTAGATAATATATGTAATATTTA  
CCTTATTGAGCCCTGGATTATTTGCCTTTTGTATTTAATGAATGAGTCATATTTAATATTGACTGATTCCAGG  
GGGGATACAAGAAGAAGCGCCTTCGTTAGGTAACCCTGTTTTGGTTATCGGTGATACTACTGAACGCCCTGAGGC  
GTTTGAGGCTGGTACTGTTGTATTAGTGGGGACTTCTAAGATAAAAATAGTAAATAAAGTAAACGGAGCTATTAAA  
CAATGCTGATATCTACAATGCTATGCTCTGTTACATAATCCATATGGCGATGGAACAGCTGCTCAAAAAATCT  
TAATGTGCTCGCCCAAGAGCTAATTTAATTTAAGCTAAAAATATGTTATTAATTTATTGCTGATTATCCAACGAA  
ATGAATATGCGCGAGGAGCTATGCAACGAATAGATGCGATAGACTCTCTCATTGAGATCGCAAGCGAGTGTAT  
TTGAATATTTTATTCAAAAAGCATCTAGTTGCGCTCAAATAGTTTCTTTAATAATGTTATAGTTGAAAATCTAAT  
GCAATTATTACAGAAACATCATAAAACAGTACATGCAAAAATCAACAATATATATGTTTATTCTGTTTATAAT  
TTATTAAGGTTATAACGCTCATTGATCTAAAAAACAATTTCTTGATATACATGGTGTGTACCGGAAGAAGCTT  
TTGGCAGATAATAAAAAATTAAGTAAAGTATATAACATGGTGGAAAAAAAAGGTGTCCTTGGATGCAAAAA  
TTAATACACGTCAGTACAGAAATGCAAAAACACTATGAAGCAAAAATATGGAGTAAACTTGGCTGAAAGGTCAATA  
GTGCTCCCGATTTTTGAATATAAAAATATAACCCAATCGCAAAACAAATGGACAGAAAATAAAATACGAAGTATC  
TATCTTGGAGGATTACAAACATGGCAAAATATTGATAAAATGATTCAAGTTTGTGATGACACAGTGATAAACAA  
GAAGCAGGTAAGTATGAATTTCACTTTTTCATCCCACAGAGTAACTTGGAAAGGTTTTATAGATAAATATTCGTTA  
AAATACATAATATCAATGCTAATGCATCTACGCTATCACGTGATGAAGTAATTCCTTTCTAAAAGAATGTCAT  
ATTGGTTTTGTATTGCGCGATGATATAATAGTAAACAGAGTTGCGTGCCCTACAAAATGGTTGAATATTTAGAG  
TGTGGTGTGTTCCAGTTGTGCTCTCCCACTTATAGTGATTTTTTATTCGATGGGATATCAATACATTACTACA  
GAGGAAATGGCTAACAGAAGTATAAGTTTGTGGATCTTGA AAAAATGGCTGCACATAATTTACAAATTTTACT  
TCTTATCAGAAGAGAACTACAAGGCACAGAAAGAACTTATTGCTCAACTGTGCTGAATTTTTTACATATATAAA  
ATTATGTAAGCATATCGCGGGTCAGGTAATTTGATGCGTATCAAATATAAAGATAACGGTTATATATTATGTTTT  
CTATTATGTTTCATTTGAGCTACTTAGTTTTACTCAAATCTGACTACTTTCTGCTGATTTTCTGCCATATACA  
GAAATATACGATGGGACATACGGAGAAATCAATAATATTGAGCCTGCCTTTTTATATTTAACACGGTTGTTTCAT  
TATTTAAATTTCCCTATATATTTTTTGCAATGTTAGTTTTGTGCCTTATGTTTAAAGTTGAAAAATAAATATGCA  
AGAAAAATAAATAAGATAGTTATATATATTTGTTCTGTATGATATGATCATTATTTATGTTTTTGCATGAA  
ATGACTCAATTGCGCATAGCAATTGCAGTCACTATGTGCTATGTGTCGGTTTTATTATTACTTTTATAAAAATTTGT

ATTAACATGCACTGCCATGGATGGTGTGGCTATTTTGTTCATTACAGCGCCTTGCTTTTATTTATGTCATTA  
 TTTATATACAGTTATAGGAGGTTATTAATAGTAATTAAGGGTTTGTAAATATGTATGAGCTTTTTAAACGTGTAT  
 GCAGATACAATTGCACATATATTTGCCAATGAAAAAATAGTAAATTTATATATAGTAAATCATCATCATAGAC  
 AATAGAATGATTTGGCAATATTCAACCTGAATAATATAATATTTTTTATCAATATTTATTTTGATCTTTATCTT  
 AGCCGATATATAAAATTAATGATAATGAGGCGAAGTTTATTAAGTATGTGCAATGTTGAGGAATATTAGCCTTT  
 TGTATTTCTTTCTGGCTAGTGGAGTCCCGGTGCTTATCGAAGTGCAGAGTTGCTGCGAATATTTTATCCG  
 ATGGCTTAGTATTAATCCTTTTCGCATATAAAAAATAAATATGCGTTATTTTATTGCAAGTATTATAGTTATC  
 CTTTCAGGCTTAATGTTGTTTATAACACTAAGGGCTGTATCAATAGTTGGTCAAGGATTATAAAATGAATGTTGC  
 TATTTTGTGTCTACGTATAATGGCGAAAAATATTAGAGGAACAACCTGGATTGCTGCTTCAAAGTTATCA  
 GGATTTGTAGTATATCCGTGATGACGGATCATCTGATAGAAGTAAATATAAATAAACCATAACGTAATGAA  
 AGATAACAGATTTTAAACGTGGGTAATTCAGAAAATCTTGGTTGTGCTGCTTCGTTTATTAATTTATTAAGAAA  
 TGCTTCAGCCGATATTTATATGTTTTGTGACCAAGATGATTATTGGCTTCCGAATAAATACAGCGTGTGTGGA  
 TTATTTTTCGGCTATTGATCCTTTACAACCTACCTTGTATCATTGCGATCTAAGCGTTGTTGATGAAAACTTAA  
 TATTATACAAAATTCATTTTTCAGCATCAGAAAATGTCAGCGTATGATTCAATGAGAAAAATAATCTTTTCAT  
 ACAAATTTTGTGTTGGTTGTTTTCATGTGCTGTTAATGCTTCACTTTCGGAATTTGTTCTTTTCGCAATTTGGA  
 GCAGCATGTA AAAATGATAGCTATGCATGACTGGTGGTTAGCCGTGACTGCAAAAACCTTTTGGTTCGAATCCATTT  
 TGATAACTCAAACGATTTCTTTATCGACAACATCAGGGCAATGTATTAGGTGCAAAAATCATCAGGTATGATGCG  
 TTTTATTCGATTAGGATTAATGGGCAAGGGATTTTCGCGAGTAGTATCTTTTAGAAAAAAGTTTGTGCGCAAAA  
 TAAGCTTCTTTAGATGCTATGATAAAGATTTAAATCTTTCGCAAAAAAATCTATCAGGCTTGTAAATGAGGG  
 CCTTAAAGAGAAGCTTCAATGCTGACCTTTTAAATGTTTCTATCATGGTAGCTATATGCAAGGTTTTAAACG  
 TAATCTTGCCTTAATATATTCAGTCTTTACACAAAAAAGAAGATAGTGTATCCTTATGAAAAAATGCTAT  
 TATCGGTACTGTTGGCATACCAGCATCATATGGCGGATTTGAAACATTAGTTGAAAATTTAACAAAGATACAATTC  
 CTCGGGAGTTGAATATAATGTTTTTTGTTTCATCGTTTTCACTACAAATCCACCAAAAAAACATAATGGGGCCG  
 TTTAATTTATATTCGCTTAAAGCCAATGGATGGCAGAGCATTGCGTATGACATAATTTGTTAGCATATTTCTAT  
 TTTTTTGAAGCCTGATGTGATTCTGATTTTAGGGGTTTCTGGTTGTTCAATTTTGCCTTCTTCAAACCTTTAAC  
 ACGCGTAAAGTTTATTACTAATATTGATGGCCTGGAATGGCGAAGAGATAAATGGAATTCAAAAGTGAACGTTT  
 CTTAAAATTTTCAGAAAAATCGCAGTTCAATATTCGGATGTCGTTATTACGGATAATGAGGCAATTTCTGAGTA  
 CGTTTTTAAACGAGTATAAAGATAGCCGAGTTATTGCTATGGAGGGGATCATGCATGGTTAAACTACTGAGGA  
 TGTATTTACAACAAGAAATATAAAGCGATTACTACTCTTCTGTATGTCGATATCGAACCCGAAACAAATGTAGA  
 ATTAATTTTAAAACATTTTCAAAGCTAAAATATAAAAATAAATTTATTGGAAATTTGGAATGGCAGCGAGTTTGG  
 AAAGAACTTAGGCTGCATTTCTAACTATCCAAATATTGAAATGATTGATCCGATTTATGATCTTCAACAAT  
 ATTTCACTTACGAAATAATTGCATAGGATATATACATGGTCATTGCGCTGGAGGAACAACCCCTTCTTTAGTCA  
 GGCAATGCATTTTAGTAAACCTATATTTGCATATGATTGTAAGTTTAAATAGGTACACTACTGAAAATGAAGCATG  
 TTATTTTCTAATGAATCTGACCTCGCAGAGAAAATCATAATGCATTGTGAGCTATCATTAGGTGCTCTCGGCAC  
 GAAAATGAAAAGAAATGCTAACCGAATAACACTTGGAGAGCAATAGCAGAAATGTATGAGGATTGCTATTAAC  
 CTGTTAAACTTCAAATCTTTTACAATATATGGCATGACTATAAGCGCATTAATTTGTTTTTCAAGCCGCTCTCGCG  
 GTGACCACCCCTGACAGGGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCTTATACTTTCTAGAGAAATAGGAA  
 CTTTCGGAATAGGAACCTAAGGAGGATATTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATA  
 CTTTAAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTCAGGCGCGGAGCATTGAGCGCGGTGATCACACCTGAC  
 AGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCCTCAACA  
 TCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGAAGTATTGCGGAAATC  
 CAGGCAAGAACTGGTTCTTACTATACGGTGAAGAGTTTGTGCAATCTCTGGAACGCTCGTTCGCTCCTGT  
 TAATGGTGAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCA  
 TCATTGATGGTGGTAACACCTTCTTCCAGGACACTATTGCTGTAATCGTGAGCTTTTCAGCAGAGGGCTTTAACT  
 TCATCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAG  
 AAGCCTATGAATTTGGTAGCACCGATCTGACCAAAATCGCCGCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCT  
 ATATTGGTGGCAGGTGCTACTATGTGAAGATGGTTCAACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGA  
 TTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCAACGAAGAAGTGGCGCAGACCTTTACCGAGT  
 GGAATAACGGTGAACCTGAGCAGTTACCTGATCGACATCACCAAGATATCTTCAACAAAAAGATGAAGACGGTA  
 ACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACCGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGG  
 ATCTCGCGAACCGCTGTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTTGACGTTATATCTCTTCTGAAAGATCAGCGTG  
 TTGCCGATCTAAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGGCGACAAGGCTGAGTTTATCGAAAAAGTTT  
 GTCGTTGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGAAGAGT  
 ACAACTGGGATCTGAACTACGGCGAAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCAGGTGCGCAGTTCCCTGC  
 AGAAAATCACCGATGCTTATGCCGAAAATCCACAGATCGTAACCTGTTGCTGGCTCCGTAACCTCAAGCAAATG  
 CCGATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGTGCTGTTGCTTATGCGATACAGAACGGTATTCCGGTTCCGACCTTCT  
 CCGCAGCGGTTGCCTATTACGACAGCTACCGTGTGCTGTTCTGCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTGACT  
 ATTTTGGTGCGCATACTTATAAGCGTATCGATAAAGAAGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

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

ATGACGAATTTAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCCTGCCACTAAGGCGATACCC  
 AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAA  
 GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTATGAGTTAGAATCA  
 CTCCTTGAGCAGCGCTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAATACAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG  
 AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCA  
 TTTGTGCTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGTGCCATG  
 ATTGCAGTTTTCAACGAAACGGGCCGAGCCAGGTGCTGGCAAAACGATATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCC  
 GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTTGTTGAATTTATCGAAAACCCGGAT  
 CAGCCGCAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTTCGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAAGT  
 GAACGTAAGTACTCAGCCTGGTGCATGGGACGTTATTCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAACAATCC  
 GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG  
 TATGGCTACGCAACCTGAAAGAAGGGCGAAGTTCGCTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA  
 TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAATAATTCGACGCAAAAGTAATTTGTTGCGAA  
 TCTTCCTGCCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA  
 GGATTTTCTTGTTCAGAGCGGATTTGGTAAGACAATTAGCGTTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA  
 ACGCTCGTCACATCATAGGCATGCATGCAGTGTCTGGTAGCTGTAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC  
 CTCATTAATCAAACCTGAGAGCCGCTTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGTGAAAAATA  
 CTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTTGGTTCAGCTGTAGTTCGTCACATTATAAATAATACGCAGGATAGTGTT  
 GTTAATGTCGATAAATTAACGTACGCCGAAACCGGGAATCACTTGTGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATGTT  
 TTTGAACATGCGGATATTTGCGATGCACCTGCAATGGCAGCGATTTTGTCTCAGCATCAGCCGGATGCAGTGATG  
 CACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTTGGT  
 ACTTATGTCCTTTTGGAGCCGCTCGCAATTACTGCTGTCTGCTCTTGATAGCGACAAGAAAAATAGCTCCGTTTT  
 CATCATATTTCTACTGACGAAGTCTATGGTGTATTTGCCTCATCCAGATGAAGTAATAATACAGAAGAAATTACCC  
 TTATTTACTGAGACGACAGCTTACCGGCCAAGCAGCCCTTATTCGCGATCCAAAGCATCCAGCGATCATTTAGTC  
 CGCGCATGGAAACGTACGTATGGTTTACCAGCATTGTGACTAATTGCTCGAACAACATATGGTCCGTATCACTTC  
 CCGGAAAAGCTTATTCATTGGTTATTTCTAATGCACTGGAAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAAAGGGGAT  
 CAAATTCGCGACTGGTTGTATGTAGAGGATCATGCTCGTTCGCTTATATACCGTTCGTAACCGAAGGTAAGCGGGT  
 GAACTTATAACATTTGGCGACACAACGAAAAGAAAACATCGATGTTGTGCTGACTATTTGTGATTTGTTGGAT  
 GAGATTGACCGAAAAGAAAATCTTATCGTGAGCAAAATTAATTTGCTGATCGCCAGGGCATGATCGCCGT  
 TATGCAATTTGATCCCGATAAAAATTAGCCGCAATTTGGCTGGAAAACACAGGAAACGTTTGAGAGCGGGATTCGC  
 AAAACGGTGAATGGTATCTGGCTAATACAAATTTGGTTGAGAATGTGAAAAGCGGTGCTTATCAGTCATGGATC  
 GAACAAAATATGAGGGCCGTGAGTAATGAATATCCTGCTTTTTCGGCAAAACAGGGCAGGTGGGTTGGGAACTGC  
 AGCGTGTCTGGCGCCGCTGGGTAATCTGATCGCTCTTGATGTTCACTCCACTAATTTATGTTGGAGATTTTCAGCA  
 ACCCCGAAGGTGTGGCAGAAACCGTCAAAAAAATTCGTCCTGACGTTATTTGTTAATGCTGCTGCTCACACTGCAG  
 TAGATAAAGCAGAATCAGAACCGGATTTTCGCACAATTACTTAACGCGACAAGCGTCGAAGCGATTGCAAAAGCTG  
 CTAATGAAAGTCGGGGCTGGGTTATACACTACTCTACTGATATGTTTTCCAGGCAGTGGTGACGCGCCATGGC  
 TGGAAACGGATGCAACAGCACCCGCTAAATGTTTACGGTGAAAACAAAATTAGCTGGGGAAAAGGCATTACAAGAAC  
 ATTTGCGCAAAGCATCTTATTTCCGTACCAGCTGGGTATACGCTGGTAAAGGAAATAACTTTGCTAAAACGATGT  
 TGGCTTTGGCAAAAGAACGCGAAGAACGGCTGTGATAAACGATCAGTTTGGCGCACCAACAGGTGCTGAATTGC  
 TGGCTGATTTGACCCGCTCATGCCATTCGCGTGGCATTAATAAACAGAAAGTCGCTGGCTTGTACCATCTGGTAG  
 CAAGTGGCACAACAACCTGGCAGATTTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGGATTAATCTTG  
 CACTTAACAAAATTAACGCCGTGCCAACACGGCCATCCACACCCAGCCGTCGACCCCACTAATCTCGCCCTCA  
 ATACAGAAAAGTTTACGAGAACTTTGCGCTTGTCTTGCTGACTGGCAGGTGGGCGTGAAACGATGCTCAACG  
 AATTTATTTACGACTACGGCAATTTAACAAATTTTGCATCTCGCTCATGATGCCAGAGCGGGATGAATTAAGG  
 AATGGTGAATGAAAACGCGTAAAGGTATTATTCTGGCTGGTGGTTCCGGCACTCGTCTTTATCCTGTGACGATG  
 GCAGTGAGTAAACAATGCTGCCGATTTATGATAAGCCGATGATTTATTTATCCGCTTTCAACGCTTATGTTAGCG  
 GGTATTCGCGATATTTCTATATTAGTACGCCACAGGATACACCCGCTTTCCAACAATTTATGGGGACGGGAGC  
 CAGTGGGGTCTTAATCTACAGTATAAAGTACAACCGAGTCCGGATGGCTGGCGCAAGCGTTATTTATTTGGCGAA  
 GACTTTATTTGGTGGTGTGATTTGTGCACTCGTACTTTGGCGATAATATCTTCTATGGACACGTTATGCCGAAATTTG  
 ATGGAAGCTGCTGTTAACAAAGAAAGCGGTGCAACGGTATTTGCTTATCACGTTAATGATCCTGAACGCTATGGT  
 GTCGTGGAGTTTGATAAATACGGTACGGCAATTAGCCTGGAAGAAAACCGCTGGAGCCAAAAGCAACTATGCG  
 GTTACTGGGCTTTATTTCTATGACAATGACGTTGTGGAATGGCTAAAACCTTAAGCCTTCTGCCCGTGGCGAA  
 CTGGAATTTACCGATATTAACCGTATTTATATGGAACAAGGACGTTTGTCTGTAGCCATGATGGGGCGTGGCTAT  
 GCATGGTTGATACAGGGACGCATCAAAGCCTTATTGAAGCAAGTAACTTCATTGCAACAATTAAGAGCGCTCAG  
 GGATTAAGGTATCTTGGCCGGAAGAGATTGCTTACCCTAAAGGGTTTATTGATGCCGAGCAGGTGAAAGTATTA  
 GCCGAACCGCTTATCAAGAATCAATATGGTCAATATTTGCTGAAAATGATCAGCGAATAGTATATGGGAACTCAA

TGATGGATATTAATTAATCTCTTTGCAAAAACATGGGGATGAGCGCGGTGCATTAATGCTCTTGAAGAGCAAC  
 GAAATATACCTTTTCGAAGTCAAAAAGATATATTACATACTTGAGACTCTTAATGGAGTAAGACGCGGATTTTCATG  
 CGCACAGGTTACTCGTCAGTTAGCTATTTGTAGTCAAGGGAGCTTGTAAATTTTCATCTGGATAATGGTAAAGAAA  
 CAAAGCAGGTGGAACCTTAATGATCCAACAATTGCGTTGCTGATAGAACCCTATATATGGCATGAAATGATGATT  
 TTAGTGATGATTGTGTGCTGCTTGTAAATGCGGATGATTTCTATAAAGAGTCTGATTATATCCGCAATTATGATG  
 ATTTTATTAGAAGAGTAAATCAATTGAGAATTCATAAGCTAAGTGACGTCCAGACAACATCAATTTGGTGATGGA  
 ACAACTATCTGGCAGTTTGTGTGATACTAAAAGGTGCTGTAATTTGGTAATAATTGCAACATCTGTGCAAAATACC  
 TTAATTTGAAAATAACGTTGTAATTTGGTAACAATGTCACAGTCAAAAGCAGGTGTGTATATTTGGGATGGCGTTAAA  
 ATAGAGGATAATGTTTTATTGGTCCTTTGTGTAGCATTACAAATGATAAGTATCCTCGCTCTAAAGTCTATCCT  
 GATGAATTTTTGCAAAACAATAATACGCAAAGGAGCATCAATAGGTGCTAACGCAACCATCCTGCCAGGAATTGAA  
 ATTTGGTGAAAAGCAATCGTTGGTGCGGGGAGTGTGTAACCAAAAATGTACCGCCATGCGCAATAGTAGTAGGT  
 AATCCAGCTCGATTTATTAATGGGTAGAGGATAATGAATAAAATGATTTTTTAGATCTTTTTGCAATTAACCA  
 GCGACAGCAAAAGAATTAGTCTCTGCGTTTAGTAGGGTCTAGATTCTGGTTGGTATATCATGGGCGAAGAAGT  
 TGAGCAGTTCGAGAAAGAGTTGCGAGAATACTGTGGAGTTAAGTATTGCATTGGTGTAGCAAATGGCCTTGATGC  
 GTTGATACTAGTATTGAGGGCATGGAAGAAGTGGCTATCTTGAAGACGGTGACGAGGTATTAGTACCGGCAAA  
 TACATATATTGCTTCTATCTTGTCTATAACAGAGAACAACCTGTTCTGTTCTTGTGAACAGATATAGAAAC  
 TTATAATATTAATCCTGCTTTAATTGAAAATACATTTACGGAAAAAACTAAAGCAATATTACCGGTTCACTTATA  
 TGGTCTATTGTGCAATATGCCAGAAATTAGTGCAATCGCCAGAAAATATAATCTGTTGATTCTTGAAGATTGTGC  
 ACAAGCACATGGTGCAATACGTGATGGTGCAGGCTGGAGCTTGGGGGATGCTGCAGGATTTAGTTTTTATCC  
 AGAAAAACCTTTGGAGCTTTGGGGGATGCGGGGAGCTGTTACTACAATAATGCAGAAATATCCTCACTATAAAA  
 AGCTTTGCGAAATTATGGGTACATAAGAAAATATGAAAATATTTATCAGGGATTGAATAGTGCATTGGATGAACT  
 GCAAGCAGCTTATTGCGTGTAAAATCCATACATTTACCGAAGTACTGCGATTCCGATTGTACGAAGGCCAAGGTGCGCATGTTTGGCATT  
 ATATTTCGTGAAATAAAAAACCTGCCGATTACGTTACCAGTGTACGAAGGCCAAGGTGCGCATGTTTGGCATT  
 ATTTGTAGTAAGAATCGCTAATCGTGAAAATTTCCAGTCACTATTATAGAGAAGGGTATCAAAACCTTAATTC  
 CTATCCATTACCACCCATAAGCAGCAAGCATATCAAAATATGTCTAGCCTTAGCCTTCAATTACTGAGCAAAT  
 TCATGATGAAGTCATTTCTTTACCTATAAGTCCGGTAATGAGTGAAGATGATGTCAATATGTAATCAAAATGGT  
 CAATGATTACAAGTAATGAAAAATTTCTTCAGGTAACATATATTATCCGCTATCTATACATTCATTAATGATT  
 GCGGGTTTTATCATCGGTAAGGTAGTAGCAATTTATACAGGGCCATCAGGGGTAGCAATGCTTGGCCAAAGTGC  
 AGTTTTAATCACAATAGTTGCAGGTACTCCTCTGCACCTGTAAGCACAGGCTTGTTCGATATACCTCGGAAAAAT  
 TGGCAAGAGGACAAGAAGCATGCGCGCCATGGTGGCGCGCATGCTTAAAGGGTTACTCTGTTTTTATCTTGCTT  
 ATTTATCCCGTTGTTATTATATTGTGCGAAAATATTAGTGAGTTACTTTTTAGCGATGGACAATACACATGGTTA  
 ATCATTTTCGCATGTTGTATATTGCCATCTCCATTATAAATACATTGATCGCTTCAGTTTTAAATGGTCAACAA  
 TTTTATAAGCAATATATATTGGTTGGGATGTTTTCTGTATTCACTTCTACTATGTTTATGATTTTTGTTGATTGTA  
 GCTTATAATCTTAAAGGTGCATTGATTGCCACAGCTATAAATAGTGTCTATTGCTGGTCTTGTATTGGTTTTATT  
 TGTCTCAATAAATCTTGGTTTAGATTTAAATATTGGTGGGGTAAAACGGATAAAGACAAAATTATAAAAATTATT  
 CATTATACTCTGATGGCTCTGGTTTTCTGTTATCTCCATGCCTACAGCATTGATGTGTATTAGAAAAATATTGATT  
 GCTAAAACCTGGTTGGGAGGATGCAGGGCAATGGCAGGCCGTATGGAAGATATCTGAGGTTTATCTTGGTGTGTG  
 ACAATTGCTTTGTCAACATATTTCTTACCAAGATTGACAATTATAAAAAACAAGTTTCTTATAAAAAAGAAGTA  
 AATAGTACTATATTATACATAATATCTATTACTTCAATTCATGGCGTTGAGTATCTATTATTCCCGCATTTGGTA  
 ATAACAGTTTTATTACTGAACAGTTTTGCTCAGCTCGTGAATTTTTTTATTACAACCTATAGGGGATGTAATA  
 AAAATTGCTGGGTTTTCTTATGCATACCCTTTCAAAGTCAGGGGCATACTAAACTATTCATCAGTTCAGAAGT  
 ATTTTTCTATGCTCTTTATCATTACCACCTATATTTTTGTTGTAAATATGGAGTACATGGTGTACATAAAGT  
 TATGTCAATACATATAGTTTATATTTTTGTGTTTGCATTTGTGTTTACTAATTTTTATTAATGTTAGAAGAAATAAT  
 TAAAAACAGAGGTTGAATTTTTGAAAATAATTATACCTGTCTTAGGATTTGGCAGGGCTGGTGGTGAAGAGTTCT  
 TTCTAAGCTGGCAACTGAATTGATGAATATGGACATGATGTAAGTTTTGTTGTTCCAGATAATAGAACTAATCC  
 ATATTATGCTACCACAGCAAAAATTTGCACGAGTAAATCTAGTCAAAACCGTGTAAAAATATTGAGAATCATTA  
 AAATTACTATAATCTGTGGCGTAAATGCATAGAGTTAAATCCTGATGCTGTAGTTGCTAGTTTTCTATTGACTGC  
 CTATCTTGTGCGATTATTACCAATCACCCGTGTAAGAAATATTATTATATTAGGCGTATGAAGTTAATTTTTT  
 TGATAATATAATATGGAATTAATAGCGGGTTTAAACATATTTTACCAGCTTAAAAAAATACTAAATAGTCTTAA  
 TTTGCTTCTCATAAACATGATGATTTTATAGGAGTAGTTCTTGCAGGAGTAGATTTAAACGTTTTCTATCCGAA  
 ACCATCAATAGGTTATTAATGGTCCACATCAATAGGGATTATTGGTAGAAAAGAGAAGCACAAAGGAACTAG  
 CGAAATTTATTTAGTATTGTGTTCACTGGAAAATAAAGCTGGAATTTAATCAATATTGCGATCTATCTGGAAGA  
 AGTTGATAAGCAGCGTTAATCGCTGCCGGGTTTCAGGTTAATTTTTTTCCGATTACTTCTGATTTAGAATTGGC  
 ATCCTTTTATCGAAGCAATGACATCATGATTGCTGTTGAGTAAATGAAGATGGCGCTTTCATTATCTCTGTGC  
 TGAATCAATGGCTTGTGGTTGTCTTGTATTTCAAATTATGCGCCACTTACTGAAACTAACAGTGTACTTAAATT  
 AGTCAAGTTTGTGCTTGCAACTTGGTGAAGCAATTAATCTTTGTCTCAATCTTGACCTAGAAGAAAAAGCAA  
 AGAAATCCAATCTAATATTTCTGTGTTGAATAAATATGACTGGAAAATTTGTTGGTGAACCTTTCAATAGTTTATT  
 GTTAGATGCAAAATAAATAGTATACGTTGATGGGGAAAATATGAATATTGTTAAAACCTGATATTCCAGATCTGATC  
 GTTCTTGAACCAAAAGTGTTTAGTGATGAACGCGGCTTTTTTATGGAGAGTTATAATCAGATTGAATTTGAGAAG  
 GCAATAGGAAGGCAGTAAATTTTTGTTTCAGGATAATCATTCAAAATCTAGTAAAGGCGTACTACGTGGGTTGCAT

TATCAATTAGCACCCTATGCACAGGCTAAATTAGTTCGATGTGTTGTAGGTCAGGTATTTGATGTTGCTGTTGAT  
 CTTAGAAAAAATTCACCAACGTTCAAAAAATGGTTTGGAAATAACCCTTTCCGCAGAAAAATAACGACAATTTATGG  
 ATACCCGAAGGATTTGCTCATGGTTTCTTGGTGACCAGTGATGAAGCTGAGTTCATTTATAAGACAACAACTAC  
 TATGCTCCTGGTCATCAGCAAGCAATTTTACAATGATCCTATTTTAAACATCGATTGGCCCTTTCTCGAGTAGT  
 GCTCTGTCAATTATCACAAAAAGATCAAGAAGCAAAATTTTTCAGAATTATTGGACAGTGAACCTGTTCTAATAA  
 AGTGTGCCACCTTATCCGTCTGAAGGATAGGTGGTTGCTTATATTTTTTTGAGTATGTTTGTATAATGACAGAAA  
 ATAGTCCGAAATATAAACACGATAAAAGCTTAATAAGTTTATCTACTTATTTTTTATATTTACACTTATTTGTAG  
 GCTTTATATCGCAAATACCCAGTTTTTGGGGCGAAGTAGAGACTATGATAATTATATACAGATCTTTTCTGGTA  
 AAGAAGGGGAGGGGTTCTTGAATTATTTATCGCGGATTTGATGTTAATAACGACCAGCTATGAAACTATCATT  
 TTATAATTTTAAACATGTTCTTTTTTTATAAAGGCAAGTTTCTCGCTAACTATTCGCGTAATTTTTTCAGGCTTGA  
 CCTTATCTTTTATTTTATGCAAGCGTTGCACTTTGGGTTTATAGATTATACTCAATTCAGAAATGGTCTATGTA  
 TTTCCATTTTAAATGTTTTCCGTATACTATTTATTTATAAATAAACCGACTTATTTTTTATTTCTCGGTATTATGTG  
 CAATTGCAACTCATTGGTCTGCTTTGCCTTTTTTGTCTTTATATCCTTTTGTCTATTCAACAAAAATAAGACGCC  
 TTGGTTATTTTTGTTTCAGTATTTCTTGTGTTGATTGCGATCTCAGGAGAAGGAAAAGAGATCATATCTTTATAA  
 GAAATTTTGGAGTGGGCAAAAAATAGGAAATGAAGCTGGTGTAAATTTAATAAATTCATTTATCCCTTACCGCTA  
 TTTCTCGGTTTATTATTAGTTACATATCAAGCATTGAAATGAAAGGAGAAATTTAAGGCTTTTCTTTTGTATG  
 GTGTCATGCAATAGCTGACTTTTAGCTTTTCTCTCTACCTGTTATGGCTTTCCGTATTTTGGAAATGATTTTT  
 TCCTTATGCTAACCATTTGGGGTGTATTAAGCAAAAAAGAATTATTTATTTTTTTCGAAAGTGTATTTT  
 TATTGTATCTAACATACTATTATCATATGGTCTTTGGAGTGATTAATGTGTAAGGCTAAGGTGTTGGCTATAAAT  
 GTTACTTACAACCCGAAATTTATTCGATTGACGGAATGTATTAACCTTTAGCCCCACAAGTTGAGAGAATAAAT  
 CTTGTAGATAATGGCTCAAATAATAGTGATTTGATAAAAAATATCAGTATTAATAACCTTGAATTTATTTACTT  
 TCGGAAAACAAAGGCATTGCATTTGCTCAGAACCATTGGTGTAAAGAAGGGCCTGGAAGCAAAAGAGTTTGACTAT  
 TTATTTTTCTCAGATCAGGATACTTGCTTTCTAGCGATGTTATTGAAAACTTAAGAGTACATTTACGAAAAAT  
 AATAAAAAAGGTAAAAATGTTGCTTGTGCTTCTCCTTTTTTTTAAAGACCATCGTTCAAATTTATATGCATCCGTCA  
 GTCAGCCTAAATATTTTTACGAGTACAAAAGTTATATGTAAGTAGAGCAGATGATCTTTATCCCTCGCATGTT  
 ATTTGCTTCTGGGATGTTAATGTCTCGTGAAGCATGGCGCGTCTGTCGGACATTTTTGTGAAAACTCTTTATAGAC  
 TGGGTTGATACAGAATGGTGTGGCGTGCATTAGCTAATAATATGATTTATGTTTCCAGACACCATCAGTCACTATT  
 TCTCATGAACCTTGGGTATGGGCAGAAAAATTTTTGCTGGTGCATCTGTTACAATACATAAATCTTTTCAAAAAATTT  
 TATAAAATACGCAATGCAATATACTTAATGCTGCATTTCAAATTTATAGCTTCAAGTATCGTTATCATGCTTTTTTT  
 CATCCGCAAAAGATGTTGATTTTGAATTTTATATTTGAAAGAAAAATTAATTTCACTGAAGGTTGTTTTTAA  
 GCTGTACGTGATGGTATGTTCAATAATTTTTAATACGAAAATAGTTAGGCTCAAGGTGTTTAAATGGAAGAAAAAT  
 AATATGAAGACGGTCTGTAGTTGGCACAGTGGGTGTTCTGCTTGTATGGTGGGTTTCAATCACTTGTTCAG  
 AATCTAATTTGATTATCAATCTGATGGTATACAATATCAGATATTTTTGCTCTTCAAAAAATATGATAAAAAATTT  
 AAAATTTATAAAAAATGCAAGATTAATCTATTTGCCGATAAATGCCAATGGCGTCTCTAGCATAATTTATGATATT  
 ATGTGTTAATTTATTTGTTTATTCAAAGGCCAGATGTTGTTTAAATTTGGGGGTGTCTGGTGTTTATTTCTA  
 CCAATTTATAAACTATTTTCAAATCAAAGATTATTGTCAATATTGATGGGCTTGAATGGCGTAGAAAATAAATGG  
 GGAACGTTTGTAAAGAAATTTCTTAAATATCTGAGGCGATCTATTTAGAATAGCTGATATTTATCATTTTCA  
 AATCAAGCAATAGCTGATTTATGTGAAAAATAAGTACAAGAAAAAAGTGTAGTTATAGCTTATGGCGGAGATCAT  
 GCCACTAATCTTAGTACACCGATAGACAATGATCAAAAAAAGAAGGTTATTTATTTGGGGCTTTGTAGGATAGAG  
 CCTGAGATAATATAGAAATGATTCTGAATGCCTTCATTAATACAGATAAAAAAATTAATTTATGGGTAATTTGG  
 GATAACAGCGAGTATGGACGCCAGCTAAAAAATATTTATTTCAAATATCCAAATATCACCCCTACTAGAACCTAAC  
 TATAATATTGAAGAGCTTTATAAACTAAGAAAAAATTTGCTTGCATACATTCATGGACACTCGGCTGGTGAACA  
 AACCTTCTTTTAGTTGAAGCGATGCATTTTAAATTTCTATTTTGGCTTTGCGATTGTGACTTTAATCGTTACACA  
 ACTAACAATTTAGCTCATTACTTTAATGATTCTGAACAACCTAGCTTATTTAGCAGAAAGTTTGTCTTTTGGAAAT  
 CTTAAATGTGAGTATTAGATTTAAAAAATTTATGCTGAAGATATGTATAACTGGAGGCATATAGCTGCTATGTAT  
 GAATCTATTTATTAACGCATTAACAATAATATAATTGACCTTATATAGCAGGGAAAGATCACGTAACGCTGCGG  
 CGCGCGGATCCCATATGAATATCCTCCTTAGTTTCTATTTCCGAAGTTCCCTATTTCTTTCTAGAGAATAGGAACTT  
 CGGAATAGGAACTAAGGAGGATTTTATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTTACTT  
 TAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTTCCAGGCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGG  
 AGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCCTCAACATCG  
 AAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGAAGTATTGCCGAAAAATCCAG  
 GCAAGAACTGGTTCCCTACTATACGGTGAAGAGTTTGTGCAATCTCTGGAACGCCTCGTCGCATCCTGTTAA  
 TGGTGAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCA  
 TTGATGGTGGTAACACCTTCTTCCAGGACACTATTCGTCGTAATCGTGAGCTTTTACGAGAGGGCTTTAACTTCA  
 TCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCTGGTGGCCAGAAAGAAG  
 CCTATGAATTTGGTAGCACCGATCCTGACCAAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATCGCTTACCTATA  
 TTGGTGGCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTTCAACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTG  
 CTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGA  
 ATAACGGTGAACCTGAGCAGTTACCTGATCGACATCACCAAGATATCTTCAACAAAAAAGATGAAGACGGTAACT  
 ACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACCGGTAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATC

TCGGCGAACCGCTGTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTTTGACGTTATATCTCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTTG  
 CCGCATSTAAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCAGCCAGCCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTC  
 GTGCGCTGATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGCCTGCGTCTGAAGAGTACA  
 ACTGGGATCTGAACCTACGGCGAAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCTGCAGA  
 AAATCACCGATGCTTATGCCAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTACTIONTCAAGCAAATTGCCG  
 ATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGATGCTGTTGCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCGGTTCGGACCTTCTCCG  
 CAGCGGTTGCSTATTACGACAGCTACCGTGTGCTGTTCTGCCTGCCAACCTGATCCAGGCACAGCGTGACTATT  
 TTGGTGGCATACTTATAAGCGTATCGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTA

**SEO ID NO: 13** ((пример нуклеотидной последовательности локуса *rfb* O6A – штамм-  
 продуцент O6A-EPA stGVXN4112 и stLMTB10923))

ATGACGAATTTAAAGCAGTTATTCCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGCGGATACCC  
 AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAA  
 GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGGGTGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA  
 CTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATTTGCCCGCCGGGCGTGACAATTATG  
 AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTGGGCCACTCCATTTTATGTGCACGACCTGCCATTGGTGAACAATCCA  
 TTTGTGCTGGTGTCCAGACGTTGTGATCGACGACGCCAGCGCCGACCCGCTGCGCTACAACCTTGTGCCATG  
 ATTGCGCGCTTCAACGAAACCGGGCCGACCCAGGTGCTGGCAAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCT  
 GTCATCCAGACCAAAGAGCCGCTGGACCCGGAAGGTAAGTCAAGCCGATGTTGAATTCATCGAAAAACCGGAT  
 CAGCCGACAGCGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTTGGTGCCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGAACTT  
 GAACGCACTCAGCCTGGTGCATGGGGGGTATTGACTGACTGATGCCATTGCCGAACCTGGCGAAAAACAGTCC  
 GTTGATGCCATGCTGATGACCGGCGACAGCTACGACTCGGTAATAAATGGGTTATATGCAAGCGTTCGTGAAG  
 TATGGACTACGCAACCTCAAAGAAGGGGCGAAGTCCGTAAGGGATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA  
 TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAGATTAGCGGGCAAAGTAATTTGTTGCGAA  
 TTTTCCCTGCCGTTGTTTTATATAAACAAATCAGAATAACAACGACTTAGCAATAGGATTTTCGTCAAAGTTTTCCA  
 GGATTTTCCCTGTTTCCAGAGCGGATTTGGTAAGACAATTAGCATTTGAATTTTACGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA  
 ACGCTCGTCACATCGTAGACATGCATGCAGTGTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGTGAAATTA  
 TAAAGTCACTTCTATAGAACATCGCATTTCAATAATATAATACACCTAAATGAATAGGATACAACCTGTGCACA  
 ATTTATTAAGGCTTAAAGATAAAAATAAAAAACGTATTTTAGGGTTGTATATATTGCAGTTATTTAATTATATCG  
 CGCCATTGGTAATTATCCCTATCCTGATAAAAATATATTGGGTTGGGGGAATATGGGGAATTGGTCTATATTACAT  
 CTATTTATCAAATAGTGGCTTTGATTATGATTTTGGCTTACTTACACAGGACCTGTGGTTGCTGCGAGACATA  
 GATGTGAGACCCAAAATTTACAGCGCTATTACTCAATAGTTGTTCTTTAAAATCATTGCTTTTTATAAATTGCAT  
 TAACATGTGATTTTTATGTGCAGATTAATATAAGTCCACTTGTCAATTTTTGGGTTTTTGTCAATTTTTCTAT  
 GCACTATTGGTAATATATATCGCCCAATTTGGTTTTGCGAGGGGATTTGGTATTTTTAAAAAATTTTCACTCAC  
 AAGTAATAGTGAGAATAACATTTGTTTATCATACTTCTGTTTATGTCTGTAGTGGCGGAGATAATGTTTTTATCC  
 TAAGTTTTTTGCAAAATGCAACATTACTCATATGCTGTATACTTATGGCCAAATATTCATATTAGCCATGTTT  
 TTCATCTTAAACCTAATGAATGCATTTGGAATTTAAGAAGCGAGGAATGTTTTTATTTGGCCTAATAGGTACGA  
 TTGGTTACAATGGTCTAATTCCTGTGTTAATTGAAACCTTTGCGGTAATACGAGTCTTGGTGTTTTTTCAATCG  
 TTCAAAAATGACAACAGCATGTCAAAGTCTAATTAATCCAATATCACAGTATATGTTATCTCAAGTTTCAGAAA  
 TTAAACSTCAAGATAAAGTGTTTTATATAGAATTAATAAAGGTTTTTTTGTGCATTTAACAATTAGCATAATTG  
 CATGTTTATGTTATATGGGGTAGGGCAATATGTGGCGACTTTTATAGGTAAGGTTGACGTTTCATTTGTTATTA  
 TTTTATTTGCGTCAATAATTACCATTTTTTTCATCTTTAAATAATGTCCTTGGTATACAGTTTCTTATACCGACAG  
 ATAATGTAAAAATACTACGAAGTATAAATGTTATGGCGGGAATTTGTTGTTAGTTTGTCTGGCTGTTAATAT  
 CACGCTTTGACATTTCTGGGGGGGTTTTATTAACCTAATTTGGTGTGTTTCTTGTATTTCAGTATGCTAGCTTTTA  
 TTGCCCATCGAAAGTGGGAGCGAGATATAATGAAAGTGAAGGCGGTTCTGCTATTACATTCTATTTAAGTTT  
 AATGCTGACAAATTTAGTGTACTGTTTGGTAATGAACCAATAAATCACAATATATCCTTGTATAGCAACGAT  
 AACAGTTTTTTATATCGCATATATCACTAATAAATAACTTCTCCGGCCAGCCTTCTCGTTATATCATCTTTTTGT  
 GTTTTTAGGTTGTGCGCCCTTATTATCTTTGTTTCAAACCTATGATTATAGGATTGCCGATTGGTTTTATGAAGG  
 ATATATGGATGACGATGTGATTTTGGCTAATGCTATAACACTAATGTTATGTTATGTTATGTTATGGGACTAAT  
 TCTATGCAAAAATACTGAAAAATTTTATCCGCATGGTCTTATCCTGAAAAACAATTGCTAAAAATAAAGTTTTCT  
 TTTGACTTTATTTTTTCTGGGTTGATAGGATGTTGTTGAAAAGGGATATTCTTTTTAACTTTATAGAATCTAA  
 TAGTTATGTTGATTTTTATCAATCAAATATAACAACGCCAATAGGTTATGATTTTCTATCTTATTTATTTATTG  
 TTCTTTTTCTCTTATATGTGCGTTTTATATACAGTTTCAAGCAAAATAAATAAATTTCTTTTTATTGCGATATGCAT  
 TGCTGCATTTAGCACCTTTGAAGGGTAGTGTAGTGAAGCTATAACGTTTCTTTAACGGTTACATGTATATATTT  
 TAATGAAGTAAAGACAAGAACTTACGTCTGCTGATTACAATGATTTTTGTTTTTAGCGTCATTTTTGTGATTAG  
 TGAATTTATCTCAATGTGGCGCACTGGAGGGATTTTTTTTCAATTAATGCAGGGTAATAATCCTGTTATAAACTT  
 TGTATACGGCATGGGAGTATCATATCTTTCCATTTATCAATCAGTAAAACTACAACCTATTGTGAGGGGGATATAA  
 TGTTACCTATCTATTCAGCCAGTTAATAAATAACTTGTCTGTCATATTTAATGTCAAATTTGAGCTTCCCGAAAT

AAGCTATAGCCATTTGGCCTCATAACAGCAAACCCAGAACTATATAATCTTGGGTTCCGACTTGGGGGGAGTTA  
 TTTAGCAGAATCGTTTTTAGCATTGGTCTGATTGGATGTTTTATTATACCCTTTTTACTTTTACTTAATTTAAA  
 TGTATTGGAAAAATATACAAAAACAAACCAATTATATATTTTTGTTTTATATAGTGTGTTGCCACCTATATTATT  
 CACACCAAGAGAGACTTTGTTCTATTTCTCCCTACTCTGTCAAAGTATATTTGTTGCTTTTTTAGTTACATT  
 ATACATCCAGTATAAAAAAGGATTGACCAAAATGTGCAAAAAAATGTGAGCATAATAATCCCAAGTTATAACAGG  
 GCTCATATTTCTAAGGAGGTATACCAAGTTATTTTCCAGGATGAGACTTTAGAGGTTATAGTTATCAATGATGGA  
 TCAACAGATAATACAAATAGTGTATTAGCTGAAGTGAAGGAAAAATATTTCTCAGTTAGTTATTTTAGAAAAATGAA  
 ACGAATAAAAAACAGATGATTCTAAAAACCGAGGGATTGAAATAGCCAAAGGGAAATATATTTTTTTTTGTTGAT  
 GATGACTCTTACCTCTTACCCGGTGTATATCTCGGTTATTGGCTACAAAATATGAGACAGGCGCTGATGTAATC  
 GCGCAAGAATACTTTATATGAATAATAACGAGAAAACAATTGAAGATTGCATAAATCGACATAAAAAAGAGGGG  
 CGTTTTGTTAGTGTAAATAGATTGGATTTTAGTTATACATGTGATTGGACCATCCGATTGAATGTTTTTAT  
 GCACAGCCTTTTTGTTCTAGCTGAAAGGGAACTAATATCGAAATATCGAATTTGATATATCTTATACGGGAACTGC  
 TATCGTGAGGAACTGATTTTATGCTATCTCTATTTTATAAAAATAAAAAATTTATATATGATTCAAAGCCTTTG  
 TTAATAAATTTACCTCCAAGAAAAGCGACGGGAGGGGCAAGAACAGCTAATCGATTAAAAATATCATTACGAAAGT  
 TGCATAAATAATTATAGATTTTTTAAAAAATATAATGATAATTTGAATCTTCTTTTCAGGACAAAAGCATGCTATA  
 TTTTACCAGCAGTGTCAATTCGTTCTGCTAAAAATGAAGTCTGTTTATCGGGAAGTTTTTAAAAATGATTATATA  
 TCGCCCGGTATAATGGTTTCCAGGAGGGCAAGGTGGGGTGGAAAGGGTTGTTGCCCAACAATGTAACATTTCTAAAA  
 ATTTGGGGGTTAAAGTCATTATACCTTGATAAAACATACTTCAAATTTCTAACAAAATCGTAACAAAAAATAAC  
 AAGTAGCCTTTTATCCAATATTAGTTTCTCTTTTATTTAACCCTTACAAAATACGTGGCCTGACGTTTTAAAGTTA  
 TTGCACATGGCTATTGTTCTCTTTTTTATAGGAATGACATCTTAATAGCTCATGGCAATATGAAATGTTATTTTC  
 AACAGTCATGAATAAAAAACCTAATCGGTTGTCTGGCAGTGGTCTTTTATCTTTCTATGAGCGTTGGGCTGGAG  
 CATTTTCAAAAAATATCTGGGCTGTTTCAAATAAGGTTAAAGTGAATGGAATGAGCTTTACAATATTAATTCAC  
 ATAAAATCAAAGTTGTTTCAAAATTTTATAAATCTTGCACAATTTGATTACACTGATGTTAATGAAGCAGAATATG  
 TGACATTTGTCCGGGATTTGGAAAAAGGAAAAGGAATAGATGATCTGTATTACATATGTAATAATCTGCCAGATA  
 CTTCTTCCATTTAGTTTCAAGTATTTCCGCCCCACAAAATTTTGCTTCGCTAAATAATGTTCTGACCAGCATTG  
 CTGTCCCTATGCGAAAATGCCAGAAATATTTAAGAAATCCAGAGTACTTATTTTACCCTCTATTATGAAGGAT  
 ATGAGCTGGTTACTATTGAAGCGCTATGCTGTGGTTGCCCTGTGATAGGCTATAATGTTGGTGAATTAGAGAGT  
 TGTATGAGAAAAGTTTTCTGGCGTATTATTGCCAATAATAAAGAAGATTTAGCACAAGTAGCCTACAATTA  
 TTAGTCTTGATAATGAAAAATATTATCATTTGAGACAACTATTTTATAGCAAGCGTGAGCTTTTTTCTGAAGAGA  
 GATATGCGGAAATTTAACGGCGGCATTTAATGAAAAAATAAGAACTCTGTCTCATTCAATTAACATCATAT  
 AATGAACCTTACCGGAGGAGGATATTTTACGTACGCTTGTAGTTTTTCTACAAAAACGAATGTTAATTAACA  
 CTTATTGATAAAAAATCCTCAGGTAACCTATTGCAAGACAATACTTTTCAACATATATCATTTATTAAGGTAAA  
 CGTCAGGATATAATATCCAGGCTTTTTTTTTATACCATCATTTTATGTCCCTTATATTTTTCTCAATAATTA  
 TTACGGAAGCAAGATATTCTTGCTTTTCACAACTCTCGGCTTGGATTGTTATGTCTGCTTTTTTAGAATACTCATG  
 CCCCCAAAAAGATCATATTGTTTACGGATAACTTCGAATATGACTTAATAAGACAAAAGATAAAAAACATAACT  
 ACTTTTATTGAAAAATTAATTTGTTTATCTCAATGAATTTATCGGGCTTAAAGAAATTCAGATTTAGTTAGCTATATT  
 ACCCGCAAGATAAAAAATGCAATGGATAAATTTTATGGGATTAAAAAAGCAGAAATTTAATTTCTCCCTGTGATA  
 TTTAGTAGAGAAAAACCAACTGATGATTTGTGAGTCACTTTTATTAATGAGTATAATCGAATGAATAATGATAAT  
 AGGAAAAAGTAGTATTTACTGCATCTTTTATTTTTTTCCAAATATAGATGCTGCCAATATGTTTTAAATGCA  
 GCAAAGTCTAATAATGATTATTGCTATATTTTGGCAGGTAGGAAAAGTACTACTTTGAATCTTCTGATTTGGAT  
 AATTTATTTTTTTTTCGATAATCTATCTAATAGTGAATGTGATATTTATATCTGCTTGTGATGTTTTTATTCT  
 CCTATAGTTTTTAGGAAGTGAATGAAAACAAAAATTCGAGAAGCACTATCATATGGATTTATATTTTATGCGACA  
 GAGCATTCCTTAATCGGCTATGATGAAATATACACAATAAGGAGTGTGTTAAAAAATCTCACATTTGGATGAG  
 GAATTTCCATAAGATTTCAAGATGAAAAGTATCAATAAACAGCTAATAATGTCTTATCAGCAAAAAATATTATTCA  
 CATTTATCGGTTTAAATGGCCATGAACTTGATATAATAAATTTTACGATTTAGTTAGTGGAGATATAATATGAACAT  
 ATTAGTAACTGGTGGTCTGGATATATCGGATCTCATAACGGCTATTGAATTAAGTGCAGGTGATGAGATTAT  
 CGTTCTGGACAATTTTCAAGTATGCTTCATACAAGTGTATCGAAAAAATAAAAGAAATTTACTCGACGTGATTTTAT  
 AACAATTAAGGATGCTGGGTGTAGGAAGCACTCTCCGCTATTTTCGAGAAACACGCCATAGATATAGTTAT  
 TCATTTTGTGGCTTTAAATCTGTTTTCAGAGTCTAAAAGTGAACCTTAAAGTATTACCAGAATAATGTTGGAGT  
 GACCATTAATTTTATACAGGTAATGGAAGAGTACAGAAATTAAAAAATTTATCTTTAGTTTATCTGCGACAGTCTA  
 TGGTGAACCAAGATAAATCCAATTCAGAAAACAGCTAAAATTTGGAGGAACACGAATCCATATGGCACATCGAA  
 GTATTTTGTGAAAAAATTTAGAGGATGTTAGTTCCACGGGAAAACCTGGATATAAATTTGCTTGGAGATTTTTAA  
 TCCTGTCCGTGCTCATTTAGTGGTAAAATAGGTGAGGCTCCATCTGGTATCCCTAATAATCTTGTCTCTTATTT  
 ATTTGGATGTTGCGAGTGGTAAACGTGATAAATATTTATTTATGGCAATGATTACCCTACTAATGATGGACAGG  
 TGTAAAGGATTTTATTCATGTTGTTGACTTAGCGAAAGGTCATTTGGCTGCAATGAATTTAAGTATCAATTC  
 GGGATATAATATCTTTAATCTTGGTACAGGAAAAGGTTATTCGGTACTTGAATTAATCACTACACTTTGAAAAAT  
 AACAAACATTAAGGTCATAAATCTTTTATAGAGAGAAGGGCAGGGGATGTTGCGTCTTGTGTTGGCTGATGACGAGA  
 TAAAGCTAATTTCTTTTATTTGGACTGGCAAGCCGAACAACTCTAGAACAGATGTTATTGGACTCGTGGCGTTGGAA  
 AAAAAATATCCAGACGGATTCTGAATATAAAAGGTTTTCAGTTTTATGAATCAATCAGAGCAGAGAAAAAATA  
 CTGGTTCTTACACCTCGCTTTCCCTACCCTGTCTTGGAGGGGATAGATTAAGAGTCTATATGTTATGTAAGAA

CTTTCCAAAAATATGATCTTATTCTTCTGAGCTTATGTGATCAACCACTAGAACTTGAAATAAATATAAATGAC  
TCGGTCTTCAAAGAAATTCATCGTGTCTATCTACCAAAATATAAATCATATTATAATGTATTTAAAGCTTTGGTT  
ACGCCAAAACCGTTGCCAATTTGCTTATTATCAATCGGACACATTTAAGAATAAATACAATAAATTAATAAACAA  
TGCGATGCAGTATTTTGTCTATCTGATAAGAGTTGCTGATTATGTTAAGGATACAGACAAGTTCAAATTTCTTGAT  
ATGACAGATGCAATATCTTTGAATTACAGTCGCGTTAAAAAATTAGCAAGTAAAAAAGTTTGCCTGCAATTATT  
TATTCTCTGGAACAAAAAGATTAGAATCATATGAACGTTCTGTGGCGAATCTTTTTGATTTGACCCTTTTATT  
TCATCCGTAGACCGTGACTATCTCTACCTAATCTGGCGAGTAATATCCATATAGTCAATAATGGGGTTGATACA  
TCAGCCTTGAGATATATAAAAAGAGAAAATAAAAATCGATAAGCCTGTGGAACCTTATATTTATCGGAAATATGTAT  
TCTTTACAAAATATGGATGCTGCAAAACATTTTGTCTAAGAATATTTTACCTTGCTTGATGATGAGTTAATATT  
ATTTTTAAAGTGATTGGTAAGATCTCAGAACTAATAAAAAATATATAAATTCATTTAAAAATACAATTGCTTTA  
GGTACTGTTGATGATATCAATTCTTCCGCTTCTACAGGCATATAGGTATATGTCTGTTGCTGTTGGAGCAGGC  
GTACAAAATAAAATTTCTGAATACATGGCTTTAGGTTTACCATGTATTACATCTAGCATTGGTTATGAAGGTATT  
AATGCAAAATCAGGTAGCGAAATTTTTGTTGAGATACAGTAGAGCAATATAAAAACGTAAGAGAAATAATT  
TACGATTATAATCGTTATACTGAAGTGGCTGAAAATGCCCGTAGTTTGTAGAAAATAATTTTTCTTGGGAATCA  
AAAGTTGCCAATTTAATGAATACATTAGATGAGAAATTATATGAACAATAATAAATTTATTACACCTATCATTAT  
GGCTGGTGGTTCAGGCAGTTCGGTTGTGGCCACTATCAAGAATCTCTATCCGAAACAAATTTCTAGCCTAATCGG  
TAGTCATACCATGCTTCAAACAACGGCTAATCGTCTGGATGGTTTGGATTGTACCAACCCCTTATGTCATTTGTAA  
TGAACAATACCGCTTTATAGTTGCTGAACAGCTTAGAAAATCGATAGATTGACTTCAAAGAATATCATCCTTGA  
GCCTGTTGGCGTAACACTGCCCTGCATTTGCATTAGCGCGTTGCTGATGTCTAAGTCTGATAAAGTGCAGA  
TGATCTTATGCTCGTACTGGCTGCAGATCACGTTATACACGATGAAGAAAAATTTGTAACGCTGTTAGATCGGC  
AATTCATACGCTGCTGATGGGAAATGGTAACATTTGGTATAAATCCAGACAAAGCAGAACTGGTTATGGTTA  
TATACATCGAGGACAATATATTAATCAGGAAGATTCGATGCAATTTATAGTGTATCATCATTGTTGAAAAGCAAA  
TCATGAGACAGCCACTAAATATCTTGCCTCCGGTGAGTATTATTGGAATAGCGGTATGTTTTGTTTAGTGCAAA  
TCGTTATATAGAGGAACTTAAACAATTTCCGCTGATATTTATCCGCTGTGAAAAGCAATTTGCTTCAGCGAA  
CTTTGACCTTGATTTTGTGCGTTTAGATGAAAGTTCTTCTCTAAGTGCCTGAAGAATCAATTGATTACGCTGT  
AATGAAAAACAAAGACGCAATTTGTTATTCGAATGGATGCTGGCTGGAGTGATGTCGGTTCATGGTCTTCTCT  
TTGGGAAATTAATGATAAAGACTCAGACGGCAACGTAATAGTTGGGGATATTTCTCTCATGAAACAAGAATTC  
TTTCATATATCCGGAATTTGTTGCTACAGTTGGATGGAAAATTTAGTTGTTGTTCCAAACAAAGGATGC  
TGTTCTTCTCAGAGAGAAAATAAAGTTCCAGGATGTAAGAAAATAGTAGAACAAATTAATAAATTCAGGTCTGAG  
CGAGCATTATGTTTCATCGCGAAGTATATCGTCTTGGGGTAAATATGATTCCATTGACACAGGGGAGCGTTATCA  
GGTCAAACGTATAACAGTAAATCCTGGTGAAGGACTTTCTTTACAAATGCACCATCATAGGGCAGAACATTGGAT  
CATAGTTTCTGGAACGCAAGGGTACTATAGGTTCTGAAACTAAGATTTCTTAGCGAAAATGAATCTGTTTACAT  
ACCTCTTGGTGAATACACTGCTTGGAAAATCCAGGAAAATTCCTCTTGATTTAATTTGAAGTTCTGTTCTGGATC  
TTATTTAGAAGAAGACGATGTTATCCGTTTTCAGGACCGATATGGTCTAGCTAAATTTTTGATAAATGTAACGTT  
AGTAGAAGAGCGCTAATATTTTTAGTTAATCTGTAATAAGTATTATTGTTTAAAGGTATATCATGTCCGAGTTTAC  
CCTGCTTTAAAGCCTATGATATTCGCGGGAAATTAGGCGAAGAACTGAATGAAGATATTTGCTGGCGCATTGGTC  
GCGCTTATGGCGAATTTCTCAAACCGAAAACCATTTGTGTTAGGCGGTGACGTCCGACTCACCAGCGAAACCTTAA  
AACTGGCGTGGCGAAGGGTTACAGGATGCGGGCGTGCATGTGCTGGATATTGGCATGTCCGGCACCAGAGAGA  
TCTATTTCCGCACGTTCCATCTCGCGGTGGATGGCGGCATCGAAGTTACCGCCAGCCATAACCCGATGGATTACA  
ACGGCATGAAACTGGTGGCGAAGGGGCTCGCCGATCAGCGGTGATACCGGACTGCGCGACATCCAGCGTCTGG  
CAGAAGCCACAGCTTTCTCCGTTGATGAAACCAAACGCGGTGCTATCAGCAAAATCAATCTGCGTGACGCTT  
ACGTTGATCACCTGTTGCGTTATATCAACGTCAAAAACCTCACGCGCTCAAGCTGGTGATTAACCTCCGGGAACG  
GCGGGCGGGTCCGGTGGTGGACGCCATTTGAAGCCGCTTTAAAGCCCTCGGCGCACCCGTGGAATTAATCAAAG  
TGCACAACACGCCGGACGCAATTTCCCAACGGTATTCTAACCCTGCTACTGCCGGAATGTCCGCGACGACCCC  
GCAATGCGGTATCAAACACGGCGCGGATATGGGCATTTGCCTTTGATGGCGATTTTACCCTGTTTCTGTTT  
ACGAAAAAGGGCAGTTTATTGAGGGCTACTACATTTGCTGGCCTGCTGGCAGAAGCGTTCTCGAAAAAATCCCG  
GCGCGAAGATCATCCACGATCCACGTCTCTCCTGGAACACCGTTGATGTGGTGACTGCGCAGGCGGCACCCCGG  
TAATGTGCAAAAACCGACACGCCTTTATTAAGAAGCTATGCGCAAGGAAGACGCTATCTACGGTGGCGAAATGA  
GCGCCCACCATTTACTTCCGTGATTTGCTTACTGCGACAGCGCATGATCCCGTGGCTGCTGGTCCCGAACTGG  
TGTGCTTGAAGGAAAAACGCTGGGCGAAGTGGTGGCGACCGGATGGCAGCGTTTCCGGCAAGCGGTGAGATCA  
ACAGCAAACTGGCACACCCCGTTGAGGCGATTAACCGCTGGAACAGCACTTTAGCCGCGAGGCGCTGGCGGTGG  
ATCGCACCGATGGCATCAGCATGACCTTTGCCGACTGGCGCTTTAACCTGCGCTCCTTAACCCGAACCGGTGG  
TGCCTTGAATGTGGAATCGCGCGGCGATGTACCCGTTGATGGAAGAAAAGACAAAATTTATCCTTGATTTACTGA  
ACAAGTAATTCAGTAATTTATATAAATGGGTTTTAAAAAACGAAAAGATGAGATATCCGGTGTGGTATATCCA  
AGGTAATGCTATTCAGTATCTCTATGAGTGAGTTAACATCTATACCACATTTAAGCCGCACACTTCGGGATCCCC  
ATATGAATATCCTCCTTAGTTCTTATTCGAAGTTCTTATTCTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACT  
AAGGAGGATATTATGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTTACTTTAATAAGTACTTT  
GTATACTTATTTGCGAACATTCAGGCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTC  
CAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGTGGGACGCAACCTTGGCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTA  
TACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGGAAGAAGTGATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAACTGGT

TCCTTACTATACGGTGAAAGAGTTTGTGCGAATCTCTGGAACGCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCAGG  
 TGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATTGATGGTGGTAA  
 CACCTTCTCCAGGACACTATTCGTGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTAACTTCATCGGTACCGGTGT  
 TTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTGGT  
 AGCACCGATCCTGACCAAAATCGCCGCGGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGCCGATGG  
 CGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTC  
 TCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCAACGAAGAATGGCGCAGACCTTACCGAGTGGAATAACGGTGAAC  
 GAGCAGTTACCTGATCGACATCACCAAGATATCTTCAACAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGT  
 GATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACCGGTAATGGACCAGCCAGAGCGCGTGGATCTCGGCGAACCGCT  
 GTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTTTGCAGCTTATATCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTGGCCGCATCTAAAGT  
 TCTCTGCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTGCTGCGCTGTATCT  
 GGGCAAAATCGTTTCTTACGCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGTGCTGCTGAAGAGTACAACCTGGGATCTGAA  
 CTACGGCGAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCCTGCAGAAAATCACCGATGC  
 TTATGCCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTAATCAAGCAAAATGGCCGATGACTACCAGCA  
 GGGCTGCGTGATGTGCTTATGCAGTACAGAAGGATTTCCGGTTCGGACCTTCCGCGAGCGGTTGCCTA  
 TTACGACAGTACCGTGTGCTGTTCTGCCTGCAACCTGATCCAGGCACAGCGTGACTATTTTGGTGCCGCATAC  
 TTATAAGCGTATCGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

**SEQ ID NO: 14 (пример нуклеотидной последовательности локуса *rfb* O8 – штамм-  
 продуцент O8-EPA stLM1B11734)**

ATGACGAATTTAAAGCAGTTATTCCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCGATACCC  
 AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTAGTACATTTGTTGACGAGATGTTGGCTGCAGGGATCAA  
 GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAAGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTTATGAGTTAGAATCA  
 CTCCTTGAGCAGCGGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGCGTGACCATTATG  
 AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCA  
 TTTGTGCTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATG  
 ATTTGCAGTTTCAACGAAACGGGCCGAGCCAGGTGCTGGCAAAACGATGCGCGGTGACCTCTCTGAATACTCC  
 GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTACGCCCGATGTTGAAATTTATCGAAAAACCGGAT  
 CAGCCGACAGCGTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTGCGTATGTGCTTCTGCCGATATTTGGCCGGAAC  
 GAACGTAACAGCTGGTGCATGGGGACGTTTACGCTGACTGATGCTATTGCGGAGCTGGCGAAAAACAATCC  
 GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACGTTACGACTCGCGCAAAAAAATGGGCTATATGACGGCGTTTGTGAAG  
 TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGCGAAGTTCGTAAGGTTATGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA  
 TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAATAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAA  
 TCTTCCCTGCCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA  
 GGATTTTCTTGTTCAGAGCGGATTTGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA  
 ACGCTCGTACATCATAGGCATGCATGCAGTGTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC  
 CTCTAATTAATCAAACAGAGCCGCTTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGCTAGCGAT  
 CGCTTAAGATCTAGGATTTCAATATGTTACTTCTGTAATATGCGTGGTGGTACCGGCAGTCTCTTGGCCGA  
 TGTCACGCGAGCTTTATCCGAAACAGTTCCCTCCGCCTGTTCCGGCAGAACTCCATGCTGCAGGAAACCATCACCC  
 GACTCTCGGGCCTTGAATCCATGAACCGATGGTCACTGTAAACGAAGACACCGCTTCCCTGGTGGCTGAACAGC  
 TACGCCAGCTCAATAAGCTGTGCAATAATATATTCTTGAAGCCGCTCGGGCGCAACACCGCCCGGCCATCGCCC  
 TGGCAGCCCTTCAGGCCACCCGCGACGGCGACGACCCGCTGATGCTGGTTCCTCGCCGCTGACCATATCATCAATA  
 ACCAGTCGGCCTTCCACGACGCCATCCGGTTCGCGAGCAGTATGCTGATGAAGGTCACTGGTCACTTCGGTA  
 TCGTGCCGAATGCCCGGAAACTGGCTACGGTTACATTCAGCGCGCGGTGGCGCTCACCGATAGTCCCATTCCG  
 CGTACCAGGTGGCCCGCTTTGTGGAGAAGCCGGATCGCGAGCGCGCCGAGGCTTACCTCGCTCCGGGGAGTACT  
 ACTGGAACAGCGGCATGTTTATGTTCCGCGCAAGAAATACCTCATCGAGCTGGCCAAATACCGTCCGGATATCC  
 TGGAAGCCTGCCAGGCTGCGGTGAATGCCCGGATAATGGCAGCGATTTCAATCAATATCCCGCATGATATTTCT  
 GCGAGTGCCCGGATGAGTCCGTGGACTATGCCGTTATGGAGAAAACCGCGATGCGGTGGTGGTGGTCTCGATG  
 CTGACTGGAGCGACGTCCGCTCCTGGTCCGCACTATGGGAGGTGAGCCGAAAGACGAGCAGGGCAATGTCTCA  
 CGCGGTGACGCGTGGGTACACAACAGCGAAAACGCTACATCAACAGCGACGAGAAGCTAGTGGCGGCCATTGGCG  
 TAGAGAATCTGGTGAATGTCAGCACTAAGGACGCCGCTGCTGGTGAATCGCGAGCGTTCCAGGACGTGAAGA  
 AGGCGGTGAGTTCCTCAAGCAGAACCAGCGCAGCGAGTACAAGCGCCACCGTGAGATTTACCGCCCTGGGGCC  
 GTTGGCAGCTAGTGGTCCAGACCCCGCTTCAACGTCACCCGCATCACGGTGAACACAGGCGGTGCCTTCTCGA  
 TGCAGATGCACCACCATCGCGCCGAGCATTTGGGTTATTTCTCGCCGCCACCGTCAAGTGTCAACCGTAAGC  
 AGTTCCCTGTGTCGAGAACAGTCCACCTTATTCCGATTGGCGCCGAGCACTGCCTGGAAAACCTGGCTGTA  
 TTCCGCTGGAAGTGTGGAGATCCAGTCCGGGGCGTACCTTGGCGAGGACGACATTTATCGTATTAAGACAGT  
 ATGGTCTGTGTAATTTTTCGGGACAAGACGCGAATGACACAGTTAACTTGTTTAAAGCTTATGACATCCG  
 TGGTGAACCTGGGTGAGGAACTGAACGAGGACATCGCTACCGTATCGGTGCGCCCTACGGCGAATTTCTGAAAC

CGGGAAGATAGTGGTGGGGGGCGATGTGCGCCTCACAAGCGAGTCGCTGAAGCTGGCGCTGGCCCGGGTAAAT  
 GGACGCCGGTACCGACGTGCTGGACATCGGCCTGAGCGGTACCGAAGAGATTTACTTTGCCACCTTCCACCTTGG  
 GGTAGATGGTGGCATCGAGGTGACCGCGAGCCACAATCCTATGAACACACCGGCATGAAGCTGGTGGCGGAGAA  
 TGCCAAGCCCATCAGCGCGACACCGGCCTGCGGGATATCCAGCGCCTGGCGGAGGAAAACAGTTCCCGCCAGT  
 GGACCGGGCGCTGCGGGGACCCTGAGCAAGATATCGTACTGAAGGAGTATGTTGACCATCTGATGAGCTACGT  
 GGACTTCTCGAACTTCAACCGTCCACTGAAGTTGGTGGTGAACCTCCGGAACCGGGGCTGCGGGGCACGTGATTGA  
 TGAGGTGGAGAAACGCTTTCGCGGGCGCTGGGGTGGCGGTAACCTTTATCAAGGTGCATCACCAGCCGGATGGCCA  
 TTTCCCTAACGGTATCCCGAATCCGCTGCTGCCGGAGTCCCGCCAGGATACCGCCGACGCGGTGCGCGAGCATCA  
 GGCCGACATGGGGATTGCCTTTGACGGCGACTTCGATCGCTGCTTCCCTGTTTCGATGACGAAGCTTCCGTTTATCGA  
 GGGGTATTACATTGTCCGGCTGCTGGCTGAGGCGTTCCTGCAGAAGCAGCCGGGAGCGAAAATCATTACAGACCC  
 GCGCTTACGACGTGGAACACGGTAGACATCGTGACCCGCAACGGCGGCCAGCCGGTATGTCGAAGACGGGGCATGC  
 GTTCATCAAGGAGCGGATGCGTCAGGAAGACGCTATCTACGGCGGGGAGATGAGTGCGCACCATTAATTCCGCGA  
 TTTCCGCTACTGCGATAGCGGGATGATCCCGTGGCTGCTGGTGGCGGAGCTGCTGTGTCTGAAGAACAGCTCGCT  
 GAAATCGCTGGTGGCGGACCGCCAGAAGCGCTTCCCTGCGTGGGAGAGATCAACCGCAAGCTAAGTAATGCTGC  
 TGAGGCGATCGCCGCGATCCGGGCGCAGTATGAGCCGGCGGCTGCACACATCGACACAACGGACGGGATCAGTAT  
 TGAATACCCTGAATGGCGCTTAAACCTGCGCACGTCTAACACCGAGCCGGTGGTGGCTCTGAACGTTGAGTCCAG  
 AGCTGATGTGGCGCTTATGAATGAAAAACGACCCGAGCTGTTACACCTGTTAAGCGGGGAATAAGGTGAGAGATT  
 TACTAACGACGATTTATCGTTATCGGGGATTTATCTGGAGCAGTGTAAACGCTGATTTTCAGGCACGGTATCAAA  
 CTAGTATGCTGGGCGCACTATGGCTCGTTTTACAACCGCTCTCTATGATTCTGGTCTATACCCTGGTTTTTTCCG  
 AGGTGATGAAGGCAAGAATGCCCGATAATACCGGGTGGTTTTGCCCTATAGTATTTATCTCTGTTCCGGGGTACTGA  
 CCTGGGGATTAATTTACTGAGATGCTGGATAAAGGTGAGAGCGTATTTATTAACAATGCTAATCTGATCAAGAAAC  
 TCAGTTTTCCGAAAATCTGTCTGCCGATCATCGTGACGTTATCGGCGGTGCTAAATTTCCGCGATTATTTTCAGTC  
 TGTTTCTAATTTTTATCATTGTACCGGTAACCTCCCGGCTGGCTCTTTCTCTCGGTGATACCGGTCCTGCTTT  
 TGCAGATCCTGTTTTGCCGGTGGGATGATCCTTGGTGTGCATGAACGCTTTTTTCAGGGATGTGGGGCAAC  
 TGTTTGGCGTTGCGCTGCAATTCTGGTTTTGGTTTACACCCATTGTTTTATGTAATCATTACCTGCATGGG  
 CAAAAATCTGATGATGTATAACCCGATGACTCGGATCATGCAATCTTATCAGTCCATCTTCGCTATCATCTGG  
 CCCCCAATGGTATTCGCTATGGCCAGTATTGGCTCTCGCCATTATTTTCTGCGTCATCGGTTTCAGGATGTTCC  
 GCAAGCATGCGGGCGATATGGTGGATGAATTATAATGAGTTATATCAGAGTAAATAATGTCCGGTAAGCCGATCG  
 CCAGTATCACTCAAAGACCGGGAGACTGATCGAATGGTTATCCCCTCTGAATACCAAACGCCATAATTTGAAATG  
 GATCCTCCGCGATATTAATTTCAAGTCTCGCTCCGGGCGAGGCTGTCCGTTATTCGGTATCAACGGTGCAGGCAA  
 GAGTACCCTGCTTAACTCATAAACCGGACGCTCCAGCCGACGACTGGAGAAAATTGAAATCTCCGGACGTTCTCGC  
 TGCATTACTCGAATTGGGGATGGGGTTTTATTCTGATTTCACTGGTGGCAGAAATGTTTTATATGTCTGGCAACT  
 GTTGGGGTTATCGTCAGAGAAAATAACTGAACTGATGCCGAAATGAAGAGTTTGTGAGATTGGGGACTATAT  
 CGATCAACCTGTGCGCTCTACTCCAGTGGGATGCAAGTTCGATTAGCTTTTAGTGTAGCGACGGCTATCCGTCC  
 TGATGTGCTAATTATCGATGAGGCATTATCTGTTGGGGATGCATATTTCCAGCATAAAAGCTTTGAGCGTATTCG  
 AAAATTTCTGTCAGGAAGGGACCACGCTGTTGCTGGTATCCCATGATAAACAAGCGATCCAAAGCATTTCGACCCG  
 GGCCATTTTATTGAATAAAGGCCAAATGAAATGGAAGGTGAACCTGAAGCAGTATGATGATTTATACAAATGCTCT  
 TCTGGCCGATAAACAAATCAGTCCATTAACAAGTTGAGCATAATGGTAAAACGCAACTGTTTTAGGCACTGG  
 TGAGGTGACTATCTCTGAGGTTTCTCTCGATGAACAGGGCAATGTGACTGAATTTGTTTTCGGTAGGGCATCG  
 TGTCAGCTTGCAGGTCAACGTTGAGGTCAAGGACGATATTCCTGAGCTTGTGTCCGATATATGATTAAGGATCG  
 ACTTTGGCAGCCGATTTTCGGGACCAATACGTACCATCTCAATCAGACACTCACCTCCCTGAAAAAAGGAGAAAA  
 GCGTTCGTTCTTATTTCTTTTCGATGCGAGATTGGGGTTGGCTCCTATTTCTGTGCTGTCGCGTTGCATACTTC  
 CAGTACGCACCTCGCAAAAACATGAATGGCGCATCTGGCCGTTGTTTCAACGTCGTTAACACGGAAACAACA  
 AGAGTTTGTGCGCGTGTCTGGTTGCCGCTGAACTGGAGATTTCTTAATGGGTTTCGTGTTTTATCGTTCATTT  
 GAAGAACGACACAGAGGTTTCGGTTGAAGAAATCAAGCGCCGCTTGAAGTTTTTATTTACCTTTTCTTGCAGGTCTG  
 AAGGACATTTATCCTGATGGCGTATTGCGGATATTGGTTGCGGACGTGGCGAATGGTTGGAGATCCTGACTGAA  
 AATGGCATTGCGAACATCGGCGTGCATCTCGATGATGGCATGCTGGCGCGGCCAGGGAGCCGGACTGAATGTG  
 CAGAAAATGGATTGTCTGCAAGTTTTCGAAAAGTCAGGCGGATCAGAGCCTGATAGCCTTGACCGGTTTTTCATATT  
 GCTGAGCATTGCGGTTTTGAGGTCCTGCAGCAACTCGCCATGCATACCTACGGGTGCTGAAACCAGGTGGTTTTG  
 CTGATCCTCGAAAACGCCGAACCCGGAGAATGTAAGCGTCGGCACCTGTTTATTTATATGGATCCAACGCATAAAT  
 CATCCTCTGCCACCGCCACTGCTTGAAGTTTTTACCTATTCATTATGGTTTTTACCCGAGCAATTACCGTTCGTCTG  
 CAGGAAAAAGAGGTTCTTCAATCTCCGGATGCAGCCGTTAATTTGGTTCGATGTAACAAAGGGGTGAGCCCGAC  
 TACAGCATCATTGCTCAGAAAGCAGCGCAACAGATATTTTGAACGCTTTGACACCTGTTTACCCAGCAGTAC  
 GGTCTGACGCTGGATGCTCTGAGCAACCGTTACGATGCGATTTTTGCGCCAACAGTTTTTCGTCCGTTGTCTCACGG  
 CTGGAGACGTTGAACCAACCTATATGCAACAGATAAGCCAAATGTGAGAGACTATTGAGACGTTGCAAGGTGAG  
 GTTGCAGATCTGAGTCATGTCATCGATCAGAACCATCAGCTTCATCAGCAAATGGCGGATTTACATAACAGTCGT  
 TCATGGCGTATTACTCAACCACTACGCTGGTTGTCTTTGCAACGTCATTAATTACGTCAGGAAGGGGCTAAAGTG  
 CGAGCCCGTAGGGCTGGGAAAAAATATTGCGCAAAGGGATGGCGCTCTCGCTGGTCTTTTTCCATCGTTACCTT  
 AAGTCTAAGGTTTTATCTGTTAAGGTTCTGAGAAAACTGGCTGCTATACATTGCTACAACGTTTGTCCAACGC  
 GTAATGCTGGTGAATCTGACACGATGATGATGCAGTCCAGAAGATATGATGTGGTACTGAAGAAATGACAAGT

CGCGCGATGAGTATTTATAACGAATTAATAAATAAAAAATACGGAGAAATAACGATGCGTATTGTCATAGATTTAC  
 AAGGCCACAGACGGAAAGCCGCTTTTCGTGGCATCGGTCGTTATAGTATCGCAATCGCCAGAGGCATAATCAGAA  
 ATAACAGCCGGCATGAGATTTTCATCGCGCTATCCGCCATGCTGGATGAGTCGATTGCAAATATTAAGCCGAAT  
 TTGCCGATCTCTCCGCCGAGAAATATAGTCGTATGGCATGCCGTAGGCCCTGTTTCGTGCGATGGACCAAGGTA  
 ATGAATGGCGTCGGGAGAGCGCAGAACTGATTCGGGAGCGGTTTCTTGAATCATTGTGTCCAGATGTCGTTTTCA  
 TTACGAGTTTGTGTTGAAGGTCATGTCGACGATGCGGCTACATCGGTACACAAATTTAGTCGTGAGTATAAAGTAG  
 CCGTACTGCACCACGATCTTATCCCCCTCGTGCAGGCGGAAACCTATCTGCAGGACGATGTATACAAACCCCTACT  
 ATTTACAGAAAGTTGAGTGGTTAAAAACGCTGACCTTTTGTGACTAACTCTGCTTATACCGCACAGGAAGCGA  
 TCGAGCATCTGCATTTACAGGGCGATCATGTGCAGAATATTGCAGCCGCGAGTCGATTCTCAGTTTTGTATGGCGG  
 AGGTGGCAGCGAGCGAAAAAGAGACCGTCTTGGCCATTACGGTATTACGCGCGAGTTCATGTTGTATGCGCCCG  
 GAGGATTTGACTCAAGGAAAAACTTTAAACGGTTTGAATCAGAGCATGCGCGGCTATGCCGGGCTCAGTGATGCTC  
 GCA  
 GTCATCAACTGGTCATCGTCAGTAAGCTTTCCATCGGTGATCGTCAGTATCTGGAATCCCTTGCCTCAGGTAATG  
 GTTTACAGCAGGGCGAACTGGTACTCACTGGTTATGTGCCGGAAGATGAGCTGATCCAGCTCTATCGCCTATGTA  
 AGCTGTTTCTTTGCTTCACTACATGAAGGTTTTGGGTTGCCGGTTCTGGAAGCAATGTCGTGCGGTGCGCCGG  
 TGATTGGCTCAAATGTACCAGTATTCCTGAAGTCATCGGTAATCCTGAGGCATTATTCGACCCGATTTCTGTCT  
 CTTCCATGAGGGATAAGATCGCGCAATGTTTACTGATGATACCTTCTCGCGCGTCTGAAAGAAATGGCGCAGC  
 AGCAAGCGCGTAATTTCTCTTGGGATAAAGCTGCGGTGACTGCTCTGGAAGCTTTGAAAAAGATCGCGGTAGAA  
 ACACCGTACTGCGCAGGTTTTGCTTGAAGCTTTGATTCAGAAAGATCCTTGCCTATCTCAAGGGCAGCCAGATG  
 ACCGCGATCTGCGCTTGTGCGCAACGGCCATTGATTACAATCTGAAAACGGCAGAACTTTATCAAATCGACGATA  
 AATCGCTGAACTGGCGTGTGGAAGGCCATTGATAGCTCATATAGTCTGGCGTTGGTCAACCGCAATTTGCC  
 GGGCACTCTCAGCCGATGGTGTAGAGGTTTTATTGCATTCCTACTGAAGGACCGAGGTGATTTTGGCCAGATGCT  
 CGTTTTATGGCACAGTCGAAAAATAGTGATCTTCTGGCATTTTATAATCAATGTGACACCCGCAAGAGTAACGAAA  
 AGATAGATATTATTAGCAGAAATATCTATCCACCGCGGTTACCAAATGGATGCCAAAGTAAAAATCCCTTCAAT  
 GTTATGCTTTGGGAAGAAACGGGCTTTCCGCAACCGTGGATCAATGAATTTAATCGGGAACCTTGACGGAGTGTCT  
 GTACTTCGGAACATGTTTCGTAATAACTGATTGATAACCGACTGAATGTGCCCGCATTTGTTGTTGGCAATGGCT  
 GTGACCATTGGCTCAATATCCCAGCCGAGACGACAAAAGATGTGGATCACGGAACATTCGGTTTTCTGCACGTCT  
 CTTCTGTTTTCCACGCAAGGGATACAGGCAATGCTTCAAGGCTTGGGGGAAGGCGTTCACTCGTGTGACAATG  
 TTATCTTAATCATTAAAGACTTTTAAACAATCCGCACAATGAAATGACGCATGGCTGGCTCAGGCCAGGCTCAAT  
 TCATAGACTATCCCAAAGTTGAAGTGATCAAAGAGGATATGTGAGCCACCGAGCTTAAAGGGCTTTATGAAAGCT  
 GTGATGTTTTGGTTGCTCCAGGTTGCGCTGAAGGCTTTGGTTACCTATTGCTGAAGCAATGCTGAGTGGGCTAC  
 CGGCTATCGTCACCAATTTGGAGCGGGCAACTTGATTTGTAAATTCACAAAATTCATGGCTGGTTGACTATCAGT  
 TCACTCGGGTAAAAACGCACTTTGGTCTGTTTTCTCAGCCTGGGCCAGTGTGGATATTGACAACCTAACAGATG  
 CATTTAAAGCGGCAGCCTCAACCGATAAATCAGTGTGCTGCGTGACATGGCCAATGCTGGTTCGCGAGCTTCTTCTGC  
 AGCAGTTTACCTGGAAAGCGGTGGCTGATCGTTCTTGCAGGCGGTCAAGACTCTGCGTGCAGATATTGATATTG  
 CACAGCATCGGGCGCGCATTGGCTGGGTGACGACCTGGAACACGAAATGTGGGATCGCAACCTATTCACAGCATC  
 TGGTGGAAAGCGCACCTCATGGCGCGGATGTTGTTTTGCTCCCCAGGTCAGCGCTGGCGATCTTGTGTGTGCAG  
 ACGAAGAGTTTGTACTTCGCAACTGGATTGTAGGTAAGAGAGCAACTATCTGAAAACCTCCAGCCACACATTTG  
 ATGCTCTGAGACTCAGTATTGTGATCCAATTCAACTATGGATTCTTTAATCATCGAGAATTCGCGGCTTTA  
 TTCGTCGCCAGCATGACGCCGGTCTGTTTCACTGATGCGGAGAGTCTGCGGTTGCTTTCAGAAGCCGATCTTCTGA  
 TTTTTGCTTATCAGAATACTGGGGAGTCTGCTAGCGGGGCGGTACGTTATGGTATGGCGACTCAAAAACCTGTTG  
 CGGTAACGCCCTGGCGATATTTGATGATTTGGACGATGCCGCTTTAAATTTGATGGATGCAGCGTGCATGATA  
 TCAGTCAGGGGATTGACCGGATCCTGAATTCATCCGTGAACAGAATCTTTGGGCAACAGGACTCAACACGTC  
 CCGATGCATGGCGGGAACAACATGATTATCAAGCTGTTTACGCGCTCTGGTTAATATGTGTCAAGGCTTAGCTA  
 AAGCTAAATATTTTAAATAAAAAATATCTCTTGTATTTTTGCTTTGAATACAAGAGGGGTTAGATAATGTGT  
 CTTTTATTATGAAATATTTTTGCTACTGAGCCAATTAATAACCCATTAACGGGCATCGGTCGGTATTCCTGG  
 AGCTGGTTAAGCGGCTGGCGGTGCGCCGCGAAATTAAGAATTAAGCTATTTACGGTGGTCTGTTTTATAGAAC  
 AGATCCCTTTGGTGGAGAATAAAAGCGATACCAAAGCCAGCAATCATGGTCTGTGTCGGGCTTTCTACGCCGAC  
 AGACGCTGTTGATTGAGGCTTATCGCTGCTGCATCCGCGGCGCCAGGCGTGGGCATTGCGCGACTATAAGGATT  
 ATATCTACCATGGCCCAATTTTTATCTGCCGATAAACTGGAACGCGCCGTGACCACGTTTCATGACATATCCA  
 TTTTTACCTGCCGGAATATCATCCAAAAGATCGGGTTCGCTATATGGAGAAGTCCCTGCATGAGAGTCTGGATT  
 CGGCAAGCTGATCCTGACCGTTTTCTGATTTCTCGCGCAGTGAATTAATCCGCTTGTCAACTATCCGGCGGAGC  
 GGATCGTAACCACCAAGCTAGCCTGCAGCAGTACTATATCCACGCGAGCCCGGAGAGTGTCTGCCGTTACTGC  
 AGAAATATCAGCTGGCGTGGCAGGCCACGCGCTATATATCGGCACTATGGAGCCACGTAATAATCCGAGGCC  
 TGCTGCATGCCTATCAGCTGCTACCGATGGAGATCCGATGCGCTATCCGCTAATCCTTAGCGGCTATCGCGGCT

GGGAAGACGATGTGCTGTGGCAGTTAGTCGAGCGCGGTTACTCGGGAAGGCTGGATCCGTTACCTCGGATATGTTCCGGATGAAGACCTGCCGTATCTGTACGCAGCGGCCAGAGTCTTTGTTTATCCCTCCTTCTACGAGGGATTCCGGTTACCTATTCTGAAGCGATGTCTTGGGTGTGCCGGTAGTATGCTCCAATGTCACCTCTTTGCCTGAGGTTGTTGGGATGCCGGCCTCGTTGCCGATCCTAATGATATAGACCGCGATTAGCGCGCAAATTTTGCAGAGCCTGCAAGATGATAGCTGGCGGAAATCGCCACCGCGCGGCTTGTCTCAGGCGAAACAGTTTTTCGTGGGAGAACTGTGCGACACAGACCATTAACGCCATAAATTACTCTAAGGGTGTGAGTTGAGAGTTCTACACGTCTATAAGACTTACTATCCCCATACCTACGGCGGTATTGAGCAGGTCATTTATCAGCTAAGTCAGGGCTGCGCCCGCGGGGAATCGCAGCCGATGTTTTCACTTTTAGCCCGGACAAAGATACAGGTCCTGTGCTTACGAAGATCATCGGGTCATTTATAATAAACAGCTTTTTGAAATTTGCCCTCCACGCCGTTTTTCGCTGAAAGCGTTAAAGCGTTTTAAGCTGATTAAGATGACTACGATATCATCAACTACCATTTTTCCGTTTTCCCTTTATGGATATGCTGCATCTTTCCGGCGCGGCTGACGCCAGGACTGTGGTAGCCTATCCTGTATAGTGAACAAAAACGGTTAATGAAGCTGTACCAGCCGCTGCAGGAGCGATTTCTCAGCGCGTAGATTGCATCGTTGCCTCGTCGCCAATTACGTGGCTTCCAGCCAGACCCTGAAAAAATATCTGGATAAAACGGTGGTGTATCCGTTTTGGTCTGGAGCAGCAGGACGTGCAGCACGATCCGCAGAGGGTCGCGCACTGGCGGAACTGTCCGGGATAAGTTCTTTCTCTTCTCGTCCGCACTTTCCGCTACTACAAAGGGCTGCATATTCTGATGGATGCCGCTGAGCGTAGCCGACTGCCAGTGGTGGTGTAGGGGGCGGGCCGCTGGAATCGGAAGTCGCGCGTGAAGCGCAGCAGCGGGCTGAGCAATGTGATGTTTACCGCATGCTCAACGACGAAGATAAGTACATTTCTTCCAGCTCTCCGGGGCGTGGTATTTCCCTCGCATCTGCGCTCTGAGGCGTTTTGGCATTACGTTATTGGAAGGCGCAGCCTTTGCAAGCCGCTGATCTTGGCAGATCGGTACAGGTACCTTTTTCATTAACCAGGACAAAGTGGTGGTGGCTGATTTCCGCGAATGATAGCCAGGCGTGGTGGAGCGATGAATGAGCTCTGGAATAACGAGGAAACCTCCAACCGCTATGGCGAAAACCTCGCTCGTCTGTTTTGAAGAGATGTTTACTGCCGACCATATGATTGACGCCTATGTCAATCTCTACACTACATTGCTGAAAGCAAATCCTGAGCGGCCGAGCTCGTCGACTCGAGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACCTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTCAGGCCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGGATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCCGTTATGGCAGGTATGGAAACGCAACCTTGGCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAAGTGAATGCGCAAAAATCCAGGCAAGAACTGGTTCTTACTATAACGGTGAAGAGTGTGTGCAATCTCTGGAACCGCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATGATGGTGGTAAACCTTCTTCCAGGACACTATTCGTCGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGCTTTAACTTCATCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGTCTTCTATATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATGGTAGCACCGATCCTGACCAAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATAATTGGTGGCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTCAACACGGTATGGAAACGCGGATATGCAGCTGATTTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGAAATAACGGTGAACGAGCAGTTACCTGATCGACATCACAAAGATATCTTACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACCGGTAATGGACCAGCCAGAGCGCGTGGATCTCGGCGAACCGTGTGCTGATTACCGAGTCTGTGTTGCACGTTATATCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTGCGGCATCTAAAGTCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTGCTGCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGCCTGCTGCTGAAGTACAACTGGGATCTGAACTACGGCGAAATCGCGAAGATTTCTGCTGCTGGTACCTCGTCAGTCCGTGCGCAGTTCCCTGCAGAAAATCACCAGAAAATCACCAGATGCTTATGCCGAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGCTCCGTACTTCAAGCAAATGCGCGTACTACCAGCAGGCGCTGCGTGTGCTGCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCCGGTCCGACCTTCTCCGACGCGGTTGCCATTTACGACAGCTACCGTGTGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTACTATTTGGTGGCATACTTATAAGCGTATTGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTA

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

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCGATACCCAAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCACTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAA GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACCGCGTGCAGAAACCACTTCGACACCTTTATGAGTTAGAATCACTCCTTGAGCAGCGGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTTATG AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTTGGTACAACCCA TTTGTGCTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGTGCCATG ATTTGCACGTTTCAACGAAACGGGCCGAGCCAGGTGCTGGCAAAACGATGCGCGGGTACCTCTCTGAATACTCC GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGAT CAGCCGACAGCCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTGCTGATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAAGTGAACGCTACTCAGCCTGGTGCATGGGACGTATTACGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCC GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTTGTGAAG TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA

TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAGTAATTTGTTGCGAA  
 TCTTCCTGCCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA  
 GGATTTTTCTTGTTTCCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCGTTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA  
 ACGTCGTCACATCATAGGCATGCATGCAGTGTCTGTGTAGCTGTAAAGCCAGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC  
 CTCTATTAATCAAACCTGAGAGCCGCTTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGCTAGCATG  
 AGCAAACTAAACTAAATGTTCTTTACCTTGCAATAAGTCAGGGTGCCAATTACCTACTGCCATTATTAATTTTT  
 CCTTATCTTGTAGAGTCATTGGTGTATCGAATTTTTGGTGTATCTGAGTTTTTCATTGATAACTATAACAAGTGTG  
 TTAATGGTTGTTGAATATGGTTTTGGATATAGTGGGACAAGAGAAATAGCACTAAATAACGATAAAAAATACCAT  
 TCTGAATTTTTTTGCGGTGTGGTGTCTGCTGTTTTATTAATGCTAATTCAGCTATAAATACTCATAATACTC  
 TGTTTTTTTTATGTTTTAACGACGTTAAGTCTTTGTTATGTGTTGGTTTTCTGTCCGTAATTCAGGTGTTTTT  
 AATCCAAATTTGGTTTTGCAAGGTAAGGAAATGATGAGTGTGATGGCTGTGCTGTCATATTTTACGAGGCATA  
 GCAGTCGTTGCAGTTTATCTAATTATAAAACCCGCAACGCCGATGTACATCAGTGCCTTATTATTGAGCATGCCA  
 TATATTTTGTATTCATTCTGTGGCGTTGCCTACTTACTTATTATCAAGGAGATTTTTTTATGTAGGCCACCATA  
 AAGAAAATCAAGTAATTTAAAAAATGGATTTCAATTTTTTTGTTCAACACTTGCAGTGTAGTCATACACAATG  
 TTGACCCCTCTTGTATTGGGTGGCGTATCTGGAAAGTTGATGTAGGCATCTTAACTCAGCTAACATGATCAAAA  
 CAAGGTTTGGCTGGACTTGCATCACCATTAGTCCAAGCTTTTTATCCAAGAATTAACATTTTGCAAAGAGAGAAT  
 CCATATATTGCAAACCTAAAACTAGAAATGATTCTTAAATACTTGGCTTGTTTTTTACATGGCTTTAGCAATACCA  
 TTTTTACTTTTTGCCAACCAATTATCATTATTAATATTCGGCATGAAAGGTGAAGTAATTCAGGTGCAATGCAA  
 TTAATGACATTGCTTCTATATTCATAGGTTTTAATACAGTTGTCCGGTTACTTGTATTAGTACCTAATGGGATG  
 CAAAAACAGTATTTCAAATCTATTTTCTAGGAACCTACTTGTTTAAGCATAGTTTATCCAGCATGTAATAT  
 TATGGAGCAACGGGTGCGATTGTGAGTCTTATTGTAGCTGAAATTTTCTGTTGGCATGGGAATGCTTAAACAATTC  
 ATTAAGTAAATAAAACCGTATGTAGGCCCTATAAATTATGAATATCTCGGTAATAATACTGTTTTGGAACGCC  
 CAGTTCATAGATAATGATTCTCTGAGCTCGATTCTCAGGCTAAAGACAATAGTCTACACCTAGAAGTAATG  
 TTTCCGATAGTCATAGTGGTAAAGAAATGATGATGATGTTGCTGATAATATTCATAAAAAGAAAAATATTAATA  
 TTATCCATCAACATACTAAAAATATACTCTCCGCTAAGCGCAATTTCCGAGCATCCCTAGCCCATGGGGATTATT  
 TAATATTTCTTGATGATGATTGTATACCCGCAAGTGGATATATATCATCGTTGCTGACTATTTAAAAAAATGA  
 ATAGTAAAAGCGTTTTATGTGGGGAAGTAGATTGCAAAATGAACTCATGAGACCAGCAATTAATCTCGCTACA  
 GGAATCTTTACACCCTAAGTTAGTGATAGTCTGATATCTCTATGAATGCCTGGACTTTTTGTGCAATGAAT  
 GTGTTCTTGATAGAAAGGCATTTTCATCAGGTATAGTTTATATAATGAAAATTTTATTGGTTATGGTTGTGAAG  
 ATCATGATTTGGTTGGCAACTTGAAAAAATGACTTCAAAATTAATTTTGTGCTGATTTTAAATATTAATCACG  
 AATACAGTGGCGATATAGAAGGATATACAAAAAAATTCGTGCTACAGCACGTGATGGTATGAATGTATTAAGCA  
 AAGTAAGGCCTGAAATGTTTTCTACTAATAAAAAATTAATCTTAGTTGAGAAAATATTTAGTAAACACAAAACGT  
 TTAGTAAAATATGCCAATCAATATTTTCAATAAATTTATTTTTAAAAAAATAATACAATTTTAAAAAAACAG  
 ATGCAATAAAAAACTCTATTTCCCAATTTCTTACAGATATGTGTTGATTTCCGGCATATATACATGGTATTGGAG  
 AGCGTGGCACCTCAAAAACAGATGATTTGCTTAAGAATCGGTATATATAGATGATGCTATCTTCATTTATTAAGA  
 CATTTGTATGGAAGTTAAAAACAATGAAGTATAATGCATTTGATGGCTTTTTATTATTTTTGTTGTTTTTTTT  
 AGATTTGCTGCTGATAAATCTTTCTTATATTTGGCATTTATTCTGCAATTTTTTGGTATTATGATTTTGTGCT  
 AATTTTTATGATTACTATGGGCAATGGATTGGTATCTATAGATCGTAAAAATTTGTTGCTGTTATCTATATTCATA  
 ATTATTTTTTTATTTTTGTTTGGTTTTCGATTTGTTTTCAAAAAGCCATTCTTTTCAAAGTTATTTTACCCTAGA  
 TTATTTATGTTGTTTTATTTTCAATTTGTTTCTGCTATTTATTTAGTAAATAGATTCAATAAGGGTGACTTGAAA  
 TTAATGGAGCGAATATTAGTGTATTTCTCTGGGTTCAAATAGTTATTTTTTTTTGGTATGTATATAAGTCCAGAG  
 TTAATAAGATTGTTATATACTTTCTTTGGTATGTCTGACTCTGTTAATCTTTGGGAACAAAATGCTAAAGTAAGA  
 GGATTTGGGTTGTCCGGTGAAATAAATTTTATGACACCATTTTTTGGTATGATCTATATGTCATTTTTTATGATGAAA  
 AGGCGTTATGCTTTAATTAATTTGTTGCTGACTCAAATCGTAAATTTCTAACATGGCTGTGATTGCAGCCATT  
 ATTGGTATCGGTTGCTCTAGACTTAATATTAATAAAAAATGCAACAGTATTGATTTTGGGAGTTTTAGTTTAT  
 AGCTTAGGAGCGGTGTTCTTTCTCGATTTTATGATGAGTTTCGTTTTCTGGAGATGGCACAAGAATCTGGATATC  
 TTATTACAGCAACATGTGTTGTTGTAGGTAATTTAGATTTTTTTAATATATATTTGGATTACAGCAAAACATA  
 TCTTCATCAATCCCGATATTAACAAAGTTCGGATATGGGCTGGGTTATACTGTTAATTAACGGTGGGTTAACA  
 TTTATTACACTTTTTTATTTTTAATCTTTACTATTTCTATTGCGACATTTGGAATGACATATCAAGCAATTATA  
 TGGATGTTAATTTGGGATAATTTTTCAATACCAAGGTTTTAGTTTTAGGATCTAACGGCTATTTCTTTCTATCTTTT  
 ATATATATGTTTTTGAATAGAGTAACACTTAGTGGACAGAGTTCAATTAATAAGTTAGGTCAAGTAAGTAAA  
 TAGCTCCAGAGTATATTTGTCAATGATTTGAGGTTCCGTTATTATGTTTTCATCTAAAACACTGTTAATTAATG  
 GTGGTACTGGCTCTTTCCGGAAATGCTGTATTAATAGATTTCTTGATACAGATATTGCAGAAAATCCGTATATTTA  
 GTCGTGATGAAAAAACAAGATGATATGCGGAAAAAATCAATAATCAAAAATTAAGTTCTATATTTGGTGTATG  
 TCAGAGATTACCGTAGTATTTTGAATGCGACTCGCGGTGTTGATTTTTATATATCATGCAGCGGCCTTAAGCAAG  
 TTCCATCATGTGAATTTTATCCTATGGAAGCCGTTAAACTAATATCCTTGGTACGGAAAATGTTCTTGAAGCAG  
 CTATAGCGAATGAAGTGAAGAGGGTTGTATGCCTAAGTACTGATAAAGCTGTATACCCGATTAACGCAATGGGTA  
 TTTCAAAAGCTATGATGGAAAAGGTCATGGTCCGGAATCCCATAATGTTGATCGCAATAAAAACAGTAATATGTG  
 GTACCCGTTATGGGAATGTTATGGCATCTCGCGGTTGAGTTATCCATTTATTTGTTGATCTATTAGAGCGGGCA  
 AGCCACTCAATAACTGATCCTAATATGACCCGCTTTTATGATGACTCTTGGAGTATGCGGTAGATTTAGTTCTTT

ATGCGTTTGAACATGGTAATAATGGTGATATCTTTGTGCAAAAAGCACCTGCAGCAACTATTGACACATTAGCTA  
 TTGCTTTAAAGGAATTACTAAATGTTCTGACCATCCGGTAAATGTCATTGGAACGCGTCATGGCGAGAAATTAT  
 ATGAAGCTCTACTTAGTCGTGAGGAAATGATCGCTGCTATAGATATGGGCGATTATTACCGTGTCCCGCCAGATC  
 TTCGTGACCTTAATTTAGGCAAAATATGTTGAGCAAGGTGATAGCCGAATATCTGAAATAGAAGATTATAACTCTC  
 ATAATACTCAACGGTTAGATGTTGAAGGCATGAAAGAGCTCTTGCTAAAATTAGCCTTTATTTCGAGCAATTCGTG  
 CTGGTGAAAAATATAATCTGGATTCATGATATGAAAAATATTAGTTACTGGTGCAAATGGTTTTATTGGTCGTAAT  
 TTATGTTTGAGGCTTGAGGAACCTGGTTATAAAGATCTTATTAGAATTGATCGAGAATCAACGAAGCAAGATCTT  
 GAACAAGGCTTACAGGATGCCGATTTTATTTATCACTTAGCTGGTATCAATAGACCTAAGACTGATGATGAGTTT  
 ATTTCTGGAAACAGTGATTTAACAAAGCATATAGTTGAGTATCTCCTTTCTATTGGTAAGAATACACCAATTATG  
 CTAAGTTCTTCGATACAAGCTGAACTTAATAATGCTTATGGGGTTAGCAAAGCTGTAGCTGAAAGCTATGTGCAA  
 AAATATGCTGCTGCTAGTGGTCTTCGATTTATATTTTTCAGATATCCAAACGTTTTTGGTAAATGGTGAAGCCA  
 AACTATAATCTTTTATAGCAACTTTTTGCTACAATATTTCCAATGATATTGAGATTACTATCAATGATGACAGCA  
 ACGCCAGTCAATCTGGTCTATATTGATGATGTTTTGTACTGATGCTATAGCTCTTCTCTCTGGGACGGTTGAAAGT  
 GGATATAAAGTTGTTGCACCAATTTATTCAACAACAGTTGGTGAAGTTGCAGAATTAATTTATAGCTTCAAAAAT  
 AGCCGTTCCACCCTGATCACAGAGGCTGTCGGGGCGGGATTTACCCGTCGATTTGATTCTACATGGCTGAGTTAT  
 TTACCAGCAGAGAAGTTTGGCTACAAGGTACCTTTTTTATGGGGATGCCCGCGGAGTCTTTTTGTGAGATGTTGAAA  
 ACGCCTTCAGCGGGGACGTTTTTCATTTTTACTGCTCACCTGGTATTACGCGTGGCGGACATTACCATCACAGT  
 AAAAATGAGAAGTTTTTGGTCATTTCGAGGTGAGGCATGCTTTAAATTTGAACATGTGATTACCGGTGAGCGATAT  
 GAATGAAAGTTTTCATCGGGTGGTGAAGATTGTTGAAACAGTTCTGGTTGGACACATGACATTACAAATATT  
 GGAAGTATGAATTAATAGTCATGCTCTGGGCAAATGAAATTTCAACCGTATGAGCCCGATACATTGCGAGA  
 CCTCTATAATGAAAAAATTTAAAGTTTATGTCTGTTGTTGGAACCCGTCCTGAGATTATCCGTTTTGTCGAGGGTTC  
 TTGCTAAGTTTATGAATACTGCGAGCATATTATTGTCATACTGGTCAAATTTATGATTACGAATTAATGAAG  
 TGTTCTTCAATGACTTGGGTGTTGCAAAACCTGATTATTTTTTAAATGCAGCGGGTAAAAATGCGGCGGAAACCA  
 TTGGTCAGGTTATTATTAAGGTAGATGAAGTATTAGAAATCGAAAAACCTGAAGCAATACTGGTATTGGGCGATA  
 CGAATTCATGATTTCTGCCATTCGGGCCAAACGCCGTAAAGTGCCTATATTTTCAATATGGAAGCAGGTAACCGTT  
 GTTTCGATCAACGCGTGCCTGAAGAAACCAACAGCAGTATTGTTGACCATACGGCTGATATCAATATGACCTACA  
 GTGATATTGCTCGTGAATATCTCTGGCTGAAGGTATCCGAGCTGATCGGATCATAAAAACTGGTAGCCCTATGT  
 TTGAGGTTCTTTCATATTATATGCCCAAATGATGGTTGATGTTGCTATCGCGTTTTGAATCTACAGTCTGGTG  
 AGTTTTTTGTAGTAAGTGCAGCATCGTGAAGAGAATGTTGATTCTCCAAAACAGCTCGTAAAGCTTGCAGAACATTC  
 TAAATACTGTTGCTGAAAAATATAATCTTCCAGTTATTGTCTCCACACACCCCAAGGACACGTAACCGAATCCGTG  
 AGCAAGGAATGAATTTTCAATCAAATATAAATCTACTGAAACCATTTGGGTTTCCATGATTATAACCACTTGCAGA  
 AGAACTCACGAGCTGTGCTTTTCCAGATAGCGGTACTATCACTGAAGAGTCATCCATCATGAATTTCCAGCGGTAA  
 ACATCCGGGAAGCGCATGAGCGTCCGGGAAGGCTTTGAGGAAGCATCCGTCATGATGGTGGGGTTAGAGTGTGAAC  
 CGGTATTACAAGCGCTGATATTCTGGCAACACACCCGAGGTGAAGTCCGTTCTTTTACGTTAGGTTAGTGAAT  
 ACAGCATGCCAAATGTGTGCGATAAAGTTGTGAGAATTTGTTCACTCTTACACAGATTATGTTAAGAGAGTCTGCT  
 GGAAAGAATATTGATGAACTTGTCTTAAATCATAGATGATTACCTGCCAACAGTACTCGTGTGGTGCAAAAAT  
 GTTTCATGAACTTGTCAAGAATTTATCCAGCGTGGGCACGATGTTACGGTAATTAATCTCTGGTACGGGCATGCA  
 AGAAGAGATTTCTTTTATACCTTTTCAAGGGGTAACCAATGCGGTTTTTAAAGCGGGCCGCTCAAGGATGTAAG  
 TAAATTCAGCGAGCGGTCAATGAAACGCTTTTTGTCTTATCGGGCGTGGAAAGCCATCAAAAATGGGTAAAAAA  
 AGAGACCTTTGAGGGGGTGAATTTATTTTACCTTCCATATTCTGGGGGCTTTAGTTAAAAAAATTAAGGCTCG  
 TTGCCAATGTCTGCTTATCTTATTTAAGAGATGTTTCCACAATGGGTAATGATGCAGGAATGCTTAATGC  
 TGGTTCCCAAATAGAACGCTACTTTCTGCTTTTTTGA AAAAATATCTTATCGTCAGGCAAATCGTATTGGACTTAT  
 GTCTGATAAGAATCTTGATGTTTTTTCGAAAGATAATAAAGGCTATCCGTGCGAAGTTTTTGCCTAATTTGGGCATC  
 CCTAACCCAACGATCATACCCAAGGATTATATACCACTACGTAAGCGACTTGGCCTAGAGGATAAAAACATTTT  
 CTTCTATGGTGGAAACATAGGTCATGCACAGGACATGACAACTTGATGCGACTTGTGAGAAACATGGCAGCATA  
 TCCTCAAGCTCATTTCTATTTATTTGGCCAGGGGGATGAAGTTGAATTAATTAATTCATTAGCATCTGAGTGGGC  
 ATTGACGAATTTACCTATTTGCCCTCGGTTAACCAAGATGAATTTAAGTTCATTTTGTGCGAAATGGATATCGG  
 CTTGTTTTCTTTCCGCTAGACACTCTTCCATAATTTTCTGGTAAGTTATTAGGCTATATGGTTTCACTGCT  
 ACCTATTTTAGGTAGCGTAAATGCCGAAATGATTTGCTGACATTGTCAATCAAATAATGCGGGATTAAATCCA  
 TGTCAATGGTGAGGACGATAAATATGTCAATCTGCGCTATTAATGTTGCATGATATTGATGTGCGCCGCAACT  
 TGGTTCGGGGGCGAATATATTGTTGAAAGAACAATTTCCGTTGAGTCTGCGGCACAGACGATAGAAATGAGGTT  
 GGAGGCATGCAATGCGATTAATTGATAATGACCAACTCGACGAATTATATGATCAAGCCGGGCAATCGGAACGTT  
 TACGTTCCCACCTTATGATGCACGGCTCGCATCAAGAAAGGTACAGCGTTTACTTATTGCATTAGTAAAGGGCA  
 GCTATGTTGAACCGCATTATCACGAACTTCTCATCAGTGGGAAATGTTTCAATGTTATGGAGGGGCAACTTCAGG  
 TTTGTTTTGTATGGTAGAAATGGTGAAGTTATAAAGCAATTTATAGCAGGAGATAATACTGGAATGAGCATTGTGG  
 AGTTTTCTCCGGGCGATACACAGTGTGCAATGCCATCTCCGCTGCTCTTATGGTGGAGTTAAGGAGGGGG  
 CTTTTGACCTTCTTTTGA AAAATCGTTCTGTGTGAGCGCCGCGAGCTCGTGCAGTCCGAGGATCCGTTGAGGCTG  
 GAGCTGCTTCAAGTTTCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTATATGG  
 AATAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACA  
 TTCCAGGCCGCGAGCATTACGCGGGTATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTA

GTCGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAAC  
 CGTTCCCGTGAGAAGACGGAAAGAGTGTATGCGGAAAATCCAGGCAAGAACTGGTTCCCTTACTATACGGTGAAA  
 GAGTTTGTGCAATCTCTGGAAACGCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTAAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCT  
 ATTGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATGATGGTGGTAACACCTTCTTCCAGGACACT  
 ATTCGTGTAATCGTGAGCTTTAGCAGAGGGCTTTAACTTCATCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGG  
 GCGCTGAAAGGTCCTTCTATATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTGGTAGCACCGATCCTGACCAA  
 ATCGCCCGCTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTTGGTGCCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAG  
 ATGGTTCAACCGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTG  
 AACCTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTACCAGTGGAAATAACGGTGAAGTGAAGCAGTTACCTGATCGAC  
 ATCACCAAAGATATCTCACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCT  
 AACAAAGGTACCGGTAATGGACCAGCCAGAGCGCGTGGATCTCGCGAACCGCTGTCGCTGATTACCGAGTCT  
 GTGTTTGCACGTTATATCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTGGCCGATCTAAAGTTCTCTGCTGGTCCGCAAGCA  
 CAGCCAGCAGGCGACAAGGTGAGTTCATCGAAAAGTTCGTGCTGCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTAC  
 GCCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGTGCTGCTGTAAGAGTACAACTGGGATCTGAACTACGGCGAAATCGCGAAG  
 ATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCTGCAGAAAATCACCGATGCTTATGCCGAAAATCCACAG  
 ATCTCAACCTGTTGCTGGTCCGTACTTCAAGCAAAATTCAGGATGACTACCAGCAGGCGCTGCTGATGCTGCT  
 GCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCCGGTTCGACCTTCTCCGACGGTTGCTTATACGACAGCTACCGTGTGCT  
 GCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTACTATTTTGGTGCGCATACTTATAAGCGTATTGATAAA  
 GAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

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

ATGACGAATTTAAAGCAGTTATTCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGGGATACCC  
 AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTACGTACATTTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAA  
 GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAGAACCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA  
 CTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG  
 AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGAACCCCA  
 TTTGTGCTGCTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATG  
 ATTTGCACGTTTCAACGAAACGGGCGCAGCCAGGTGCTGGCAAAACGATGCGGGGTGACCTCTCTGAATACTCC  
 GTCATCCAGATAAAGAGCCGCTGGACCGTGAAGGTAAGTACGCGCATTGTTGAATTTATCGAAAACCGGAT  
 CAGCCGACAGCCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGTGCCTATGTCTTCTGCCGATATTTGGCCGAACTG  
 GAACGTAATCAGCCTGGTGCATGGGGACGTAATCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAACAATCC  
 GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACGTTACGACTGCGGCAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG  
 TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGGCAAGTTCGGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAA  
 TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATATAACGGCAGTGAATTTCCGACGAAAAGTAATTTGTTGCGAA  
 TCTTCCGTGCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTATTCAAAGTTTCCAA  
 GGATTTTCTTGTTCAGAGCGGATTGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTATAGCGGAGTGGGTA  
 ACGCTCGTCACATCATAGGCATGCATGCAGTGTCTGGTAGCTGTAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC  
 CTCTATTAATCAAACCTGAGAGCCGCTTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGTGAATA  
 CTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTTGGTTAGCTGTAGTTCGTACATTTATAAATAATACGCAGGATAGTGT  
 GTTAATGTCGATAAATTAACGTACGCCGAAACCGGAATCACTTGTGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATGTT  
 TTTGAACATGCGGATATTTGCGATGCACCTGCAATGGCAGGATTTTGTGCTCAGCATCAGCCGGATGCAGTGATG  
 CACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTTGGT  
 ACTTATGTCCTTTTGAAGCCGCTCGCAATTAAGTCTGCTCTTGTATAGCGACAAGAAAAATAGCTTCCGTTTT  
 CATCATATTTCTACTGACGAAGTCTATGGTGATTTGCCTCATCCAGATGAAGTAATAATACAGAAGAAATACCC  
 TTATTTACTGAGACGACGCTTACGCGCAAGCAGCCCTTATTCGCGATCCAAAGCATCCAGCGATCATTTAGTC  
 CGCGCTGGAAACGTACATATGGTTTACCAGCAATTTGACTAATTTGCTCGAACAACTATGGTCCCTTATCATTT  
 CCGGAAAAGCTTATTTCCACTGTTTATTCTTAATGCACTGGAAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAAAGGAGAT  
 CAGATCCGCGACTGGTTGTATGTTGAAGATCATGCGCGTGCCTTATATACCGTTCGTAACCGAAGGTAAGCGGGT  
 GAAACTTATAACATTTGGTGGGCACAACGAAAAGAAAACATCGATGTAGTGCTCACTATTTGTGATTTGCTGGAT  
 GAGATTGTACCGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAATCACTTATGTGCTGATCGTCCGGGACACGATCGCCG  
 TATGCTATTGATGCTGAGAAGATTGGTCCGCGATTGGGATGGAACCCACAGGAAACGTTTGAAGCGGGATTTCGT  
 AAAACGGTGAATGGTACCTGTCCAATACAAAATGGTTGATAATGTGAAAAGTGGTGCCTATCAATCGTGGATT  
 GAACAGAATGAGGGCCGAGTAATGAATATCCTCCTTTTGGCAAACAGGGCAGGTAGGTTGGGAACCTAC  
 AGCGTGCTTGGCACCTTTGGGTAATTTGATTGCTTTTGTGTTCACTCTACTGATTTATGCGGTGATTTTAGTA  
 ATCCTGAAGGTGTAGCTGAAACCGTAAGAAGCATTCCGCCGATATTTGTCAATGCAGCCGCTCACACCGCAG  
 TAGACAAAGCAGAAATCAGAACCGGAGTTTGCACAATTAATTAACGCAACAAGTGTGGAAGCGATTGCGAAAGCAG  
 CAAATGAAGTTGGAGCCTGGGTTATCCATTAAGTCTGACTGATTACGCTTTCCTGGAATGGCGATATGCCATGGC

TGGAGACGGATGCAACCGCACCTAAATGTTTACGGTGAACCAAGTTAGCCGGAGAAAAAGCGTTACAGGAAT  
 ATTGCGCGAAGCATCTTATTTTCCGGACCAGCTGGGTCTATGCAGGAAAAGGAAATAACTTCGCCAAAACGATGT  
 TACGTCTGGCAAAGAGCGTGAAGAATTAGCGGTATTAACGATCAGTTTGGTGCCCAACAGGTTGCTGAAGTGC  
 TGGCTGATTGTACAGCACATGCCATTCTGTGCGACTGAATAACCGGATGTGCGAGGCTGTACCATTGGGTAG  
 CCAGTGGTACCACAACCTGGTACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGCATTTCCCTTG  
 CACTCAACAAGCTCAACGCGAGTACCAACAACAGCCTATCCTACACCAGCTCGTCCGTCACATAACTCTCGCTTA  
 ATACAGAAAAATTTTACGAGAATTTTGCCTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTTGGCGTGAACGAATGCTCAATG  
 AATTATTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTGATGGTGGAGCAAGATGAATTTAAAGGA  
 ATGATGAAATGAAATGCGTAAAGGTATTTATTTTAGCGGGTGGTCTGGTACACGCTTTATCCTGTGACTATGG  
 CTGTGAGTAAACAGCTATTACCTATTTATGATAAACCGATGATCTATTACCCGCTCTCTACACTGATGTTGGCGG  
 GTATTCCGGATATTTTGGATTATCAGTACACCTCAGGATCTCCTCGTTTTCAACAATTGCTGGGTGACGGTAGCC  
 AGTGGGGCCTGAATCTCAGTACAAAGTGCAACCTAGCCAGATGGCCTCGCGCAGGCATTTATCATCGGTGAAG  
 AGTTTTATTGGTGGTGTGATTGTGCTTTGGTTCTTGGTGATAATATCTTTTACGGTCCAGATCTGCCGAAGCTAA  
 TGGAGGCGCTGTTAAACAAGAAAGTGGTGAACGGTATTTGCCTATCAGTTAATGATCCAGAACGCTATGGTG  
 TCGTTGAGTTTTGATAAAAACGGTACGGCAATCAGTCTGGAAGAAAACCGTTAGAACCAGAGTAATTTACGCCG  
 TTACAGGTCTGTACTTTTATGATAACGACGTGGTTCAGATGGCGAAAAACTTGAAGCCGCTCTGCACGTGGTGTG  
 TAGAAATTACAGATATTAACCGTATTTATCTTGAGCAGGGACGCTGTCTGTGCGGATGATGGGGCGTGGCTACG  
 CGTGGCTGGACACGGGGACTCATCAGAGTCTGATAGAAAGCAAGTAATTTTATTGCGACAATTGAAGAGCCGAGG  
 GATTGAAGGTTTTCTGTCTGAAGAGATTGCATTTCTGTAAGGTTTTTATTGATGTTGAGCAAGTAAGAAAATTAG  
 CTGTACCATAATAAAGAATAATTATGGGCAGTATCTTTATAAAAATGACGAAGGATTCAAATTAATGAATGTGAT  
 TAGAACTGAAATTTGAAGATGTGCTAATTTCTGGAGCCAAGAGTATTTGGTGATGATAGAGGTTTTCTTTTATGAGAG  
 CTTTATCAATCAGCATTTGAACATATTTCTAGGCTATCCGGTCCAGCTTTGTTCAAGACAATCACTCACGTTTATC  
 AAAAAATGTACTCAGAGGCTTCACTTTCAACGCGCGGAGTACGCACAAGATAAACTTGTACGCTGCATCATGG  
 AGCATTTTTTGTGTTGCTGTTGATATTCGACCCAATTCCGGTATCCTTTGGTAAATGGGTTGGTCTCTGCTTTT  
 AGCTGATAATAAGCAGCAGTTGTGGATACCAAAAGGTTTTGCTCATGGCTTTTTTGGTTCTGTCTGATATCGCTGA  
 ATTTCAATATAAACTACAACTATTTATCATCCTGAAAGCGATTGTGGAATATGTTGGAATGATGAACGCATTGC  
 AATTGATTGGCCCCAAACATCAGGGTTAATCCTTTCCGCCAAAAGATGAAAGGCTCTTTACGTTAGATGAGCTTAT  
 CAGATTTAAATTAATTCATGAATACGAATAAATTATCTTTAAGAAGAACGTTATATATCTGGCTGTCTGTTCAA  
 GGTAGCAATTTATCTTTTACCATTGCTTACATTTCCATATCTTGTAAAGAACACTTGGTCTGAAAATTTCCGTATA  
 TTCGGTTTTTGGCAAGCGACTATGCTATATATGATAATGTTTTGTTGAATATGGTTTTCAATCTCACAGCAACTCAG  
 AGTATTGCCAAAGCAGCAGATAGTAAAGATAAAGTAAACGCTATTTTTTTGGGCGGTGATTTTTTCAAAAATAGTT  
 CTTATCGTCATTACATTGATTTTTCTTAACTGCGATGACCTTGCTTGTTCCTGAATATAACAAGCATGCCGTAAT  
 ATATGGTCTGTTTTGTTCTGCATTAGTCGGGAATTTAATCTACCCTATCTGGCTGTTTTCAGGGAAAAGAAAAATG  
 AAATGGCTGACTTTAAGTAGTATTTTTATCCCGCTTGGCTATATCCCTTAACATTTATTTTTGTGAACACAAAG  
 TCAGATATAGCAATTTGCCGGTTTTATTCAGTCAAGTGCAAATCTGGTTGCTGGAATTTATGCACTAGCTATCGTT  
 GTTCAATGAAGGTTGGATTGGTAAAGTTACGCTATCATTACATAATGTGCGTGCATCTTTAGCAGACGGTTTTTCA  
 GTTTTTTATTTCCACATCTGCTATTTAGTTTATATTTCTACGGGAATAGTTATTTATCCTGGGATTTATATCCGACCA  
 ACCTCGTAGGGAATTTAATGCGGCCAATACTATAAGAAACGCGCTTCAAGGGCTATTTAAATCCTATCACCCAA  
 GCAATATACCAAGAATATCAAGTACGCTTGTCTTAAATCGTGTGAAGGTTGTGATTTTAAATAAAAAATCATTG  
 ACCTGCTGAGTTTGTGATTGGTGGTGTCTTTTTTATTAAATCTGCTCTTGGGTGCATCTATACTAGTAAAAATAAGT  
 ATAGGCCGGGATATGATAATGCAGTATTGTGCTAATGATATATCGCTCTGCCTTTTCTTATTTCAATTAAGT  
 AATGCTATGGCATTCAAGTTATGCTGACCCATAATTTAAGAAAGAATTCAGTAAGATTTTAAATCGCTGCGGGT  
 TTGTTGAGTTTGTGTTGATTTTTCCGCTAACAACTCTTTTTAAAGAGATTGGTGCAGCAATAACATTTGCTTGCA  
 ACAGAGTCTTAGTTACGTCACCTCATGCTGATGTTCTGTAAGAAATAATAAATTAAGTTGCTGAGGATTTTAT  
 GTACGATTATATCATTTGTTGGTTCTGGTTGTTGGTGGCGTTTGTGCGAATGAGTTAAAAAAGCTAAACAAAAA  
 AGTTTTAGTGATTGAGAAAAGAAATCATATCGGTGGAAATGCGTACACAGAGGACTGTGAGGGTATCCAGATTCA  
 TAAATATGGTGCACATATTTTTTATACCAATGATAAATATATATGGGATACGTTAATGATTTAGTAGAATTTAA  
 TCGTTTTACTAATTTCTCCACTGGCGATTTATAAAGACAAAATTTTCAACCTTCTTTTTAATATGAATACTTTCCA  
 CCAATGTGGGGAGTTAAAGATCCTCAAGAAGCTCAAAATATCATTAAATGCTCAGAAAAAAAAGTATGGTGACAA  
 GGTACCTGAAAATTTGGAGGAGCAGGCGATTTCAATAGTTGGGGAGGACTTATACCAAGCATTGATAAAGGGTTA  
 TACGGAGAAGCAGTGGGGAAGAAGTGCAAAAGAATTCCTGCATTTATTATTAAGCGAATCCAGTGAAGTTTAC  
 GTTTGATAACAATTTATTTTTCCGATCGCTATCAAGGTATTTCCGGTGGGAGGCTACACTAAGCTTATTGAAAAAT  
 GCTTGAAGGTGTGGACGTAATAATTAGGCATTGATTTTTTGAAGACAAAGATTCTCTAGCGAGTAAAGCCCATAG  
 AATCATCTACACTGGACCCATTGATCAGTACTTCGACTATAGTTTTGGAGCGTTAGAATATCGCTCTTTAAATTT  
 TGAGACGGAACGCCATGAATTTCCAACTTCCAAGGGAATGCAGTAATAAATTTCACTGATGCTAATGTACCATA  
 TACCAGAATAATTGAGCATAAACATTTTACTATGTTGAGACAAAGCATACGGTTGTTACAAAAGAATATCCATT  
 AGAGTGGAAAAGTTGGCGACGAACCTACTATCCAGTTAATGATAAATAAACAATGGAGCTTTTTTAAAGAAATATAG  
 AGAGTTAGCTAGCAGAGAAGACAAGGTTATATTTGGCGGGCGTTGGCCGAGTATAAATATTTATGATATGCATCA  
 AGTGATATCTGCCGCTCTTTATCAAGTAAAAATATAATGAGTACGGATTAATGATCTATCTTGAATTTAGTGTC  
 TTTCTCATTACAGCATTTATCTGTTTTATATCTTAAAGAAGGATATATTTTATCCAGCCGTATGCGTTAATATCATC

TTCGCACTGGTCTTATTGGGATATGAAATAACGTCAGATATATATGCTTTTCAGTTAAATGACGCTACGTTGATT  
 TTTCTACTTTGCAATGTTTTGACATTTACCCTGTCACTTTATTGACGGAAAGTGTATAGATCTAAATATCAGA  
 AAAGTCAATAATGCTATTTATAGCATAACCATCGAAGAAAGTGCATAATGTAGGCTTGTAGTTATTTCTTTTCG  
 ATGATATATATATGCTAGGTTAAGTAACTACCAGTTCGGGACTAGCTTACTTAGCTATATGAATTTGATAAGA  
 GATGCTGATGTTGAAGACACATCAAGAAATTTCTCAGCATACATGCAGCCAATCATTCTAACTACTTTTGGCTTTA  
 TTTATTTGGTCTAAAAAATTTACTAATACAAAGGTAAGTAAAACATTTACTTTACTTGTTTTTATTGTATTCATC  
 TTTGCAATFATACTGAATACTGGTAAGCAAATTTGCTTTATGTTTATCATCTCTTATGCATTTCATCGTAGGTGTT  
 AATAGAGTAAAACATTATGTTTATCTTATACAGCTGTAGGTGTTCTATTTCTCCTTGTATATGCTCTTTTACGT  
 GGACTGCCTGGGGGATGGCATATTATCTATCCATGTATTTGGTCAGCCCTATAATCGCGTTTCAGGAGTTTTAT  
 TTTTCAGCAAGTATCTAACTCTGCCAGTTCTCATGCTTTTTGGTTTTTTGAAAGGCTGATGGGGCTATTAACAGGT  
 GGAGTCTCTATGTCTGCATAAAGAATTTGTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT  
 TATGTTTATATTTCCGCGGAGCTAAGCTATTTGATGATGGTTATTCATGGCTGTATTTTCAGGTGTTTTATGGAGA  
 TTGTCTCGAAATACATATCTGTGAAATATTTTATTTCATATTTTATTATACCTTTTCTTTCATTTTTTATCAT  
 GAAAGCTTCATGACTAATATAGCAGTTGGATACAAATAACTCTTTGTATCATAGTATTTCTCTCAATTTCTTAAG  
 GCCCAGAAAATAAAGTAAAAATGATTTTTTTGAATGATTTAAATTTCTCTAGACCGGATGCTGGATTTAAAGCAA  
 GAAAAGATGCACCTGGACATTGCTTCAGATTATGAAAACATTTCTGTTGTTAACATTCCTCTATGGGGTGGAGTAG  
 TCCAGAGAAATTTACTTCTGTTAAGCTTAGTACATTTCTTGCCTGCTTGGGCTTGGGCTTGGGCTTGGGCTTGGGCT  
 ATTTCCCGATGGCCAAACCATTTTTGGCATATATTGCTATTTCTTTCCCGCTTCTAAATTTAGAATAGTACCTC  
 TGATTTCATGATATTGATGAATTAAGAGGAGGAGGGGTAGTGATTCTGTGCGGCTTGTACCTGTGATATGGTCA  
 TAAGTCACAATCCACAAATGACAAAGTACCTTAGTAAATATATGTCTCAGGATAAAAATCAAAGACATAAAAATAT  
 TTGATTACCTCGTCTCATCTGATGTGGAGCATCGAGATGTTACGGATAAGCAACGAGGGGTTCATATATGCTGGCA  
 ACCTTTCTAGGCAATAATGTTCTTTTCATATACTGAAGGATGCGATTTTACTCTCTTTGGTGTCAACTATGAAA  
 ATAAAGATAATCCTAAATCTTTGGAAGTTTTGATGCTCAATCTCGGAAAAGATTAACCTCCAGGCATGCAAT  
 TTGGACTCATTTGGGATGGAGATTCTGTGAAACCTGTAGTGGTGCCTTTGGCGACTATTTAAAGTTTAAATAACC  
 CTCATAAGACATCTCTTTATCTTTCAATGGAACCTCCAGTATTTATATGGGATAAAGCCGCCCTTGGCGATTTCA  
 TTGTAGATAATAGAATAGGATATGCAGTGGGATCAATCAAAGAAATGCAAGAGATTGTTGACTCCATGACAATAG  
 AAACCTTATAAGCAAATAGTGAGAATACAAAATATTTCTCAGAAAATTCGAACAGGAAGTTACTTCAGGGATG  
 TTCTTGAAGAGGTGATCGATGATCTTAAACTCGCTAAACGATATGGTCTCTGTGGTTTTATTCCGGCTTGTAGA  
 GATGCTTATTGACTCGTGTATTTTACCAGGACTGTAGAATATTTCGATTTCCCTGCTATATTCCGAATGATGGT  
 AGCATTAATTTTGGTGAATAATTTCAAGTGGAGTGGGCTCAGGCTGGATGCAATTTGGAGCTGGGCTGGGCTTTT  
 TTTTCCGATAATGTGCAAGTTAACGACTATGTTTCATATCGCCTCAATTGAGAGCGTTACGATAGGTCCGGATACG  
 CTTATTGCAAGTAAAGTATTTATTACCGATCATAATCACGGTTCCCTTAAAGCACTCTGATCCAATGAGTTCCGCA  
 AATATACCTCCAGACATGCCACGTTGGAATCTTCAGTGTGTAATTTGGCCAGAGGGTTTGGTTGGTGGAGAAT  
 GTGACGGTTTTGCCTGGAACAATTTTGGTAATGGAGTCGTAGTCGGCGCAATTTCTGTTGTTAGAGGTTCTATT  
 CCCGAAAATCTGTCTTGCCTGGGAGTACCAGCAAAAATCATAAAGAAATACAATCATGAGACCAATTTATGGGAA  
 AAAGCATAGTCTGTTGTTTCTGCGGTCAATTTTACCCTGCGGCTCCATTTACCATTTTGAAAAAATTTTGGCAG  
 CAACTAATAATAAAGAAAATGTGAGTTTTATCGCATTAGTCCATTTCTGCTAAAGAGTTAAAAGAAAGTTATCCAT  
 GGGTTAAATTCATTGAGTTTCTGAGGTTAAAGGGTCTGGCTAAAACGTTTGCACCTTTGAATATGTAGTTTGTA  
 AAAAATTTCAAAGAGCTGAATGCTACGCATTTGGATTTGCTGCTGATGATATTACGGCAATGTCTGCTACTAAA  
 AAAGATATGTGATTTGTCATAACCTGCCCTTTTTTATAAAGGAATTTTATTCCGTGAAATTTCTTATGGAGCCTA  
 GCTTTTTCTTATTTAAATGCTATACGGGCTGATATAAAAATAAACATTAATAAATACTGCAGTGTGTTGTTT  
 AACAATTTGGATGAAAGAAAATTTATCAAGAAATATTTATAAATAACATCATTGTCAGTCCGGCCAGAAATTA  
 AATTATCTGATAAAGCCAACTTACTGATGATTTCTCAATTTAAGAATAACCTTCTGAGTTGACAAATTTTT  
 ACCCTGCTGTTCCACGAGTATTTAAAATACGAGCTTATTATTAGTGCAGCAAGGAAATGAAAGAACAATCCA  
 ATATTAATTTCTGCTTACTATCAGTGGTACAGAAAATGCGTATGCAAAATATATTATCAGTCTTGCAGAAGGAC  
 TGGATAATGTTCAATTTCTCGGGTACTTGGATAAAGAAAAATCGATCATTGTTATAATATTTAGATATAGTTT  
 GTTTTCCCTCTAGGTTAGAAACATGGGGATTGCCGTTGTCTGAGGCTAAAAGAGCGAGGTAAGTGGGTATTAGCAT  
 CAGATTTCCCATTTACTAGAGAACTCTTGGTAGTTATGAAAAGAAAGCTTTTTTTGATTCTAATAACGATGACA  
 TGTTAGTTAAACTTATTTGACTTCAAAAAAGGTAACCTCAAAAAAGATATCTCTGATGCAAAATTTCAATTTATC  
 GTAATGAAAATGATTTAGTTGGGTTTGTGAACTAGTTAATTTTATTACTGAAGAACATTTGAAATGGTATATATA  
 ATAATCGTTTCCCACGGACATGAAGACTACATCAAAAAATTTACTCGAAAATCTTAATGCTGACGATGAGCACTAC  
 AAGATTTATCGTACGCGACAACAAGACTCTCTATTATTGAAACAAATATGCCAGCATTATGCAGGCCGACTAT  
 ATTAGTGGAGGTGATACGGCTTTGGTCATAATAATAATATTGCGGTGGCGTATGTAAGGAAAAATATAGACCC  
 GCAGATGATGATTACATTTTGTTTTTGAATCCCGATATCATCATGAAGCATGATGATTTGCTGACATATATTA  
 TATGTCGAAAGTAAGCCTTATGCTTTTGTACTTATGCTGTTCCGAGATGAAGCGAAATCTTTACATGATTTAT  
 TCCGTAAGAAAATTTCTGTGCTTTCTGATTTTATTGTGTCATTTATGTTAGGGATTAATAAAAACAAAAATTCCT  
 AAAGAAAGTATCTATTCTGATACGGTTGTTGATTGGTGGCAGGATCATTTATGCTGGTACGTTTTTTCAGATTTT  
 GTGCGTGTAAATGGCTTCGATCAAGGTTACTTTATGTACTGTGAAGATATTGACCTGTGCTTGGGGCTTAGCCTG  
 GCTGGTGTGCAACTTCATTTATGTTCCCGCTTTTTCATGCGATACATTTATGCTCATCATGACAATCGAAGTTTTTT  
 TCAAAAGCCTTCAGATGGCACTTAAAAGTACTTTTAGATATTTAGCCAGAAAACGTATTTTATCAAATCGCAAC

TTTGATCGAATTTTCATCAGTTTTTACCCGTAAGAGCTCGGTACCCGGGCTAGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC  
 GAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACCTCGGAATAGGAACCTAAGGAGGATATTCATATCCGTCGACGGCG  
 GCCGCCCTGCAGGCATGCAAGCTTGATCCATATGGATCGCTAGCTTAATTAATAAAGCCGTAAGCATATAAGCA  
 TGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTCAGGCCGCGAGCATTGAGCG  
 CGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTATGGGACG  
 CAACCTTGCCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGA  
 AGTGATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAACTGGTTCTTACTATACGGTGAAAGAGTTTGTGCAATCTCTGGAAC  
 GCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCTCAAACCATATCT  
 CGATAAAGGAGACATCATCATGATGGTGGTAACACCTTCTTCCAGGACACTATTCGTCGTAATCGTGAGCTTTC  
 AGCAGAGGGCTTTAACTTCATCGGTACGGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTAT  
 GCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATGGTAGCACCGATCCTGACCAAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGG  
 TGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGCCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTGAATA  
 CGGGCATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCACGAAGAACTGGC  
 GCAGACCTTACCAGGTGAATAACGGTGAACCTGAGCAGTTACCTGATCGACATCACCAGAGATATCTTACCACAA  
 AAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGTAACAAGGTACGGGTAATGGAC  
 CAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGCTGTGCTGATTACCGAGTCTGTGTTTGCACGTTATATCTCTTC  
 TCTGAAAGATCAGCGTGTGGCCGATCTAAAGTTCTCTGCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCCACAAGGCTGA  
 GTTCATCGAAAAAGTTGCTCGTGCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCG  
 TGCTGCGTCTGAAGAGTACAACCTGGGATCTGAACTACGGCGAAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCAT  
 CCGTGCGCAGTTCTGCAAAAAATCACCGATGCTTATGCCGAAAATCCACAGATCGTAACTGTTGCTGGCTCC  
 GTACTTCAAGCAAATGGCCGATGACTACCAGCAGGGCGTGCCTGATGTCGTTGCTTATGCAGTACAGAACGGTAT  
 TCCGGTTCGGACCTTCTCCGAGCGGTTGCCATTAACGACAGCTACCGTGTGCTGTTCTGCCTGCCAACCTGAT  
 CCAGGCACAGCGTGACTATTTGGTGCCATACTTATAAGCGTATTGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATG  
 GCTGGATTAA

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

ATGACGAATTTAAAGCAGTTATTCCGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGCGGATACCC  
 AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTAGTACATTTGTTGACGAGATTTGGCTGCAGGGATCAAA  
 GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA  
 CTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG  
 AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCA  
 TTTGTGCTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGTGCCATG  
 ATTTGACGTTTCAACGAAACGGGCCGAGCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCC  
 GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTTGTTGAATTTATCGAAAAACGGAT  
 CAGCCGCAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTGCTGATGTTCTGCGGATATTTGGCCGGAACCTG  
 GAACGTACTCAGCCTGGTGCATGGGGACGTATTAGTACTGCTGATGCTATTGCCGAGCTGCGGAAAAACAATCC  
 GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTCGCGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG  
 TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA  
 TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAA  
 TCTTCTGCGGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA  
 GGATTTTCTTGTTCAGAGCGGATTTGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCCGGTTTAGCCGAGTGGGTA  
 ACGCTCGTACATCATAGGCATGCATGCAGTCTGCTGGTAGCTGTAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC  
 CTCTATTAATCAAACCTGAGAGCCGCTTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATAAGTGAAAAATA  
 CTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTTGGTTGAGCTGTAGTTCGTCACATTATAAATAATACGCAGGATAGTGT  
 GTTAATGTCGATAAATTAACGTACGCCGGAACCGGGAATCACTTGTGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATGTT  
 TTTGAACATGCGGATATTTGCGATGCACCTGCAATGGCACGGATTTTGTCTCAGCATCAGCCGGATGCAGTGATG  
 CACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATGTTGGT  
 ACTTATGCTCTTTTGGAAAGCCGCTCGCAATTACTGGTCTGCTCTTGTATAGCGACAAGAAAAATAGCTTCCGTTTT  
 CATCATATTTCTACTGACGAAGTCTATGGTGAATTTGCCTCATCCAGATGAAGTAATAATAACAGAAGAAATACCC  
 TTATTTACTGAGACGACAGCTTACGCGCAAGCAGCCCTTATTCGCATCCAAAGCATCCAGCGATCATTTAGTC  
 CGCGCGTGGAAACGTACATATGGTTTACCAGCAATTGTGACTAATTGCTCGAACAACCTATGGTCTTATCATTTCC  
 CCGGAAAAGCTTATCCACTGGTTATCTTAATGCACTGGAAGGTAAGGCATTAACCTATTTATGGCAAGGAGAT  
 CAGATCCGCGACTGGTTGATGTTGAAGATCATGCGCGTGCCTTATATACCGTTCGTAACCGAAGGTAAAGCGGGT  
 GAACTTATAACATTTGGTGGCACAACGAAAAGAAAAACATCGATGTAGTGTCTACTATTTGTGATTTGCTGGAT  
 GAGATTTACCGAAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAAACTACTTATGTTGCTGATCGTCCGGGACACGATCGCCGC  
 TATGCTATTTGATGCTGAGAAGATTGGTGCAGCATTTGGGATGGAAACCACAGGAAACGTTTGGAGCGGGGATTCGT  
 AAAACGGTGGAAATGGTACCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAATGTGAAAAGTGGTGCCTATCAATCGTGATT



GCTCTATATTTATTCCACCAATAATTGCTTTAGGCCAGTTGAATGAAGTAAATAGTAGTCATTTTGGTGAGTATAC  
 GTTTATAGATTCATATATGCTATAACTAATAAAATTTGGCCTTATTAAGAATTGCCAGTAAATACTATTCTTGACTA  
 TTCATACGTTCCGTGTACCAACAAATGTATATACTGCACCTCAACCATTTTACCAGGATTTTGGTTATACTGGCAT  
 CATATTTGGAGCAGTATATACGGACTAATATATGTGAGTTTATACACGGCCGGTGTTCGTGAAATAATACACA  
 GGCATTAAGTATTACGCATTTGTTTTAGTTAGCAGTTGCAACGGCTTTCTCGCTGAAACGCTAGTAACGAAATTT  
 AGCTGAAATGTGATGTTAGTATTATGTACCATCTTACTATGGCGATTTACAGTAATATGCAAAACAGTACAGTA  
 ACCATTCTAATGGCCACCTACAATGGCGAGGCCCTTCATCAAAAATCAGATTTTGTCACTACAACAACAACATTT  
 TCTAACTGGCGGTTATTTATTCCAGGATGATGGGTCTACAGACAATACTATATCTATAATAAAAACTTCCAAAA  
 TCTGACTCCAGAATTCGGCTAGTTGATGATAATTTGAAAGGTCAAGGTGCAGGAAAAAATTTTTTATCGCTGATA  
 AAGTACAGCGAGACAGATTATACAATTTATTGTGACCAAGATGATATTTGGTTAGAAAACAAAATATTTGAATTA  
 GTAAAGTATGCAAATGAAATTAATTAATGAATGTATCAGATGCGCCTTCGCTAGTTTATGCTAATGGCTATAT  
 ATGGATGGTGAGGGTACAATCGATTTTCTGGGATATCTAACAATCATGCTGATCAATTAAGGATTTTCTTTTT  
 TTTAATGGTGGATACCAAGGATGTTCTATTATGTTCAATCGTCAATGACCAAATTTCTTCTGAATTATCGAGGA  
 TTTGTATATCTACATGACGATATCACAACTTAGCTGCATACGCTCTTGGTAAAGTTTATTTCTCCCGAAATAC  
 CTTATGTTATATAGACAGCACACGAATGCGGTAACCTGGTATCAAAACATTCGCAATGGATTGACTTCTAAATTT  
 AAATCACCAGTAACTATCTTTTATCACGAAAACATTTATCAGGTAAAAAAATCTTTTTTTGAATGTAACAGCTCT  
 ATCTTATCAGAGACGAATAAAAAAGTTTTTTGGATTTTATTTTCAATTTTGTGAATCAAATAATAAATTTACAGAT  
 TTTTTTAAGTTATGGCGAGGTGGGTTAGATTAATAACAGTAGAACTAAATTAATTAATAAATTTTAAATACGG  
 AGAAAATTTAGCGAATGATTTCAATACTTACACCTACTTTAATCGGCAACATACTTTTATCAAGGCTATTTCAAT  
 CTCTTATATTACAACTGATAAAGATTTTGTGAGTGGATAATAATTGATGATGGTAGTATAGATGCAACAGCGGTAC  
 TTGTAGAAGATTTTAGAAAAAATGTGATTTGACTTGATTTATTGCTATCAGGAAAATAATGGTAAGCCCATGG  
 CTTTAAACGCTGGTGTAAAGCTTGTAGAGGCGATTATATCTTTATTGTTGACAGTGATGATGCACTAATCCTCCG  
 ATGCCATAAAATTAATTAAGAATCAATACATGATGCTTATCTGAGAAGGAAAGTTTTCAGCGGAGTCCGTTTTTA  
 GAAAAGCATATATAAAAGGGGGGATTTTGGTAATGATTTAAATAATTCTTCAAGACATATATACTAATTTAAATG  
 CGACTGAGATTAGCAATTTAATAAATGGTATGTTGCATATTGTTTTAAAAAAGAAAGTTTGGTAAAAAATCCAT  
 TCCCCGTATAGAAGATGAAAAATTTGTTCCAGAATTTATATTTGGAAATAAAATAACTGACAAGGCGAAGATTC  
 GATTTAACATAAGCAAAGTTATATATCTTTGTGAGTATCTTGATGATGGTCTTTCTAAAAATTTCCATAACCAGC  
 TTAAAAAATACCCAAAGGGGTTTTAAGATTTATTACAAAGATCAAAGAAAACGAGAGAAAACCTTATATAAAAAA  
 CAAAGATGCTAATTAGATATTTGCAATGTTGTTATTATGAGAAAATAAAATGAAAATACTATTTGTCAATACAGG  
 TTTAGGCCTTGAGGTTGCTGAGAAGCAGGTTTGTCTTTTAGCTGATAAATTAAGTTTAAAGCGGGCACCATGTAA  
 GATTAATTTCACTTGGACATATGCTTAATAATAAAGTCTTTCCCTAGCGAAAATAATGTTAATGTCAATTAATGTA  
 TATGTCAAAAAACATTTCTGGAGTTATAAAAGGTTGTGTCAGAATTAGAGATGTTATAGCTAATTTCAAACCAGA  
 CATTTGACACAGTCATATGTTTCATGCAAACATTATCACTAGATTGTCTGTAATTGGAATCAAACAGACCTGG  
 TATTATATCAACTGCACATAATAAAAAATGAAGGTGGGTATTTTCAAGATGCTCACATATAGAATAACCGATTGTTT  
 AAGTATTGTTGTACAAATGTTAGCAAGAAGCAGTGGATGAGTTTTTACGGATAAAAGCCTTTAATCCCGCTAA  
 AGCAATTAATATGTATAATGGGATAGATACCAATAAATTTAAATTTGATTTATTGGCAAGGAGGGAAATTCGAGA  
 CGGTATTAATAAAAAAATGATGATAATATTACTTTGCTGCAGGTCGTTTAACTGTTAGCTAAAGATTATCCTAA  
 TTTAATGAAATGCAATGACTCTGCTTCTGAACACTTTAAACTTATTATATTGGTGATGGTGAATGCGTGACGA  
 AATTAATATGCTTATAAAAAAATTTGCAATTTATCTAATAGGGTGTCTTGTGGGAGTTAAAAAATAATTTGCTCC  
 CTATTTTTCTGCATGTGATATTTTTGTTCTCTCTTCTCGTTGGGAAGGATTTGGATTAGTCGTGGCAGAAGCTAT  
 GTCATGTGAGCGAATTTGTTGGCACGGATTCCAGGGGAGTAAGAGAAGTTATTGGTGACGATGATTTTTCTTGT  
 ACCCATATCTGATTTCAACACAACCTTGAAGCAAAATTTGAAAATTTGCTTTGAGCCAGATACGTGATCACATTTGG  
 TTTTCGGAATCGTGAGCGTATTTTAAAAAATTTCTCAATAGATACTATTATATGCAGTGGCAAGAACTCTATGG  
 AACTATAATTTGCTCAAACATGAAAGGTAGATTTATATTTGGAACGTGCTTTTTGTTTGAATTTAATTTCAATCT  
 CAATTTGAGATTTTTGTATTTCAAATAACCATCATAGCTAACGATGATTTGGTATTTATTTAAGATGCTTTCTAT  
 AAATATATTGACGTTTTTAATGCGCCGAAACGATTTGGGCTGGGAACAGAGAAGTAAACTGTTTTGAGAATGAAG  
 AGTTTTTGTAGATGTTTATGGATATTAATAAATTTGATCCAGTGAATTAATTTATAATAAATCAAGATTTAATGT  
 TAATAAATGATAATCTTTCTGACACTCATATTAATTTAGAGTGGTACGTTTGGTAAACGGTAAACTATTATATG  
 ACAGCTAGAACAACATAAAGTTTTGCACTTACAATTACTCCCACTCTTAAGTGGCGTTCAAAGGGTAAACATTAAC  
 GAAATTAGTGCGTTATATACTGATTTATGATTTATACACTAGTTTGGCTCAAAAAAAGGTCCACTAACAAAAGCATTG  
 CTGGAATATGATGTCGATTGTCATTGTTATCCCCGAACCTTACGAGAGAAAATACCCTAAAGAAATGATTTTTAAAGCA  
 TTGTTCAAGCTTTATAAGTTTATAAAAAAAGAAAAATTTGACATTTGTGCATACACATTTCTTCAAACAGGTATT  
 TTGGGGCGAGTTGCTGCCAAATTAGCACGTGTTGGAAAGGTGATCCACACTGTACATGGTTTTTTCTTTTCCAGCC  
 GCATCTAGTAAAAAAGTTATTACCTTTATTTTTTTCATGGAATGGATAGCAAAGTTCTTTACGGATAAGTTAATC  
 GTCTTGAATGTAGATGATGAATATATAGCAATAACAATTTAAATTTCAAGCGGGATAAAGTTTTTTTTAATTCCT  
 AATGGAGTAGACACTGATAAGTTTTCTCTTTAGAAAATAAAATTTATAGTAGCACCTTGAATCTAGTAATGGTT  
 GGTAGATTTCAAGCAAAAAGATCCTGAGACATTTATGCTTGTGTTGAAAAACTGCTGAATGAAAATGTTAAT  
 GTTAAAGCTGACACTTTTAGGAGATGGTGAACATAAAAGAACAGTTAGAAAAGCAGGTTCAAACGGCAAGATGGACGT  
 ATAATTTTTTATGGATGGTGCAGATAACATTTGTTAATTTTTAAAAGTTAATGATCTTTTTATATTACCTTCTCTT  
 TGGGAGGATGCCATTAGCAATTTTAGAAGCATTGAGCTGTGGACTTCCATGTATAGTCACTAATATTCCAGGT

AATAATAGCTTAATAGAAGATGGCTATAATGGTTGTTTGTGTTGAAATTAGAGATTGTCAGTTATTATCTCAAAAA  
 ATCATGTCAATGTTGGTAAAGCCAGAAGCTGATTGCACAGCAATCTACCAATGCACGATCATTTATCTGAAAAAT  
 TATGGATTAGTTAAAAGAAATAATAAGGTGACAGCTATATGATAATTAAGAGCTCGGTACCCGGGCTAGGGT  
 GTAGGCTGGAGCTGCTTGAAGTTCCCTAFACTTTCTAGAGAATAGGAACCTCGGAATAGGAACCTAAGGAGGATAT  
 TCATATCCGTCGACGGCGCCGCCCTGCAGGCATGCAAGCTTGATCCATATGGATCGCTAGCTTAATTAATAAAA  
 GCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTCCA  
 GGCCGCGAGCATTGACGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCCG  
 TATGGCAGTATGGGACGCAACCTTGCCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTCAACCGTTC  
 CCGTGAGAAGACGGAAGAAGTATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAACTGGTTCCTTACTATACGGTGAAAGAGTT  
 TGTGCAATCTCTGAAACCGCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGA  
 TTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATTTGATGGTGGTAACACCTTCTTCCAGGACACTATTCG  
 TCGTAATCGTGAGCTTTTACGAGAGGGCTTTAACTTCACTCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCT  
 GAAAGGTCCTTCTATTATGCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTTGGTAGCACCGATCCTGACCAAAATCGC  
 CGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTTGGTGGCGATGGCGCAGGTCACATGTGAAGATGGT  
 TCACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCT  
 CACCAACGAAGAAGCTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGAAATACGGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGT  
 CAAAGATATCTTCAACAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAA  
 AGGTACGGGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGCTGTGCTGATTACCGAGTCTGTGTT  
 TGCACGTTATATCTCTTCTGAAAGATCAGCGTGTGCCGCATCTAAAGTTCTCTGCTGGTCCGCAAGCACAGCC  
 AGCAGGCGACAAGGCTGAGTTTCATCGAAAAAGTTCTGCTGTCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCCA  
 GGGCTTCTCTCAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGAAGAGTACAACCTGGGATCTGAAGTACGGCGAAATCGCGAAGATTTT  
 CCGTGGCTGGCTGCATCCTCGTCGCAGTTCTTGCAGAAAAATCACCAGTGTCTATGCGGAAATCCACAGATCGC  
 TAACTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAATTTGCCGATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGTGCTGCTGCTTA  
 TGCAGTACAGAACGGTATTCGGTTCCGACCTTCTCCGACGCGGTTGCCATTACGACAGCTACCGTGTGCTGT  
 TCTGCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTACTATTTTGGTGGCATACTTATAAGCGTATTGATAAAGAAGG  
 TGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

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

ATGACGAATTTAAAGCAGTTATTCCGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGCGGATACCC  
 AAAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTAGTACATTTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAA  
 GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGGGTGCAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA  
 CTCCTTGGAGCAGCGCTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG  
 AACGTGCGTCAAGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCA  
 TTTGTGCTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGTGCTGCTG  
 ATTTGACAGTTTCAACGAAACCGGGCCGAGCCAGTGTGGCAAAACGTTATGCCGGGTGACCTCTGAATACCTCC  
 GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAAGCCGATTTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGAT  
 CAGCCGCGAGCGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTGCTGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAAGT  
 GAACGTAAGTCAAGCCTGGTGCATGGGGACGTATTGAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAACAATCC  
 GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTCGCGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG  
 TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCTGTAAGGTTATGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA  
 TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATATAACGGCAGTGAAAATTCGACGCAAAAGTAAATTTGTTGCGAA  
 TCTTCCGTGCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA  
 GGATTTTCTTGTTCAGAGCGGATTTGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA  
 ACGCTCGTACATCATAGGCATGCATGCAGTGTCTGGTAGCTGTAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC  
 CTCTATTAATCAAACCTGAGAGCCGCTTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGCTAGCAGT  
 GAAGATACTTGTACTGGTGGCGCAGGATTTATTTGGTCTGCTGTTGTTGCTCACATAATAAATAATACGCAAGA  
 TAGTGTGTTAATGTGATAAATTAACATACGCCGGAACCTGGAATCACTTGCAGATGTTTCTGATTTCTGAACG  
 CTATTTCTTTGAACATGCGGATATTTGTGATGCAGCTGCAATGGCACGGATTTTTGCTCAGCATCAGCCGGATGC  
 AGTGTGCACCTGGCAGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTCAATTACAGGCCCTGCCGATTTATTGAAACCAATAT  
 TGTGGGTACTTATGCTCTTTTGAAGCGGCTCGGAATTTATTTGGTCTGGTCTGGATGATGAAAAGAAAAAACTT  
 CCGTTTTTCATCATATTTCTACTGATGAGGTGATGGTACTTACCCCATCCGGATGAAGTAATAGCAATGAAC  
 GTTGGCCGATTTACGGAACGACAGCATACGCGCAAGTGTCCATATTTGCTTCTAAAGCTTCCAGCGATCA  
 TTTGGTTCCGCGCATGGAACGTAATTTATGGTTTACCGACCATTTGTGACTAATTGCTCGAACAACATATGGTCTTA  
 TCATTTCCCGAAAAGCTTATTTCACTGGTTATTCTTAATTTCACTGGAAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAA  
 AGGAGATCAGATCCGCGACTGGTTGTATGTAGAGGATCATGCTCGAGCGTTATATACCGTCTGTAACCGAAGGTAA  
 AGCGGGCGAACTTATAACATTTGGTGGACACAACGAAAAGAAAAACATCGACGTAGTGTTCATATTTGTGATTT  
 GTTGGATGAGATAGTCCGAAAAGAAAATCTTACCGGAGCAATTACTTATGTTACCGATCGTCCGGGACACGA

TCGCCGTTATGCGATTGATGCTGAGAAGATTGGTCGCGAATTGGGATGGAAACCACAGGAAACGTTTGAGAGTGG  
GATTTCGTAACCGGTGGAATGGTACCTGTCCAATACAAAATGGGTGATAATGTGAAAAGTGGTGCCTATCAATC  
GTGGATTGAACAGAACTATGAGGGCCGCCAGTAATGAATATCCTCCTTTTTGGCAAACAGGGCAGGTAGGTTGG  
GAACTACAGCTGCTCTGGCACCTCTGGTAATTTGATTGCTCTTGATGTTCACTCCACTGATTAAGTGGTGGT  
TTTAGTAATCCTGAAGGTGTAGCTGAAACCGTAAGAAGCATTGCGCCTGATATTTATGTCAACGCAGCCGCTCAC  
ACCGCAGTAGACAAAGCAGAATCAGAACCAGGTTTGCACAATTACTGAACGCGACGAGTGTGCAAGCGATCGCG  
AAAGCAGCCAATGAAGTCGCGCCTGGGTATTCACTACTCTACTGACTACGTATTTCCGGGGACCGGTGAAATA  
CCATGGCAGGAGGAGGATGCAACCGCACCCGCTAAATGTTTACGGTGAACCAAGTTAGCGGGAGAAAAAGCATT  
CAAGAGCATTGTGCGAAGCACCTTATTTTCCGGACCAGCTGGGTCTATGCAGGTAAGGAAATAACTTCGCCAAA  
ACAATGTTGCGTCTGGCAAAGAGCGTGAAGAATTAGCCGTATTAATGATCAGTTTGGTGGCCAACTGGCGCA  
GAGTTACTGGCTGATTGTACGGCACATGCTATTGCTGTGGCACTGAATAAACCGGAAGTCGCAGGCTTGTACCAT  
CTGGTAGCTAGTGGTACCACAACGTGGCAGGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGCGCGCAAAGCAGGCATT  
CCCTTGCACCTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAACAACAGCCTATCCTACACCAGCTCGTCTCCACATAACTCT  
CGCCTTAATACAGAAAAATTCAGCAGAACTTTGCGCTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTTGGCGTGAAACGAATG  
CTTAACGAATTTATTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTAATGGTAGCAAGATGATT  
AAAAGGAATGATGAAATGAAAACGCGTAAAGGTATTATTTTGGCGGGTGGTTCTGGTACTCGCTTTATCCTGTG  
ACGATGGCCGTGAGTAAACAGCTGTTACCAGATTATGATAAACCGATGATCTATTACCCGCTCTCTACACTGATG  
TTAGCGGGTATTCGCGATATTCTGATTATCAGTACACCACAGGATACTCCTCGTTTTCAACAACCTGCTGGGTGAC  
GGGAGCCAGTGGGGCCTGAATCTTCAAGTACAAAGTGCACCGAGTCCGGATGGTCTTGGCGAGGCGTTTTATTATC  
GGTGAAGAGTTTATTTGGTGGTGTGATTGTGCTTTGGTACTTGGTGATAATATCTTCTACGGCCACGACCTGCCG  
AAGTTAATGGACGTAGCTGTTAACAAAGAAAGTGGTGCACCGGATTTGCCTATCACGTTAATGATCCTGAACG  
TATGGTGTGCTGGAGTTTGATAATAACGGTACTGCAATTAGCCTGGAAGAAAAACCGCTGGAACCAAAAAGTAA  
TATGCGGTTACTGGGCTTTATTTCTATGACAATGACGTTTGGAAATGGCGAAAAACCTTAAGCCTTCTGCCCGA  
GGTGAACCTGGAATTAACCGATATTAACCGTATTTATATGGAACAAGGACGTTTGTCTGTGCTATGATGGGGCT  
GGCTATGCATGGCTGGATACAGGGACGCATCAAAGTCTTATTGAAGCAAGCAACTTCATTGCCACCATTGAAGAG  
CGCCAGGGACTAAAGGTTTCTGTCCGGAAGAAATGCTTATCGTAAAGGGTTTTATGATGCTGAGCAGGTAATA  
GTATTAGCCGAACCGTTGAAGAAAAATGCTTATGGTCAAGTATCTGCTCAAATGATTAAGGTTATTAATAAGAT  
GAACGTAATTAATAACTGAAATTCCTGATGTGCTGATTTTTGAACCAAAAAGTTTTTGGGGATGAACGTGGCTTCTT  
TTTTGAGAGTTTTAATCAGAGGATTTTTGAAGAAGCAGTAGGTCGTAAGGTTGAGTTTGTTCAGGATAACCATT  
TAAGTCCAGTAAAGGTGTTTTACGTGGTCTTCAATTATCAGTTAGAACCCTTATGCTCAAGGAAAACCTGGTGGC  
TGTTGTTGGCGAGGTTTTGATGTTGCGGTTGATATTCGTAATCGTACCTACATTTGGGAAATGGGTTGGGGT  
GAATTTGCTGCTGAGAATAAGCGTCAGTTGTGGATTCCTGAGGGATTTGCACATGGTTTTTGGTGTGCTGAGTGA  
TTTAGCAGAAGTTTTATATAAAAACGAATCAATATTATGCTCCATCACATGAAAAAATATATATGGAATGAC  
CTTGCTTAATATTAATGGCCGAGCACAGCACTGATCACTCTGTCTGATAAGGATGCAAAATGGGAAAGATTTGA  
ACTAAGTGAGTTTTGAAATGTCTCTCTTAAAACATAGTATATGGAATGTTGCGGGCTACTTTATACCAACATTA  
TTGCAATTCGCCCTTTGGATTAATTGCGAGGAAAAATGGTGTAGAACTATTTGGTTTTGTATACGTTAGCAATGA  
TTTTTATAGGGTATGCAAGTATATTTGATGCTGGTTAAACAAGAGCTGTTGTGCGTGAAATAGCATTACTAAAA  
ACAGAGTGGCAGGATGTAATACGATAATAGTAACTTATATCGCTGTGATATTTTAGGGTTTATCGGAGGCG  
GGGAGTGTCTGCTTAAAGCCGATATTATTGAACCTGTAATATCTCACCAATATATACGCCGATTGATGATA  
AGTCTCTAGTATTATATCATCTCTGATACCTGTATTTCTAGTCACGCAAATACTATTAGCAGAGCTTGAGGGTC  
GGGAATATTTTGGGATTCTAAATATACAAAAAGTGTAGGGAATTTCTTAATTGCAGGGTTACCTGCATTATTTG  
TTTTAATTAATCAAACGCTTTTTCTGCAATATTGGTGTAGCGATTGCAAGAGTTATATGCTTGTGGTTAAGCT  
ACATTATGAGCAGGAAAGAATAACTATCGATATCTCATTTTTTTCAATAACTGTTTTAAAGCGGTTATTTAGAT  
ATGGCGGGTGGTAACATAAGTAACATAATATCTCTATATTAGCGAGTATGGATAGATTTATTTGATCCCAT  
TCCAGGGAGCATCAAAAATATCATTCTATACAGTCCCTAATGAGCTGGTAACTAGGCTTGGAAATAGTTCCAGGCT  
CTCTTGGGAAAGCTGTTTTTCCAAAATTAAGTCATGCAAGGAATTTTACAGCGTCATATGCAGAGCAAAAAAAG  
CTTATATATTAATGACTGTCATTGTAATGCCTTTGGTTTTATTTGTATATATTACGCAAAGTTTATTTTAACAT  
TGTGGATGGGGCTGAGTATGCAGGGATTTCCGGTCGAAATATTACGGATTATGCTTATAGGGTATATTTTAACT  
GTTATTCACAAATCTCTTTTGCACATACAGGCCTTTGGAAAAGCAAAATACACTGCATACATCCATATGATGG  
AATTTATTCCTTATTTGATAATGTTATATATAATTTCAAAGGAATATGGGGTTATGGTGTGGCGGTTATGGGA  
CAATTCGAGTAATAATTGATTTTTTGGTGTGTTTTATATATGAGTTATCGTTGTAATAATCTTATGAAAAAGGGT  
AGCCTGATGATATATATTGGTATTAATTTGGAATGGGGCTATAGATACCATTAAATGTGTTAAAAGTTTTAATG  
GATTTAAATGTAGCGATTATAAAATATCATTGTTGATAACTGTTCTATGGATAACTCATATGATACTATAAAA  
GAAAATCTTAATTCATTATATATTGCTGATAAAAGTATCATTGAGGTGAAGTATGAGGATAGAAATAAATATAAA  
ACCTTAGAAAACGATAAAATCATATTAATACAATCTCCGCAAATAATGGGTACGCAAGTGGTAATAATATTTGGC  
ATAGAGTTTCGCTCTTAATCAGGAGAATATGAAATACGCTCTGGGTTCTGAATAATGATACTGAAGTGGATAAAGAG  
GCTTTAACTCATTTAATTAGTAAATGTGATTGAGATAAAAGTATAGGGATTTGCGGTTCTCGTTTTAGTCTATTTT  
GCCGACAGAGAGATGCAGCAAGGACTAGGTGGGGTGCATAACAAATGGTTATGCACTACAAAAAATATGAAATG  
GGAAGATTAGTTTCCAAAAATATGATGATGAAGTCATTAGTAATGATATAGATTATATAATTTGGCGCATCGATG  
TTTTTCTCTAGAGAATGTTTTGGAAACAGTTGGATTGATGAATGAAGAATATTTTTTATACTATGAAGAGTTAGAT

ATTTGCTCAGAGCAAAGCAAAGAACTTTAAATTAGGTATTTGCTCAGAAAGTTTGGTTTATCATAAAATAGGT  
 GCAAGTACTGATGGGGGAAAGAGCATGATGGCTGATCTTTGCTCAATAAAAAATAGGCTGGTCATTACAGAAAAGG  
 TTTTATCCCCAATATTTATGGACGGTATGGTTGTCACTTTTTGTTGTAGCATTAAACCGTGCTAGAAGAGGTGAG  
 TTTAATAAGATGAAAAGATGTTTGAATGTTATGTTTAACTTCAAACGAAACAAAGGTAGCAAATGCCATTAGAAT  
 ATGCCTTAATCATGGTGTAAATAAATCTATAGTTTGTATGTTATTAAGGGTATTTAATGAAAGTGGCTTTTT  
 TATCTGCTTATGATCCACTATCTACATCCAGTTGGTCTGGCACACCTTATTATATGCTAAAGGCATTATCGAAGA  
 GAAATATTTCCATTGAAATATTAGGACCGGTAATAGCTATATGATATACATGTTAAAAGTATATAAATTAATAT  
 TAAGGTGTTTCGAAAAGAATATGATTATAGTCATTCGAAGTTGCTTTCCAGGTATTACGGTAGAATATTCGGTA  
 GGAATTAAAAAAATGATGGTTTGGATTTTATTATCGCACCTGCAGGTTCTCCACAAATGCTTTTTTAAAAA  
 CAACCATACCAATAATATATCTATCGGATACAACATATGATCAATTA AAAAGCTATTATCCGAATTTAAATAAAA  
 AAACAATTATAAATGATGAGGATGCAAGTTTAAATCGAACGCAAGGCTATTGAAAAAGCAACAGTAGTATCTTTCC  
 CATCTAAATGGGCAATGGATTTTTGCAGGAATTATTACAGATTAGATTTTGATAAATTAGTTGAAATACCATGGG  
 GGGCTAATTTATTTGATGATATTCCTTTGCTAATAAAAAATATAATTCAAAGAATAGTTATACTTGTCTTTTCT  
 TGGGAGTTGATTGGGAAAGAAAAGGTGGGAAAACAGCCTTGAAAGCAATGAATATGTAAGGCAGTTATATGGGA  
 TCGATGTTAGACTAAAAATTTGTGGATGTACTCCGAATCAAAGATTTTACCTACTTGGGTTGAATTAATTGATA  
 AAGTAGATAAAAAAATACGTTGACGAATATCAGAAATTCATCGATGTGTTATCTAACGCTGATATACTTCTTTTAC  
 CAACCATGCTGAATGTTATGGAATGGTATTTTGTGAAGCTGCTGCTTTTGGATTGCCCTGTGTGCTACAGATA  
 CAGGTGGAGTCAGTTCTATAGTTATCAACGAAAGGACGGGATATTAATTAAGACCCGTTAGACTATAAGCACT  
 TTGGAAATGCAATTCATAAAATAATTAGTTCCGTAGAGACTTATCAAACACTACTCCCAAAACGCAAGAATTAGAT  
 ATAATAATATATTGCATTGGGACAATTGGGCTAAAAAGATAATTGAGATTATGATGAGCATAAGAATAGAAGAA  
 TCAAATAGCACAAAAAGAATTATATGTTTATTTATACTTTTTCTTGTTTTCCCTGATTTTTTGTTTTATACATTA  
 GGGGTTGATAATTTTAGCATTTCACAGATAATCTCAATTACATTGCTTTTTGTTTTTAAAGAGCTAAAAATATT  
 TGCAAAGATAATTTCTAATAATAGTAGCGTTATTCAATTTGTTGTGTTTTAACTGTTTGTGTTAAGTCTAATTT  
 AATATTGAACAGGCTTTAAACATTTAAAGTTGTACTTTCAATATATAGCATCTTAATAATGGCATACTCTCTCT  
 TGTATGACACAGACGTTGTGGTTATGTTCTGAAGAAACTTAAAGAGATCCGTCTTTTATTTGTTGCGCATTTCTT  
 TGCCTTATTGGCATTATAAGTATTTCTTTACAGAAGACTGAGATTATACATGATAAAAGTATGATTCTTTTTCTT  
 GAACCATCAGCATTGTCATTGGTTTTTATACCTATCTTTTCATTTTGTTTATACTATACAGAGGGGGGGGCTA  
 CTATTGCTCTATATATATCTTTGGGTATTGCGTTAGGTATCCAGAATTTAAACAATGTTGGTAGGCATTGTGATT  
 AGTGTTTTGTGATGAAAAAATAACTATAAGGCAAATATTGTTATACTTTTGGGGGCATGGATTTTTTCCATG  
 ATATTAGTGTATTAGACATTTCTTACTATACATCGCGCTTGATTTTTAAAAACTACGAACCTATCAGTGCCTT  
 GTATATCTTTTCCAGGATTTGAAAGAGCTTTCTTGAATTTTATACAAGTTATGGTCTTGGTTTTGTTTTCAACAA  
 ATGGGAGTGAATGGGAGATAGGAATATATCAACAAATTTTAGCTGAACCTGATGCCCTATGTTAAATATATAC  
 GATGGCTCATTTATTTCTTCTAAGTTAATATCTGAGTTTGGGTTATTGGTGCATTAATGTGATTTTTCTATTTT  
 TTTTATTTTTCCCGATTTTATCTGCGTTTCAAAAAAGTAAGAGATATTACCAGCAGTATATTTTAGCATATAGC  
 TTCTACATGTGTTTCTTCATCCCTCTTTTATACGTGGTGTGGTTATATAAACCCTATGTGTTTATGTTATTT  
 TCATCAATATTTTTGTGCAAATATCAGCTAAAAATATCTTGATGAAATCTAATGTCCAGATAGCTATATAATAG  
 TAGATTATATTATCATTTATCAGCTAAATTACATATTAAATAGCATATATGATAACTAGGACATAAATAATGTGCAT  
 TAAAAAAAACCTAAGTTAATTAACGATATGGCCTTTATGGTGGTCTTAGGCTTCTTAAAGATATATCTTAAAC  
 AAAATTTTTATTTTGTCAAATGTTAGGATTATTAGATTTCCATGTTATATTAGAAAAGATGGAAGTGTAGTTT  
 TGGAAAAGGTTTTACATCAGGTGTAGGATTACGAGTTGATGCATTTATGGATGCCGTAGTTTCCATTGGAGAAAA  
 TGTTCAAATTAATGACTATGTTTACATCGCGGCTATTAATAATGTCAATTATTGGTAGAGATACATTAATAGCAAG  
 TAAAGTATTTATTAGTGATCATAATCATGGTATTTTTTCTAAATCCGATATCCATAGTTCCACCACTATTATTC  
 TTCGTCTAGGCCCTTGAATCTGCACCTGTGTATATTGGAGAGCGTGTGTGGATTGGCGAAAATGTTGACAATATT  
 ACCAGGTGCGTGTATAGGTAATGGTGTAGTTATTGGCGCAACAGTGTGTTGTTGTTGTTGAGATTCTTAATAATGT  
 GATCATTTGCTGGTGTCCAGCTAAAATTTGTTAAAAAATATAACTATGAGCGTATGCAATGGGAAAGAATATAGTT  
 GTAATATCGGCTGTTAATTTTACAACCGAGGCCCCCTTACCCTACTAAAAATGTGCTTACAGCAACTAAAGAT  
 AGAGCCGAATGTAATTTATTGCACTGGTTCATAGCTCTGCTGAACCTAATGGAATTTTCCGTGGGTTGAATTT  
 ATAGAGTATCCAGAAGTCAAGTCTTCTGTTGGGTTAAAAGATTATATTTTCCGAATATATAACTTGAATAGATTATCT  
 AAGGTGATTAAAGCACTCATTGGGTATGCTTACATGATATTACAGCAAATGTTAGTGTACCCTATAGATTTGTT  
 TATTGCCACAATCTCAGCCGTTCTATAAATATTTAAGCTATCGAGATATTATAGGAGAACCTAAATTTTTATCTT  
 TTTTATCTTTTTTATGGGCTTTTTATACAATATCAATATAAAAAAGAACACAGCAGTTTTTGTTCAGCAGCAGTGG  
 CTAAAAAAGAATTCGAAAAAATATAAGTTAAAGAAATGTTGTTGTTAGTTCGCCCTGAAGATATTTGCCCTTTT  
 GAAAGTGTGTTTTGGTAAGAAATAATAATAAAAAGGATGTGAGGATATTTTACCCAGCAGTGCCCCGTATATTT  
 AAAAATTTGAAGTTATCATACGTGCTGCACAAATATTACAAGATAAAAAATATTCAATTTTTATCTTACTTTTGAT  
 GGTACTGAAAATAAGTATGCAAAAAGAATATATAAATTAGCTTCCGAACGAAAAATGTACATTTCTCGGTTAC  
 CTAAATGCAACCGAGATGGTTAACTTTTATCAAGATTACAGATATTATTGTTTCCCATCGAAACTAGAAACGTGG  
 GGATTACCATTATCAGAAGCTAAAACATACAAAAATGGATATTTGCGGCAGACTTACCTTATGCTCATGAAGTT  
 TTATATAACTATTCAAAAAGTATATTTTCCATTTGACGATGAGAAAATACTTGTTCGCTACATATTAGAGTAC  
 ACAAGTAAAAATATGCATGAAGATATAAAAAATAGTAGGGTGAATTTTAAATAATGATGCATTGACTGGTTTTGAA  
 CAGTTTATTGAATATATCTCAAGGGAACTGACGTGTTTATATTATAATCGTTTCACATGGCCATGATGACTA

TATAGAAAATCTTTTATTAATTTAAAGTTGCCCTCTGGAAGATTTAAAATAATAGTTTCGTGATAACAAAAGTTC  
AATGGTTTTAAAAAAAACATGCGAAAAAATTCGTAACCTATTTGCATGGAGGGCAATATGGATTTGGACATAA  
TAATAACATAGCAGTGTATATATAATTAATAACTTCATGATTATGAATAATGATTATTTCTCTTTCTTAACCC  
CGATGTATTCTAACCAGTGAAGTTTGATTAATTATGTTGATTATATAAATAGTAATGATTATAAGTTTAGCAC  
ATTATGCTTTTATCGAGATTTTACTAAAAGCAAACATGATTATTCAATACGGAGTTTTCCAACCTTATATGATTT  
TCTTTGTTCTTTTATTGGGGTGAATAAAAGTAAAAATAAGAAGGAAAATATACTTTCTGATACTGTAGTTGA  
TTGGTGTGCTGGCTCATTTATGCTTATTCATGCTTTAAGTTTCTTAAATGTGAATGGTTTTGATCAAAAATATTT  
TATGTATTGTGAAGATATTGACCTTTGTATGCGTTTTAAATTAAGTGGAGTAGATCTTTACTATACTCCCCATTT  
TGATGCTATTCAATTATGCGCAGCATGAAAATAGAAGATATTTACTAAAGCATTTTCGATGGCATATAAGGAGTAT  
TACGCGCTACATATTACGGAAACCAATTCCTTCTATAAAAACTATAGAAAAATTACATCCGAACTGGTAAAGTG  
ATTAAGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACCTCGGAATAGGAA  
CTAAGGAGGATATTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACT  
TTGTATACTTATTTGCGAACATTCAGGCCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATG  
TCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGTGGGACGCAACCTTGGCTCAACATCGAAAGCCGTGGT  
TATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAAGTGTATGCCGAAAATCCAGGCAAGAACTG  
GTTCTTACTATAACGGTGAAGAGTTTGTGCAATCTCTGGAACGCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCA  
GGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATTTGATGGTGGT  
AACACCTTCTTCCAGGACTATTCGTGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTAACTTCATCGGTACCGGT  
GTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAGAACCTATGAATTG  
GTAGCACCGATCCTGACCAAAATCGCCGCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTTGGTGCCGAT  
GGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTTTCAACAACGGTATTTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTTGCTGAAGCCTAI  
TCTCTGCTTAAAGTGGCCTGAACCTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGATAACGGTGAA  
CTGAGCAGTTACCTGATCGACATCACCAAAGATATCTTACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGAT  
GTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAAGTACCGGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCG  
CTGTCTGATTACCGAGTCTGTGTTGCACGTTATATCTTCTTCTGAAAAGATCAGCGTGTGGCCGATCTAAA  
GTTCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCCAGCCAGGCAACAGCTGAGTTTCATCGAAAAAGTTCTGCTGCGCTGTAT  
CTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGCTGCGTCTGAAGAGTACAACCTGGGATCTG  
AACTACGGCGAAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTTCTGCAGAAAATCACCGAT  
GCTTATGCCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAATTCGCCGATGACTACCAG  
CAGGCGCTGCGTGATGTGCTTGTATGCAGTACAGAACGGTATTCGGTTCCGACCTTCTCCGCGAGCGGTTGCC  
TATTACGACAGTACCCTGCTGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTGACTATTTTGGTGCGCAT  
ACTTATAAGCGTATTGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTA

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

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGGCATACCC  
AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAA  
GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA  
CTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCTGACCATTATG  
AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTTGGTGACAACCCA  
TTTGTGCTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGTGCCATG  
ATTTGCACGTTTTCAACGAACCGGGCCGAGCCAGGTGCTGGCAAAACGATGCGGGGTGACCTCTCTGAATACTCC  
GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAAGCCGATTTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGAT  
CAGCCGACAGCGTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGAACTG  
GAACGTACTCAGCTGGTGCATGGGACGTATTCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAACAATCC  
GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG  
TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA  
TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATATAACGGCAGTGAATAATTCGCAGCAAAAGTAAATTTGTTGCCGA  
TCTTCTGCGGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA  
GGATTTTTCTTTGTTTCCAGAGCGGATTTGGTAAGACAATTAGCGTTTTGAATTTTTCGGGTTTTAGCGCGAGTGGGTA  
ACGCTCGTCACATCATAGGCATGCATGCAGTGTCTGGTAGCTGTAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC  
CTCTATTAATCAAACCTGAGAGCCGCTATTTTACAGCATGCTCTGAAGTAAATATGGAATAAATTAAGCTAGCAGT  
GAAGATACTTGTACTGGTGGCGCAGGATTTATTGGTCTGCTGTTGTTGTCACATAATAAATAATACGCAAGA  
TAGTGTGTTAATGTGCATAAATTAACATACGCCGAAACCTGGAATCGCTCGCTGAAATTTCTGATTTCTGAACG  
TTATTCAATTTGAGCATGCAGATATCTGCGATGCCGAAGCGATGGCTCGTATTTTTCGCACAGCACCAGCCACAGC  
GGTGTGACCTGGCAGCAGAGCCAGCTTGACCGCTCAATAACTGGCCCTGCGGCAATTTATTGAAACCAATAT  
TGTGGGTACTTATGTTCTTTTAGAAGCGGCGCAATTTATTTGGTCTGGTGGATGATGAAAAGAAAAAACTTT  
CCGCTTTCATCATATTTTCTACTGATGAGGTGTATGGTACTTACCCCATCCGGATGAAGTAAATAGCAATGAAAC

GTTGCCGCTATTTACGGAAATGACAGCATACGCGCCAAGTAGTCCATATTCTGCTTCTAAAGCTTCCAGCGATCA  
 TTTGGTTCGCGCATGGAAACGTACTTATGGTTTACCGACCATTGTGACTAATGCTCGAACAACCTATGGTCCCTTA  
 TCATTTCCCGGAAAAGCTTATCCACTGGTTATTCTTAATGCACTGGAAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAA  
 AGGAGATCAGATCCGCGACTGGTTGTATGTAGAGGATCATGCTCGAGCGTTATATACCGTCGTAACCGAAGGTAA  
 AGCGGGCGAACTTATAACATTTGGTGGACACAACGAAAAGAAAACATCGACGTAGTGTTCACATTTGTGATTT  
 GTTGGATGAGATAGTCCCGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAAATTACCTATGTTGCTGATCGCCAGGGCATGA  
 TCGCCGTTATGCAATTGATGCCGATAAAAATTAGCCGCGAATTGGGCTGGAAACCACAGGAAACGTTTGAGAGCGG  
 GATTTCGTAACCTGTGGAATGGTATCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAATGTGAAAAGTGGTGCCTATCAATC  
 GTGGATTGAACAGAACTATGGGGGCCGCCACTAATGAATATCCTCCTTTTTGGCAAAACAGGGCAGGTTGGTTGG  
 GAACTACAGCGTCTGTCACCTCTGGGTAATTTGATTGCTCTTGATGTTCACTCCACTGATTACTGTGGTGTAT  
 TTTAGTAACCTGAAGGTGTGGCTGAAACCGTTAGAAGCATTGCGCCTGATATATTGTCAACGCGACCGCTCAC  
 AACGCAGTACAGAAAAGCAGAAATCAGAACCGGAGTTTGCACAATTACTGAACGCGACGAGTGTGGAAGCGATCGCG  
 AAAGCAGCCAAATGAAGTCGGCGCTTGGGTATTTCGCTACTCTACTGACTACGTATTTCCGGGACCGGTGAAATA  
 CCATGGCAGGAGGAGGATGCAACCGCACCGCTAAATGTTTACGGTGAACCCAAGTTAGCAGGAGAAAAAGCATT  
 CAAGAGCATTGTGCGAAGCACCTTATTTCCGGACCAGCTGGGTCTATGCAGGTAAAGGAAATAACTTCGCCAAA  
 ACGATGTTGGCTCTGGCAAAAGAGCGTGAAGAATTAGCCGTTATTAATGATCAGTTTGGTGCGCCAACTGGCGCA  
 GAGTTGCTGGCTGATTGTACGGCACATGCCATTGCTGTGGCACTGAATAAACCGGAAGTCGCAGGTTTGTACCAT  
 CTGGTAGCCAGTGGTACCACAACCTGGCACGATTATGCTGCGCTGGTTTTGAAAGAGGCGCGCAAGCAGGCATT  
 CCCCTTGCACTCAACAAGCTCAACGCACTACCAACACACTATCTTACACCAGCTCGTCGTCCACATAACTCT  
 CGCCTTAATACAGAAAAATTTACGACAGAACTTTGCGCTGTCTTGCCCTGACTGGCAGGTTGGTGTGAAACGCATG  
 CTCAACGAAATTTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTGATGGTGGAAACAGATGAATT  
 AAAAGGAATGATGGAATGAATACGCGTAAAGGTATTTTACGGGGTGGTCTGGTACACGCTCTTTATCCTGTG  
 ACTATGGCTGTGATTAACAGCTGTACCATTATGATAAACCGATGATCTATTACCCGCTCTTACACTGATG  
 TTGGCGGGTATTCGCGATATTTGATTATCAGCACGCCACAGGATACTCCTCGTTTTCAACAACCTGCTGGGTGAT  
 GGGAGCCAGTGGGGCTAAATCTTCACTACAAAGTGCAACCGAGTCCGGATGGTCTTGCGCAGGCATTATCATC  
 GGTGAAGAGTTTATCGGTGGTGTGATGATTGTGCTTTGGTACTTGGTGATAATATCTTCTACGGTCACGACCTGCCT  
 AAGTTAATGGATGCCGCTGTTAACAAGAAAGTGGTGAACCGGATTTGCCTATCAGCTTAATGATCCTGAACGC  
 TATGGTGTTCGTTGAGTTTGATAAAAACGGTACTGCAATCAGCCTGGAAGAAAACCGTTACAACCAAAAAGTAAT  
 TATGCGGTAAACGGGCTTTATTTCTATGATAACTACGTTGTGAAATGGCGAAAAATCTTAAGCCTTCTGCCCGC  
 GGTGAACCTGGAAATTACCGATATTAACCGTATCTATATGGAACAGGGGCATTATCTGTTGCCATGATGGGACGT  
 GGATATGCCTGGCTGGACACGGGACACATCAAAGTCTTATTGAAGCAAGCAACTTCATTGCCACCATTGAAGAG  
 CGCCAGGGCTTGAAAGTTTCCCTGCCCGAAGAAATGCTTACCCTAAAGGGTTTATTGATGCTGACGAGGTGAAA  
 GTATTAGCTAAACCGCTGAAAAAAATGCTTATGGTCAGTATCTGCTAAAAATGATTAAGGTTATTAATAAAAT  
 GAATGTTATTAACAGAAATCCAGATGTACTGATTTTTGAACCGAAAGTTTTGGTGTGAGCGTGGTTCTCT  
 TAAATCGTGTAAAGGTGTACTTAGAGGTTTACACTTTTACGCTTCCCTCCCTTGAGCAGGCAAAATAGTAAGGTG  
 TATAGTTGGCGAGGTATTTGATGTTGCAGTAGACATTAGACCTAATTCTGAAACATTTGGTTCATGGGTTGGAGT  
 AACTCTTTCGTGAGAAAATAAAGGCAGCTATGGATCCAGAAGGATTCGCCCATGGTTTTTTAACTTTAAGTGA  
 TATTGCAGAGTTTGTATAAAAATAACAATATTATCTTAAATCATGAAAGGGGAGTCATTTGGAACGATGA  
 GGAAATTAACATTTGCCCTGGCCCTCTCAATCAGAGAAGATTTCTGTACAGAAAGATATTAATTTACCATCATTTAG  
 ATTTGTTCAAATGTTTAGCAAGTAGTGTATCTTTACACTGCACATAGTCATCATTTTTTTATGCTTTAAGTAAAT  
 TATATTTGCATCTATAACACAAAGCGCAATAATATTTGCACCTGATGAAGGTTTGTGGTTATTTATCTTTCTAG  
 CGCTTTTTTATGACTAAAATAGTTGTGGTTTCTACAGCTCCAATATTCCCGACAAAATAATGGGTACAAAAGTTCT  
 GTATTAGGAAGAATTGATGAGTTATTAATGAGGATAATGAGGTCGTTTTGATTGAAATAAACCTTGAAAATGTT  
 ACGGAAAAGAAAAGATGAATTAATACCAACAAGATTTAATAATATTCAAAGATATGAAGTAAAAAAATATCTAGA  
 TCATTTATTGCCGAGTTACAAATATTTTATGATATCAGAACTCGGTATGAACAATTTATTTCTTCTGCTGACATT  
 AGAGATAACATAAAAAGATAATTGATTTAGAAAACCTTCTATATTATTGCTGAGTCTATATGGCGTTGCAA  
 GCATTGCCATTGAAATTAGTGCAGAAATACACTGTGTTATTATGATGTGGCAACTGATTTCTTTAAAGAAATG  
 TTTGTATCTCATAATGAGGTTGTACGAAAAATTTGTTTTTAAATGATTACCTAAAGTTGAAAATTAAGTAAAGAA  
 AATATTATCAAACGTTTGGAGTTGAGCAATTTATCTTTCTGACAGAAGAAGATAAATGTTGGTATAAAAACAAGA  
 TACAATATTGATGAGGGTTGTTGTTCCCTTAGCGAGCAATCATCTTTATGTAGAAAAGATTAAGAGACTATCAAT  
 TTCCAAACCCCTTCTGCTTATCCCGGTAGCATTGAATTTTACAAAATTTTACGGCTTAAATTTGGTTTATA  
 AAAAATATATATCCTGGATTAATAGGAAAATAAGAATAGTTGTAACAGGAAAGGCATCAGATAAAAAAATAAAG  
 ATGTTAACTGTGGAGAGGAAATACCTTTACGGGAGAGCTTGACTTTTCCACATATAATAAATAGCTCAACA  
 TGCTTGTGTGTTATTGCACCGATTACAACGGGCACTGGAATTAATAAAAAATATAGAAAGCTGTACAAAAAGGT  
 ATTCCTGTACTTACAACAAAATTTGCTTCAAAGGAATATGTTCCGATTTATGTTTTTATTGCGAGGAGGATACT  
 GACACAACTTTGTCAATTTAATTAACAGTTTTCTTGAACAGCATTAAAGAGTCCAAGAATGAATTTATTGCTTT  
 TTTGAGTCTTGCCTTTGGTTAATATTGGCTTTGGCCATAATAAAAAGTGGAGATTTAACGCATACTTAA  
 TGTTTTTTCTCGTGGTCTAATGGTATTAATATCAGGGCTGCGTATGAATGATAGTATTATATCGAATACAGGA  
 AAATGTATAATGAAGTGCCTATTTTATGTACTTTAGTCTCGCATCTATAAGAGATATACATGGGGAGGTAGGCT

ATCTATTCTTATCATCAATCTTTAAAACCTTTATGCTTGCCATTTCAATTATTTCTTTTTTTTATTGCTTTTTTAT  
 CACTCCTGCTTACATATTTTTTTCATTACAGAAAATAAGTTTAATACCGTACTATCGTTAGTTTTTTATTAAAGCC  
 ATGCTTTTTATAGTTAGAGATTTGATTCAAATTAGGGCAGGATTAGCTGTTAGCATATCATTATATTTCAATAATTA  
 AATTTAAAGGAAATAAAGTATAATACAGGAGTTTTATTTGCTTCTTTGATTCATTCTGGGGCGCTTATTATTG  
 CTCTTTGTTATCTTTTTTTTCAAAAAAAAATACATAACATTAATAATGATGTTGTTTTTATTTTTTGTCAATTA  
 TTTTTTCTTATTTGAATGGGCTTAATTTATCGATACAACCTCTTATCTCAATATAGTTTGCTTCCAACCTGCAATTT  
 CGAATTATGTTGGTTGGGAAGAATATGATTATCGGGTGAGTATATTTACTAATCCGGTTTTTTATTAAGGTGTTT  
 TTTAATTGTCTAATGCACAAATATGACTTTTCAGATATTAATAATGAGAAAATATAGTGTCTTATAACTTAT  
 ATGTTTTAGGTGATATAGCTATGGTTGCATTGAGTGGGATGGCTATTCTTTTCAGGCCGTCTTTTCATCTTTCTGA  
 CACTAGGTGAAAGCATTTTAATTTGTATATGCTCTGTTCTACAAAAGAAATACACCTCTGGCGTTTCTAATTTTTT  
 CTTTTTTAACAATTTGTGCAATTAGGATATGATCTATTATTCTAATGTGCATCTGAGCTTACTCTGATTATAT  
 TTGGGTGAATCTAAGTGAAAAATAATAAATAGGCATATTACTCTAATAATACAAAATCTTGGACCTGTGAATG  
 TAGTACGAGGATTTGATAAAGAAAAATAAAAAATATGCTTTTACTGTTTTTTGTTTAAACAATAGCGTAGATAAAA  
 ATATATATGATGAGTTATGCTGTTTAGGAGCCAAGGTTATATTAATACCAGATGGTACTTGGTTTCAGCAAAATTT  
 TATTTGTGAGAAAGTTTTTTAAAGGAACATCCACATAATATCTTACATTCACATGGGATCACGGCCGATATGTTTT  
 CTACTTTCTGAATGGCGTGAAAAATATCTACTATTCACAAATAGACTAGATGAGGATTATATCCCATTTTTGGCG  
 CGGTTAAAGGGAATGCTATATATTTATCTTCATCGTTTTTATATTACGAAGATTTAATCATATCGTTGCTTGCTCAG  
 CAGCGGTCCAATCAAACTGAAACAATCGAAAGTAAAACTAAAATAACCACCATCCAGAATGGGATTGATATAA  
 CTAGGTTTTAAGACACTTGAGTCTGATAAAAAAATATTTGAGGGAAAAACACGGATTTGATAGTGA AAAAGAA  
 TATTTATATATTTGTGGCTCGTTATCATTAAAGGAAAAATTTGCTTACCTCTTGGAAACACTTAGCCATCGAAAGAA  
 ATGATATATTTTTAATTTCTAGGTGATGGTGAACCTTTTTAGATATTTGTAAGGATAAATATTTCTAAAGATTTACGGT  
 ATATATTTATGGGAAAGTTGAATGCCCTCTTGAATATTTCAATTATCAGATATTTTTGTTTTCCGCTCTTTTAT  
 CGGAAGGGCTCCCTTGGCACTATTAGAAGCTGCCCTACTGGGTGCTATTATATGTTAGCGATATAGAGCCCC  
 ATAGAGAAATTCATCTCTATTAGGAGAGGAAAATATTTCTATGTTTTAAAAATTAAGGATGGATCATATAAATTATT  
 TGCAACCTAAAATAAAAAAGCTGACTATAACGCTCTTTCTGACGATAAACTTTACAATATATCCGATAAAAAAA  
 TGTCAAATCTTTATGACAAACTTTTTGTTTTCTTTATAGAGCAGAGGCACATAATAATGATTTATGTTTTCGGTA  
 ATTTCTCATGGTCATTTCAAACTCTTAAGGAATTAGGACAGTATCAAAATTAATAAATCACAGCAGAATTA  
 GTTATCATCAAAGATAATTTAGGAGAGAGCGAGCTTTTGGATTTTTGTTCAGGAAAAACAATAACTTATTTAAGG  
 TCTAAAGAGAAAAAGGATTTGGAGAGAATAATAATGAAGTTTTTTCTCTATATCTCCTTAATTTACTAAGGAA  
 GATTTTTTTGTGTTATGAATCCTGATATATATATTGAGTGTCTGATCTATTAGATGTCTGATGAGTGTGGT  
 TCAGCGAATGTTAATCTAGCAACGATAAATTTATACAGGGATTTTGATAAAAAACATATGATAACTCAGTAAGG  
 AAATTTCCCTCGGCAATGATTTTTTTTATGTCTTTTTATTTAAGAAAAATGACTGTGTAGTAAATAAGAACAAA  
 ATAACGAAACCAACATATGTTGATTGGGCTGCAGGTTCTTTCTAATATTTAATGCCTCTTTTTATTTCAAACTC  
 AACGGATTTCAACGAAAAGTATTTTTATGTATTGCGAAGATTTGATATATGTTGGCGAGCTAAAAACAATACTCAAT  
 ACTTCAGTTTTTATACTATCCATGCTATGCAGCAATTCATTTGGCACAATTTAACAATCGTAGGATTTTTTAGTAGA  
 CATTTTCATTTGGCATATAAAAAGTATTTATCTTTTTTTTATATATAAAAAATGGTATGCTGCGTTCTAGTAAGTTG  
 CTTAATGCTAATATTTCTTTTAAAGAGGTGAGAATGATACCTGTTATTTTTGGCTGGTGGTTCCGGGAGTCGCTTGT  
 GGCCACTTTTCAGGAGAAAAGTTCCCAAGCAGTTTTTAAAGTTGACTGGCAGTTTGACAATGTTGCAGTCAACAT  
 TGTACGCTTTAATAATTTAATGCTGATGATTCAATAGTTATATGCAACGAAGAGCATAGATTTATTTGTTGCAG  
 AACAAATAGAGAGTTAGGCAAACTTTCAAATAACATTTATTTGAAACCAAGGTGTAATAACAGCCCCTGCTA  
 TAACTCTGCAGATTAGCAGCAAAAAGAAAATTCGCTGATGAAGATCCATTGATTTCTTATTTTAGCTGCAGATC  
 ACAACATCCAAGACGAACATGTTTTCTGTGAGGCAATTAATAAGGCGTCATCTTTAGCTAGTTTATGGAAAACCTAG  
 TGACTTTTGGTATCGTTCCATTCAAACCTGAAACTGGGTATGGCTATATTCGTTCGCGGTGATGAAGTGCCTGTAG  
 ATGAGCAGCATGCGGTGGCCTTTGAAGTGGCGCAGTTTGTGAAAAACCGAATCTGGAAACCGCGCAGGCCTATG  
 TGGCAAGCGGCAATATTACTGGAACAGCGGTATGTTCTGTTCCGTGCCGGACGCTATCTCGAAGAACTGAAAA  
 AGTATCGTCCGGATATTCTCGATGCCTGTGAAAAAGCGATGAGCGCCGTGATCCGGATCTCGATTTTTATTTCGTG  
 TGGATGAAGAGGCGTTTCTCGCTTGTCCGGAAGAGTCCGGTGGATTACGCGGTCATGGAATGCACGGCAGATGCCG  
 TTGTGTTGCCGATGGATGCGGGCTGGAGCGATGTCGGTTCTTCTTATTGAGGATCAGCGCCACACCCG  
 CCGAGGGCAACGTTTTGCCACGGCGATGTGATTAATCACAAAACCTGAAAACAGCTATGTTACGCGCAATCTGGCC  
 TGGTACCACCGTCCGGGTGAAAGATTTGGTGGTAGTGACAGACCAAGATGCAGTGTGATTTGCCGACCGTAATG  
 CGGTGCAGGATGTGAAGAAAGTGGTGCAGCAGATCAAAGCTGATGGTCCGCATGAGCATCGGGTGCATCGCGAAG  
 TGTATCGTCCGTGGGGCAAATATGACTCTATCGACGCGGGCGACCGCTACCAGGTGAAACGCATCACCGTGAAAC  
 CGGGCGAAGGTTTGTCCGTACAGATGCATTATCATCGCGCGGAACACTGGGTGGTTGTTCGCGGGGACCGGCAAAAG  
 TCACTATCAACGGTGATATCAAACCTGCTTGGTGAACCGAGTCCATTTATATTTCCGCTGGGGCGGATGCACTGCC  
 TGGAAAACCCGGGAAAATAGATTTAGAATTAATTTGAAGTTCCGCTCTGGTGCATATCTTGAAGAAGATGATGTTA  
 TTAGATGTTTATGATCGCTATGGACGAAAGTAATATATAATAATATTTTTCAGAAATAGAAAATGATAATTAAGTT  
 TTTCTGTTGATAAAACAATAGATAGTATGGGTTGGAAAATATGAGTTCCTTTAACTTGTTTTTAAAGCTTACGACATT  
 CGCGGGAAATTAGGTGAAGAAGTGAATGAAGATATCGCCTGGCGCATTTGGTTCGCGCTATGGCGAATTTCTCAA  
 CCGAAAACCATTTGTTAGGCGGTGATGTCCGTCTCACCAGCGAAACCTTAAAACCTGGCGCTGGCAAAAGGTTTTA  
 CAGGATGCGGGCTCGATGTGCTGGATATTGGCATGTCCGGCACGAAGAGATTTATTTCCGCCGTTCCATCTC

GGCGTGGATGGCGGCATTGAAGTTACCGCCAGCCATAATCCGATGGATTACAACGGCATGAAGCTGGTGCGCGAA  
GGGGCTCGCCCCGATCAGCGGTGATACCGGACTGCGCGACGTCCAGCGTCTGGCAGAAGCTAACGACTTTCCTCCC  
GTTCGATGAAACCAAACCGCGGTGCGTATCAGCAAATCAATCTGCGTGACGCTTACGTTGATCACCTGTTCCGGTTAT  
ATCAATGTCAAAAACCTTACGCCGCTCAAGCTGGTGAATCAACTCCGGGAATGGCGCAGCGGGTCCGGTGGTGGAC  
GCTATCGAAGCCCTTTAAAGCCCTCGGCGCACCGTGGAGTTAATCAAAGTGCATAACACGCCGGACGGCAAT  
TCCCCAACGGTATTCCTAACCCGTTGCTGCCGGAATGTCGCGACGACACCCGCAATGCGGTCATCAAACACGGC  
GCGGATATGGGCATTGCCCTTGATGGCGATTTTGACCGCTGTTTCTGTTTGACGAAAAAGGCGAGTTTATTGAG  
GGTACTACATTGTCGGCCTGCTGGCAGAAGCGTTCCTCGAAAAAATCCCGGCGCGAAGATCATCCACGATCCA  
CGTCTCTCCTGGAACACCATTGATGTGGTGACGGCCGCGGGCGGCACGCGGTGATGTGCGAAAAACAGGACACGCC  
TTTATTAAGAACGTATGCGCAAGGAAGACGCCATCTACGGTGGCGAAATGAGCGCTCACCATTACTTCCGCGAT  
TTCGCTTACTGTGACAGCGGCATGATCCCGTGGCTGCTGGTCCGCGAAGTGGTGTGCCTGAAAGGAAAAACGCTG  
GGCGAAGTGGTGCAGCCGGATGGCGCGGTTTCCGGCAAGCGGTGAGATCAACAGAAAACTGGCGCACCCCTGTT  
GAGGCGATTAACCGCGTGAACAGCATTTTAGCCGTGAGGTGCTGGCGGTGGATCGCACCGATGGCATCAGCATG  
ACCTTTGCCGACTGGCGCTTTAACCTGCGCTCTTCCAACACCGAACCAGTGGTGGCCTGAATGTGGAATCTCGC  
GGTGTATGTTGAGTTATGGTAATCCATACTCAAGAAATATTATCAATTTTGACGTGATAAAGAAATAAGCCCTGAC  
AAGTTAGGGCTTAATTAATATATATTTTTTTTTGAAATGGGGATTTGTGGTAAGATTTTTAATATGTTATTTAATG  
TGTTGAATTAATGTTGACTGGAAAAATAAATGAGAACGAAAAAGCATTACACAACCTTAAAAGTTGATTTATT  
AATTACTTTTTTATGGTTTTGCTAGGGTTTTATATCTGAACTGTTTTGTTTTCAAAAATGGGAAGTATATTAC  
TGGAGTGATGTTACTATTACACAGTTGACAGCATATCTCAATTTGGCAGAATTAGGTATTGGAATTGACGCTGC  
CAGCGTATTATATAAACCGCTCAGCGAGAATGAATACAATAAAAATACTTACATAATATCTTTGCTCTCAGTCAT  
ATACAATATATATTTGTGTTTGTGTTTATTCTTGGCGTTGTTATAGGTATCTGTATTTATTACTTTATTGATTC  
TGTAAGGTTGTAATGGCGTTTTTTTTATATTGGGCTTTGTTTCGTTTTTAATACATCGTTGACATATAGTTATGC  
TAAATACTCCACATTATTAACCTGCTAATCAGCGGTACTCAGCAGTAAGAAAAATCAAGGTGGCGGAAAAGTTAT  
AATAATTGTATTTAGATATTAATTTGTGCTTTACGCAAAGTTTCATACTTTATTTGTTAGTTGAGACTTTAGG  
TATTTTTTCTCAATATTTGATTTTTAAAAAATAAATGGGAACGGAAATCAATATCTCAGTAATGAGGTTTTACT  
TATTTGAAAGCGATAAACTTTTGATAAAAAAAGAATTTAAAAATAAGAATAAAAAATATGTTCTTCCATAAAAATAGG  
TGCTGTGCTTGTCTTAATACAGACTACCTGCTTGTATCAAAGTTTCTGACATTAAGTTATGTGACAATTTTTGG  
CAGCTATATGATGGTATTTAGATAGTAAGTGTGTTTGTATGTCAGTTTTGTTAATGCTATTACTGCAGGAATGGG  
TAATTACTTAATTAATAAAAGTAATTTAGAAATTAAGGAAATACACGTCAATTTTATGTGATATTTATCGCCTT  
TGCAACATTCATATCACTAAATATGTTTTTCTTGTAAATGATTTTTATCGCAAAATGGATAGGTGTTAATTATAC  
ATTAAGTAACACCCTAGTTGCATTAATGATTGTTAACGTATTATTAGTGTGTGTCAGGGTACCTTCTGATATAT  
AAAAACGCAAGTGGACATTTTGGTGATATTTATTATCCATTATTAGAAGGTGTGCTGAATATTAGCATCCAT  
CATTTTGGCTATCATATTTGGATTACCTGGCATTATTTATAGGGACAATAGTATCTAACCTTAATAGTAATAATGCT  
TGCGAAACCATTATATCTTACTCTAAGTTATTTAATCTTAGAAATCCGACGAGGGTTTTATTTGAATTTATTTTC  
TCGGCCTATGTTATATTCATTATGTGTGATTGGGGTGAGCTATTTATGCGCGATGAAATATATTCATTTAAAGT  
AAGTACATGGTTGGATTTTATTAACAGCTACTCTTAGTCTCTACTCCTAGCATATTGGTAATATGTGCTATTTT  
CTCTACGGATAGTGACTTTAGATTAATTTTTAGAAAAATTTATATATGTGATTTATGAAGAAATAAAAAATTCGAAA  
ATGTATTAATCGAAATATGCAACGAGCTTTATTTTTATAAATGATATGTGATCTTTTCGCGAATAGGAGTAAGG  
ATCCGTGTAGCTGGAGCTGCTTCGAAAGTTCCTATATCTTAGAGAATAGGAACCTCGGAATAGGAATACGAA  
GGATATTATGATGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT  
CTTATTTGCGAACATTCAGGCGCGGAGCATTACGCGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGC  
AACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTATGGGACGCAACCTTGGCGCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCG  
TCTCTATTTTCAACCGTTCCTGAGAGACGGAAGAAGTATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAACTGGTTCCCTT  
ACTATACGGTGAAGAGTTTGTGCAATCTCTGGAACGCCCTCGTCCGATCCTGTTAATGGTGAAGCAGGTGCAG  
GCACGGATGCTGCTATTGATCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATTGATGGTGGTAACACCT  
TCTTCCAGGACACTATTCTGTCGTAATCGTGAGCTTTTCCAGCAGAGGGCTTTAACTTCATCGGTACCGGTGTTTCTG  
GCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCGAAAAGAAGCCTATGAATGGTAGCAC  
CGATCCTGACCAAAATCGCCGCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTTGGTGGCGATGGCGCAG  
GTCATATGTGAAGATGGTTACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTCTCTGC  
TTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCAGTGGAAATAACGGTGAACCTGAGCA  
GTTACCTGATCGACATCACCAAGATATCTTCAAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTGTGATGTGATCC  
TGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACCGGTAATGGACCGCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGTGTCCG  
TGATTACCGAGTCTGTGTTTGCACGTTATATCTTCTCTGAAAAGATCAGCGTGTTGCCGCATCTAAAAGTTCTCT  
CTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTGCTGCTGCGCTGTATCTGGGCA  
AAATCGTTTTCTTACGCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGTGCGTCTGAAGAGTACAACCTGGGATCTGAACTACG  
GCGAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCTTGCAGAAAATCACCGATGCTTATG  
CCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTAATCAAGCAATTTGCCGATGACTACCAGCAGGGCG  
TGCGTGATGTGCTTGTATGACGATACAGAACGGTATTCGGGTTCCGACCTTCTCCGCGAGCGGTTGCCATTTACG  
ACAGCTACCGTGTGCTGTTCTGCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTACTATTTGGTGGCATACTTATA  
AGCGTATTGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения биоконъюгата полисахаридного антигена O<sub>x</sub> E. coli, ковалентно связанного с белком-носителем, включающий:

(1) получение рекомбинантной прокариотической клетки-хозяина, содержащей:

а) нуклеотидную последовательность кластера генов *gfb* для полисахарида O<sub>x</sub>-антигена;

б) нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий по меньшей мере один сайт гликозилирования, содержащий консенсусную последовательность гликозилирования Asn-X-Ser(Thr), где X представляет собой любую аминокислоту, кроме Pro (SEQ ID NO: 1), и

в) нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу PglB<sub>y</sub>; и

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

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O1A, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотную мутацию N311V или аминокислотные мутации Y77H и N311V, а рекомбинантная клетка-хозяин дополнительно содержит последовательность, кодирующую гликозилтрансферазу GtrS, последовательность которой по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 4, и которая способна модифицировать полисахаридный антиген O4 E. coli путем добавления глюкозы с получением гликозилированного полисахаридного антигена O4 E. coli, и нуклеотидные последовательности, кодирующие транслоказу GtrA и гликозилтрансферазу GtrB, последовательность которых по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 7 и 8 соответственно, где транслоказа способна транслоцировать связанную с бактопренолом глюкозу, а гликозилтрансфераза способна гликозилировать бактопренол;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O6A, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O8, PglB<sub>y</sub> не содержит аминокислотные мутации в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O15, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O16, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации Y77H, S80R, Q287P, K289R и N311V;

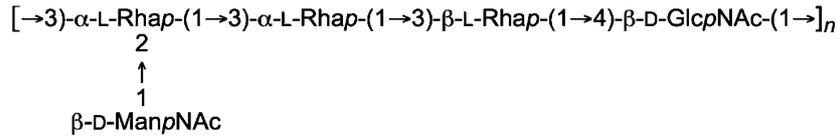
когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O18A, PglB<sub>y</sub> не содержит аминокислотные мутации в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669; и

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O75, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотную мутацию N311V,

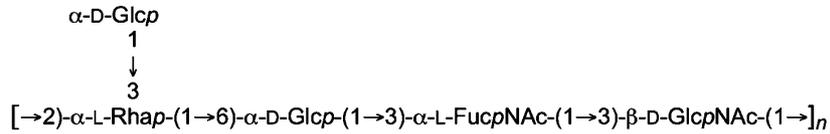
где в каждом случае аминокислотные мутации относятся к PglB<sub>y</sub> дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и

где полисахаридные антигены O1A, гликозилированный O4, O6A, O8, O15, O16, O18A и O75 имеют структуры формул:

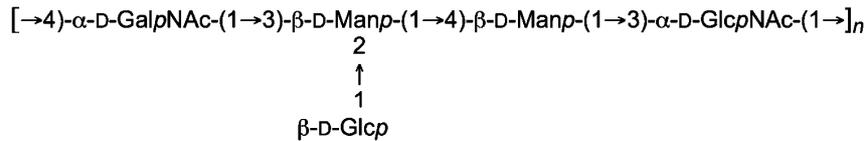
(O1A):



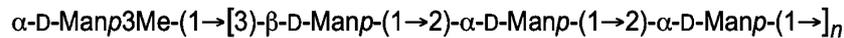
(O4-Glc+):



(O6A):



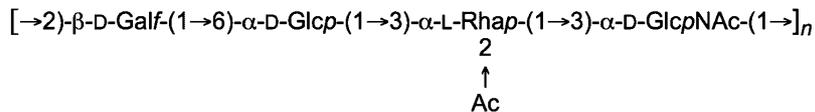
(O8):



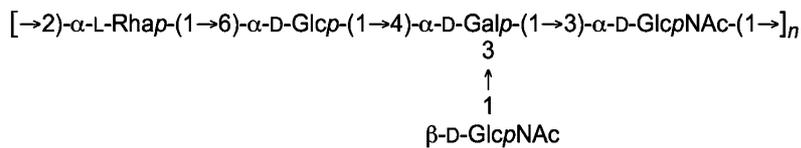
(O15):



(O16):

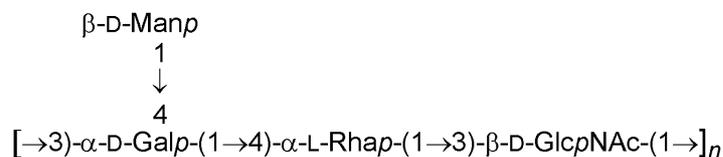


(O18A):



, и

(O75):



соответственно, и каждый  $n$  независимо представляет собой целое число от 1 до 100.

2. Способ по п.1, где консенсусная последовательность гликозилирования представляет собой Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой аминокислоты, кроме Pro (SEQ ID NO: 2).

3. Способ по п.1 или 2, где каждый  $n$  независимо представляет собой целое число от 3 до 50, предпочтительно от 7 до 25.

4. Способ по любому из пп.1-3, где антиген  $O_x$  представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, а PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотную мутацию N311V или аминокислотные мутации Y77H и N311V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

5. Способ по п.4, где рекомбинантная прокариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит последовательность, кодирующую GtrS, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и нуклеотидные последовательности, кодирующие GtrA и GtrB, имеющие аминокислотные последова-



7. Способ по п.6, где консенсусная последовательность гликозилирования представляет собой Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой аминокислоты, кроме Pro (SEQ ID NO: 2).

8. Способ по п.6 или 7, где каждый n независимо представляет собой целое число от 3 до 50, предпочтительно от 7 до 25.

9. Способ по любому из пп.1-8, дополнительно включающий выделение биоконъюгата из рекомбинантной прокариотической клетки-хозяина.

10. Способ по любому из пп.1-9, где белок-носитель выбран из группы, состоящей из обезвреженного экзотоксина *A. P. aeruginosa* (EPA), флагеллина *E. coli* (FliC), CRM197, мальтозосвязывающего белка (MBP), дифтерийного анатоксина, столбнячного анатоксина, обезвреженного гемолизина *A. S. aureus*, агглютинирующего фактора А, агглютинирующего фактора В, термолабильного энтеротоксина *E. coli*, обезвреженных вариантов термолабильного 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* (OMPC) и белка D из нетипируемого *Haemophilus influenzae*.

11. Способ по п.10, где белок-носитель представляет собой EPA, предпочтительно где белок-носитель EPA содержит 1-10 сайтов гликозилирования, предпочтительно где белок-носитель EPA содержит SEQ ID NO: 3.

12. Способ по любому из пп.1-11, где рекомбинантная прокариотическая клетка-хозяин представляет собой клетку *E. coli*.

13. Способ по п.12, где клетка *E. coli* представляет собой штамм *E. coli* W3110.

14. Рекомбинантная прокариотическая клетка-хозяин для получения биоконъюгата полисахаридного антигена O<sub>x</sub> *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, которая содержит:

а) нуклеотидную последовательность кластера генов gfb для полисахарида O<sub>x</sub>-антигена;

б) нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий по меньшей мере один сайт гликозилирования, содержащий консенсусную последовательность гликозилирования Asn-X-Ser(Thr), где X может представлять собой любую аминокислоту, кроме Pro (SEQ ID NO: 1), и

в) нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу PglB<sub>y</sub>,

где когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O1A, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V;

когда O<sub>x</sub>-антиген представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотную мутацию N311V или аминокислотные мутации Y77H и N311V, а рекомбинантная клетка-хозяин дополнительно содержит последовательность, кодирующую гликозилтрансферазу GtrS, последовательность которой по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 4, и которая способна модифицировать полисахаридный антиген O4 *E. coli* путем добавления глюкозы для получения гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, и нуклеотидную последовательность, кодирующую транслоказу GtrA и гликозилтрансферазу GtrB, последовательность которых по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 7 и 8 соответственно, где транслоказа способна транслоцировать связанную с бактопренолом глюкозу, а гликозилтрансфераза способна гликозилировать бактопренол;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O6A, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O8, PglB<sub>y</sub> не содержит аминокислотные мутации в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O15, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V;

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O16, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотные мутации Y77H, S80R, Q287P, K289R и N311V;

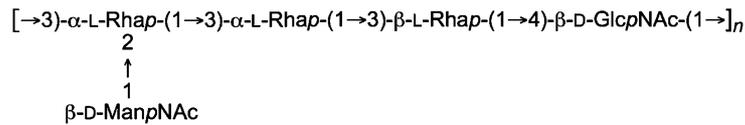
когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O18A, PglB<sub>y</sub> не содержит аминокислотные мутации в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669; и

когда антиген O<sub>x</sub> представляет собой полисахаридный антиген O75, PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотную мутацию N311V,

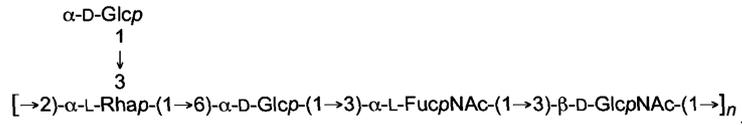
где в каждом случае аминокислотные мутации относятся к PglB<sub>y</sub> дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и

где полисахаридные антигены O1A, гликозилированный O4, O6A, O8, O15, O16, O18A и O75 имеют структуры формул:

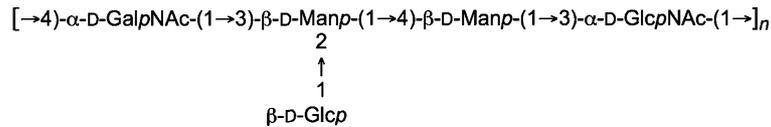
(O1A):



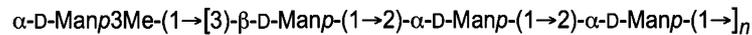
(O4-Glc+):



(O6A):



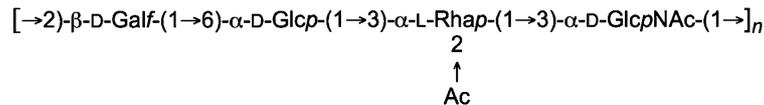
(O8):



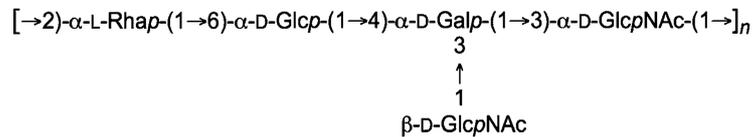
(O15):



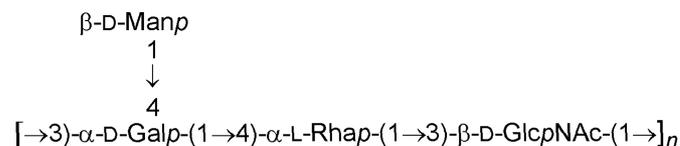
(O16):



(O18A)



(O75):



соответственно, и каждый n независимо представляет собой целое число от 1 до 100.

15. Рекombинантная прокариотическая клетка-хозяин по п.14, где консенсусная последовательность гликозилирования представляет собой Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой аминокислоты, кроме Pro (SEQ ID NO: 2).

16. Рекombинантная прокариотическая клетка-хозяин по п.14 или 15, где каждый n независимо представляет собой целое число от 3 до 50, предпочтительно от 7 до 25.

17. Рекombинантная прокариотическая клетка-хозяин по любому из пп.14-16, где антиген O<sub>x</sub> представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, а PglB<sub>y</sub> содержит аминокислотную мутацию N311V или аминокислотные мутации Y77H и N311V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

18. Рекombинантная прокариотическая клетка-хозяин по п.17, где рекombинантная клетка-хозяин дополнительно содержит последовательность, кодирующую GtrS, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и нуклеотидные последовательности, кодирующие GtrA и GtrB, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7 и 8, соответственно.

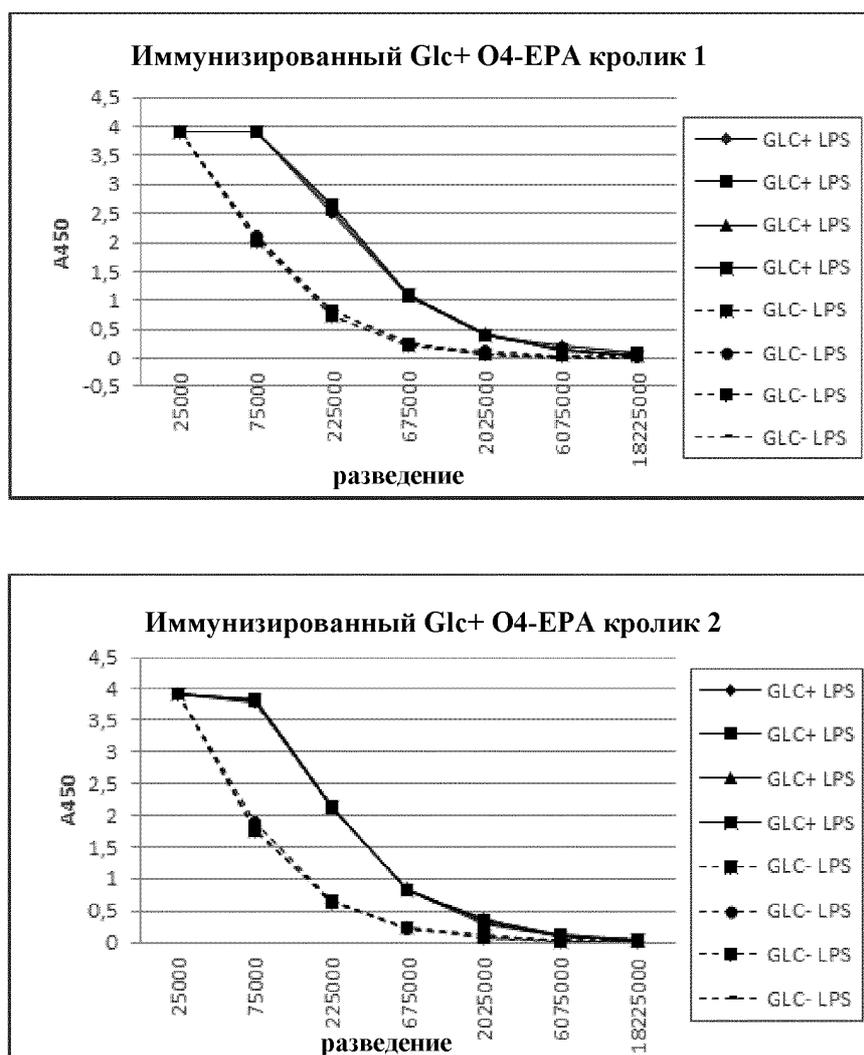
19. Рекombинантная прокариотическая клетка-хозяин по любому из пп.14-18, где белок-носитель выбран из группы, состоящей из обезвреженного экзотоксина A P. aeruginosa (EPA), флагеллина E. coli (Flc), CRM197, мальтозосвязывающего белка (MBP), дифтерийного анатоксина, столбнячного анаток-

сина, 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*.

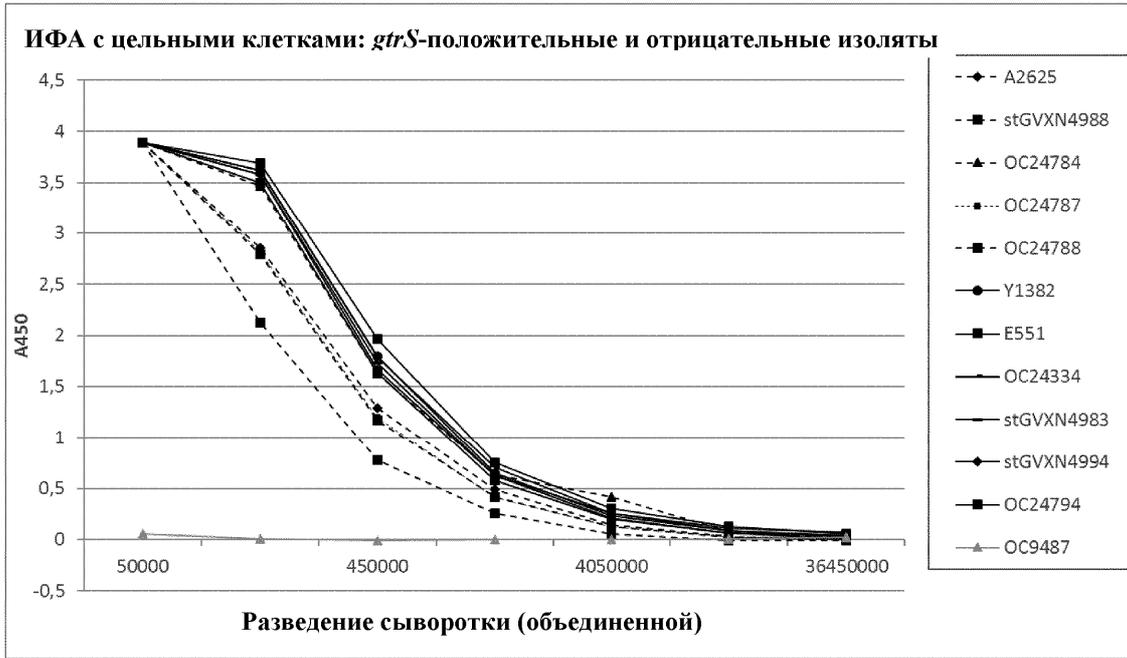
20. Рекombинантная прокариотическая клетка-хозяин по п.19, где белок-носитель представляет собой ЕРА, предпочтительно где белок-носитель ЕРА содержит 1-10 сайтов гликозилирования, предпочтительно где белок-носитель ЕРА содержит SEQ ID NO: 3.

21. Рекombинантная прокариотическая клетка-хозяин по любому из пп.14-20, которая представляет собой клетку *E. coli*.

22. Рекombинантная прокариотическая клетка-хозяин по п.21, где клетка *E. coli* представляет собой штамм *E. coli* W3110.

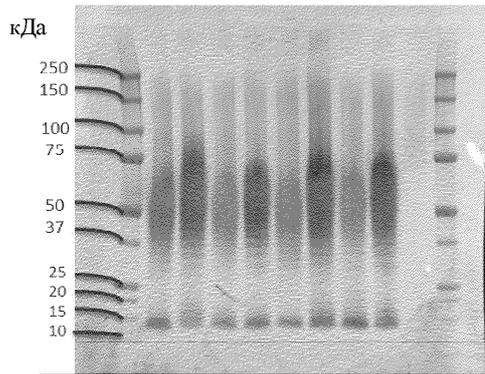


Фиг. 1



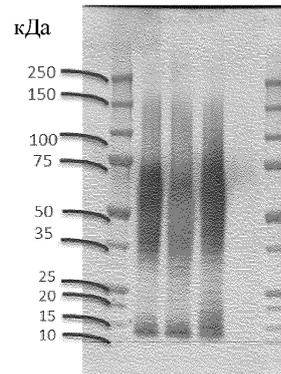
Фиг. 2

**Гель 1**



дорожка	название образца	<i>gtrS</i>	загруженное кол-во (мкл)
1	маркер	НД	5.0
2	A2625	отриц.	4.0
3	Y1382	положит.	3.8
4	stGVXN4988	отриц.	4.2
5	E551	положит.	3.9
6	OC24784	отриц.	4.5
7	OC24334	положит.	4.1
8	OC24787	отриц.	4.2
9	stGVXN4983	положит.	3.9
10	OC9487 отриц. контр.	НД	4.1
11	маркер	НД	5.0
12	пусто	-	-

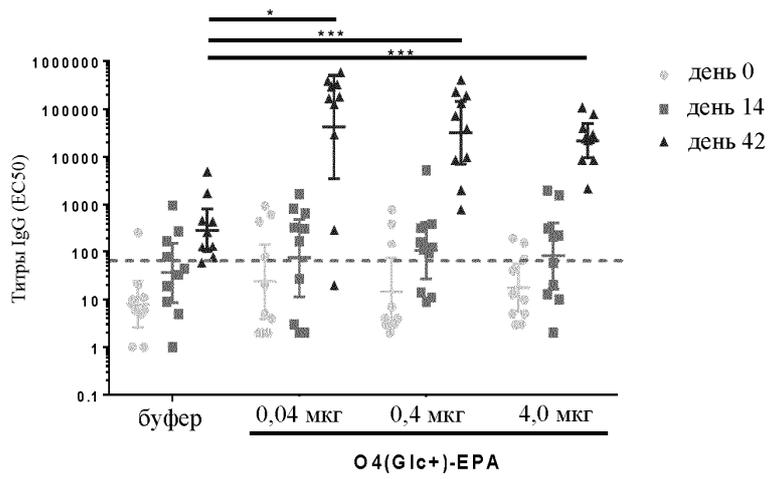
**Гель 2**



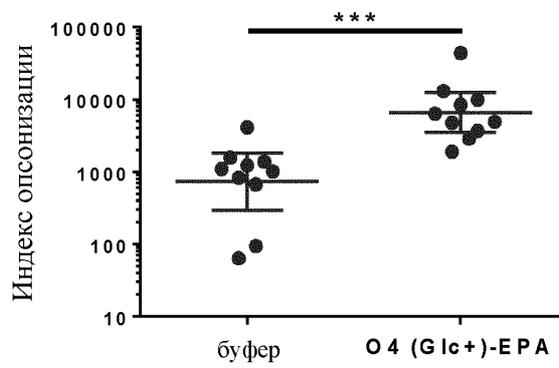
дорожка	название образца	<i>gtrS</i>	загруженное кол-во (мкл)
1	маркер	НД	5.0
2	stGVXN4994	положит.	4.0
3	OC24788	отрицат.	4.2
4	OC24794	положит.	3.9
5	OC9487 отриц. контр.	отрицат.	4.1
6	маркер	НД	5.0

Фиг. 3

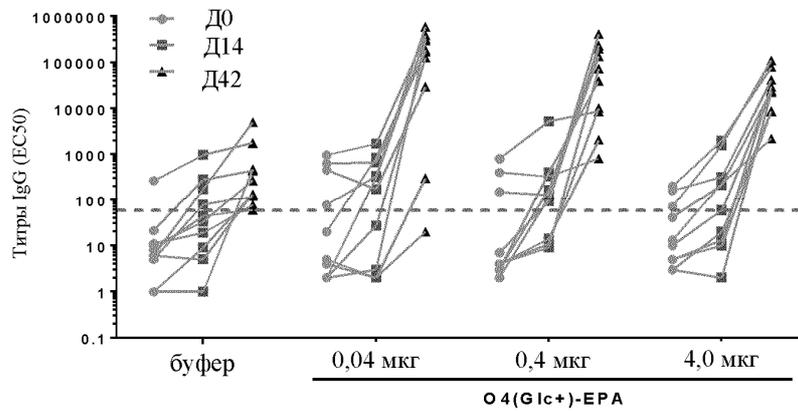
046636



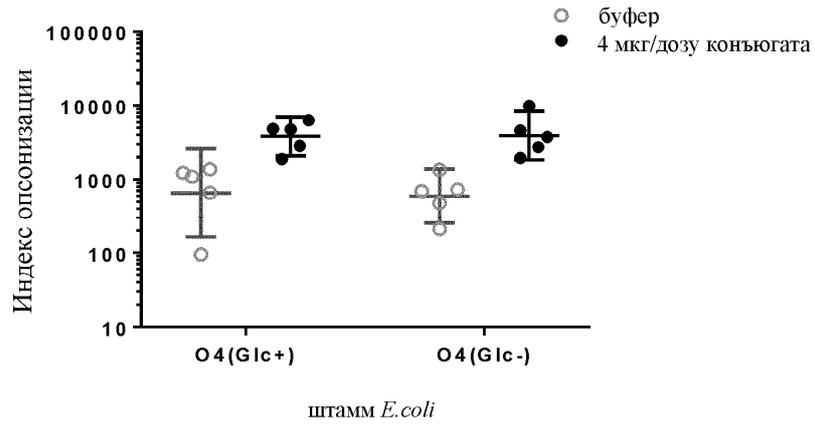
Фиг. 4А



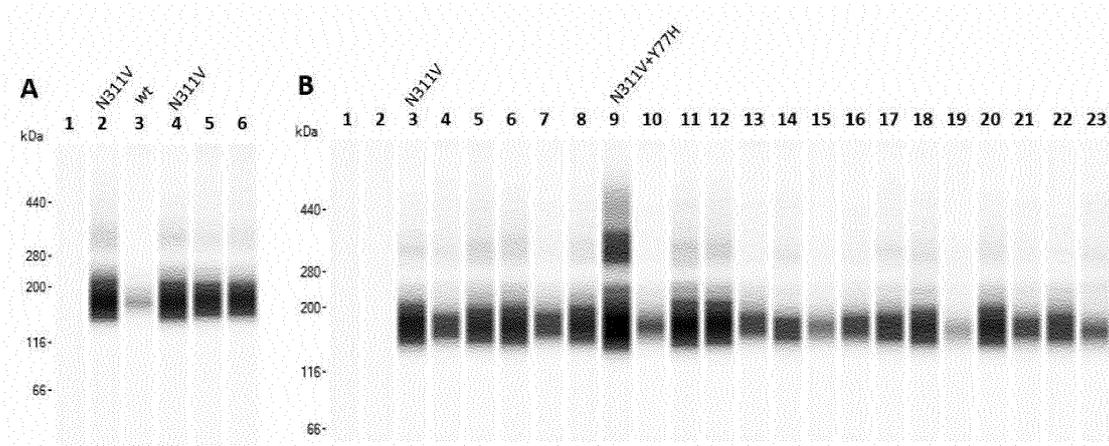
Фиг. 4В



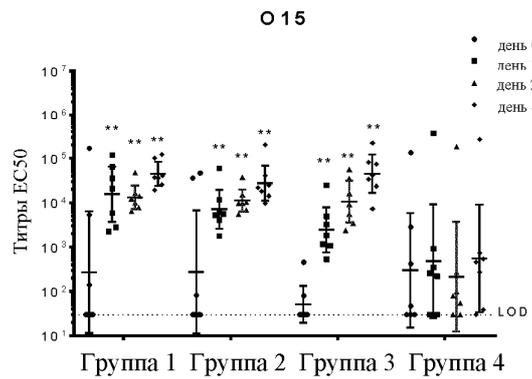
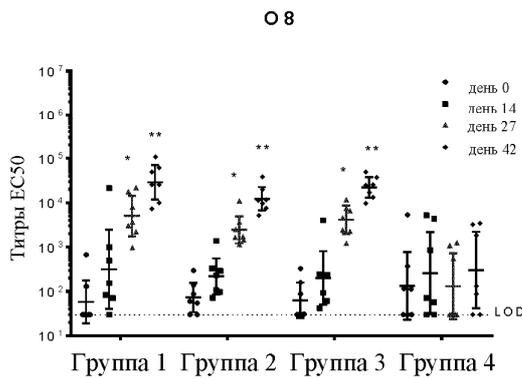
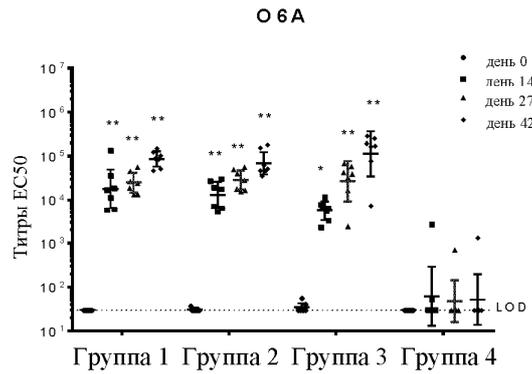
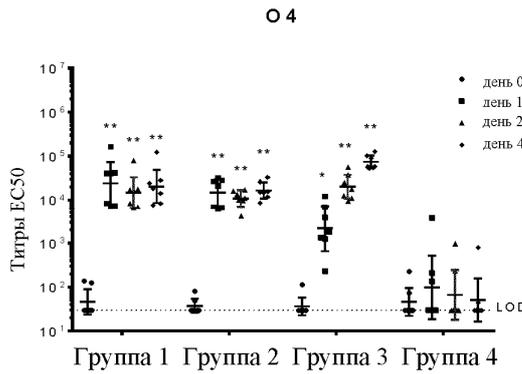
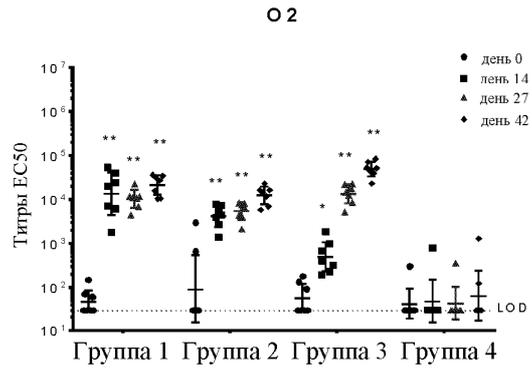
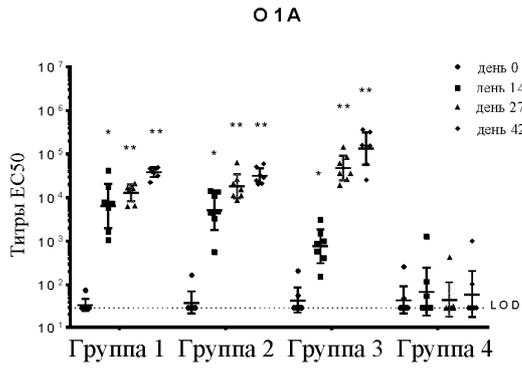
Фиг. 5

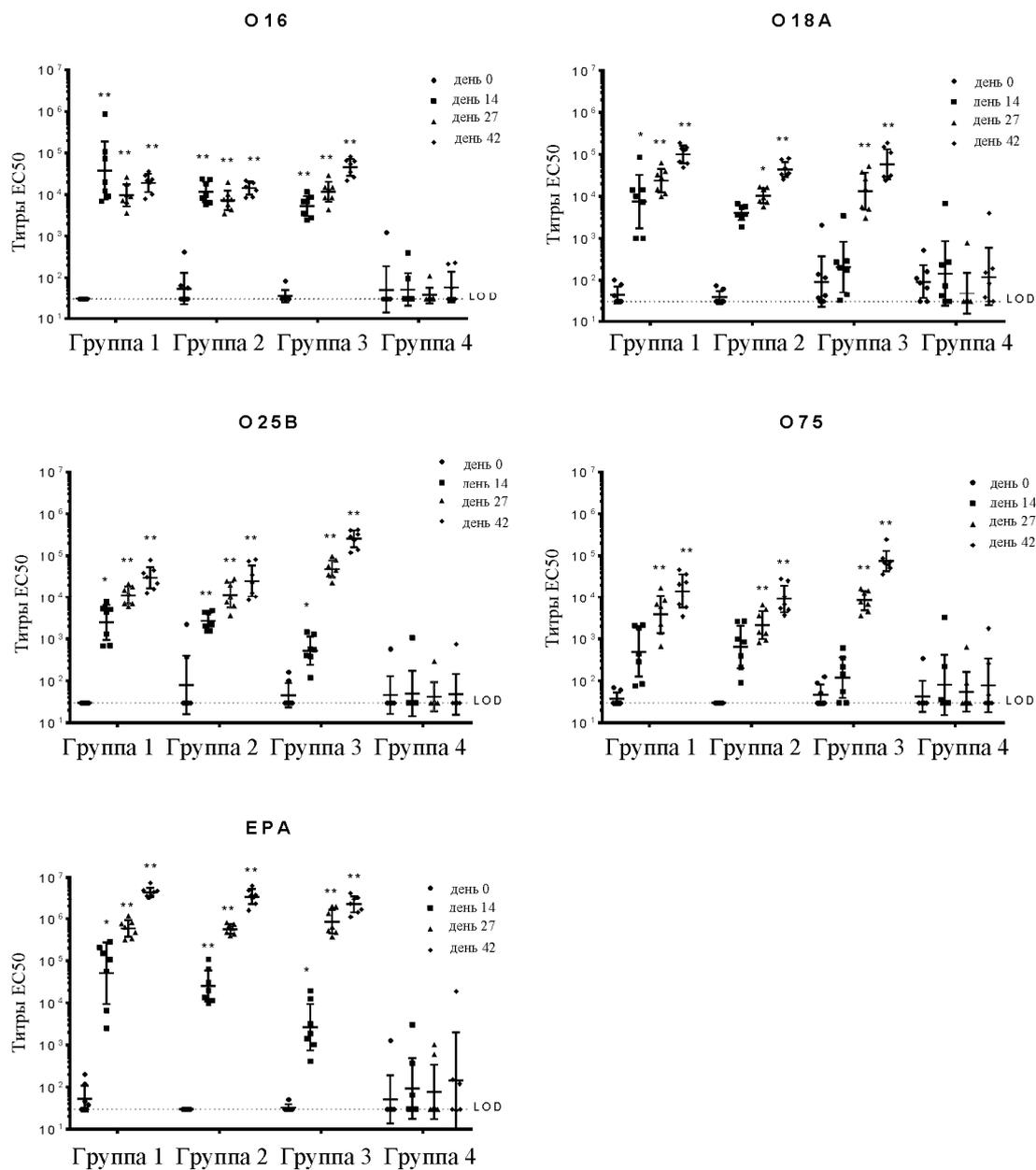


Фиг. 6

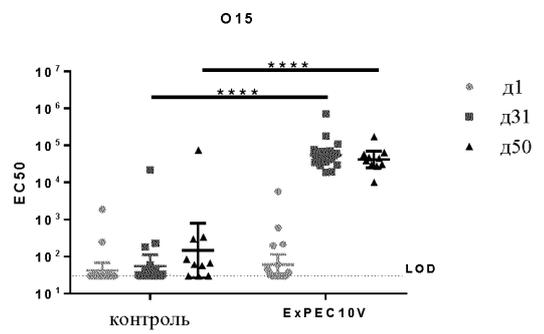
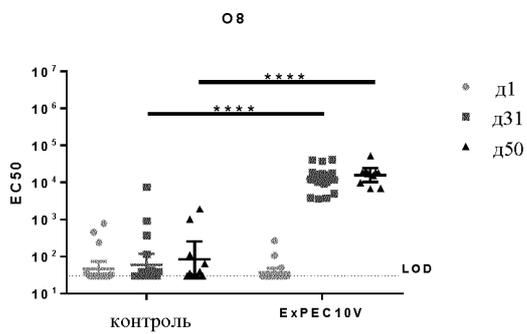
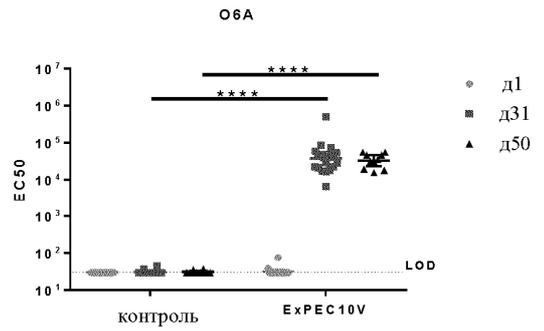
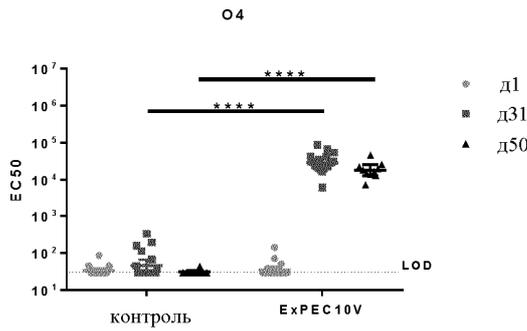
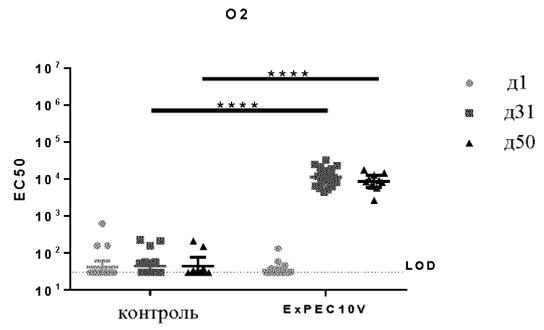
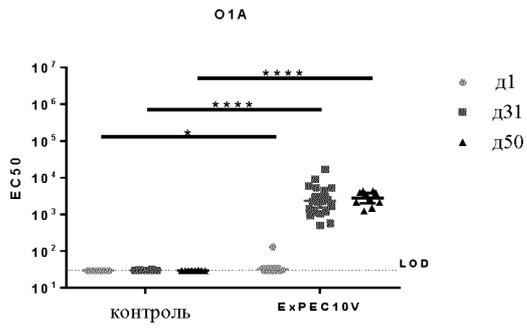


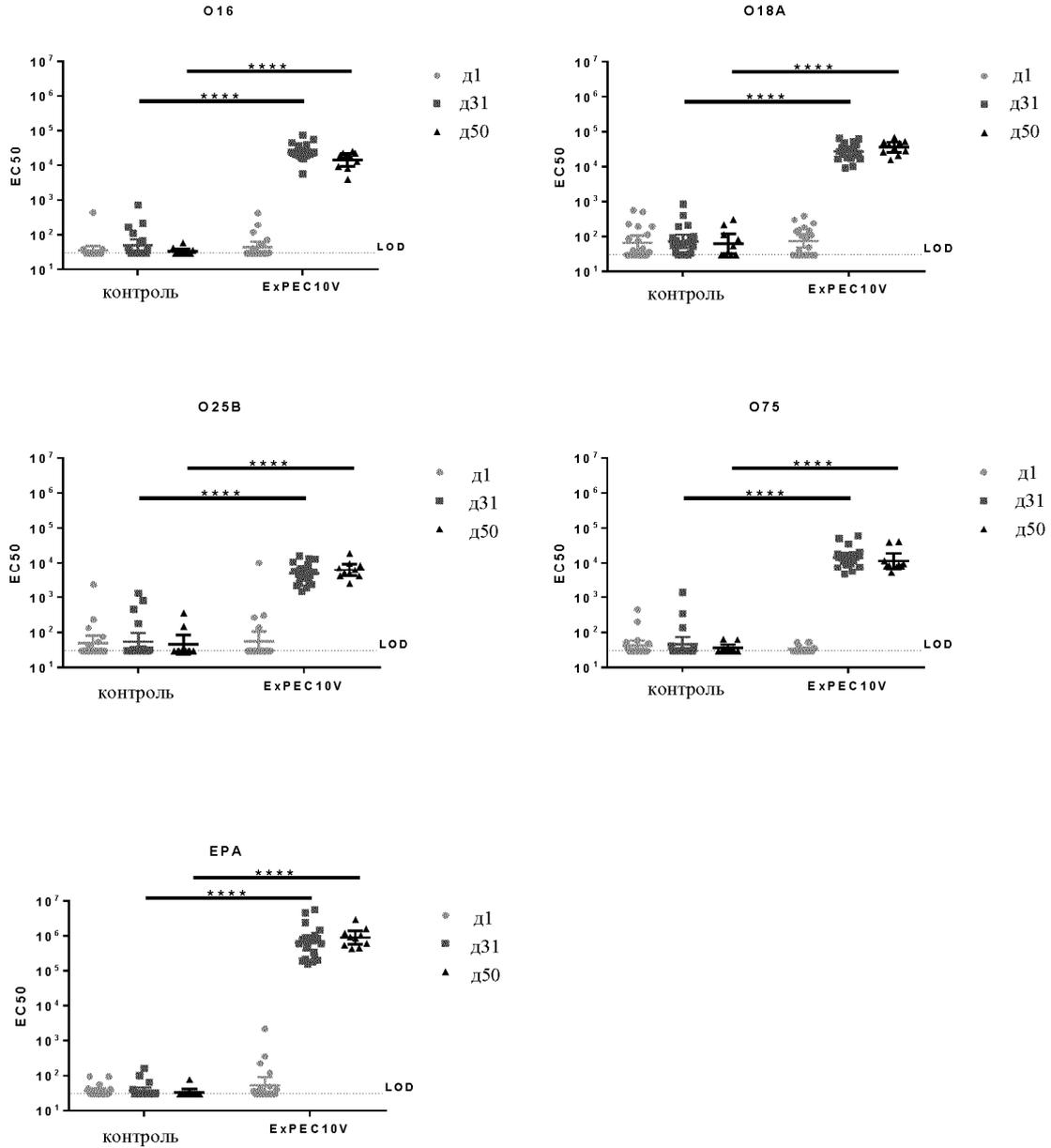
Фиг. 7



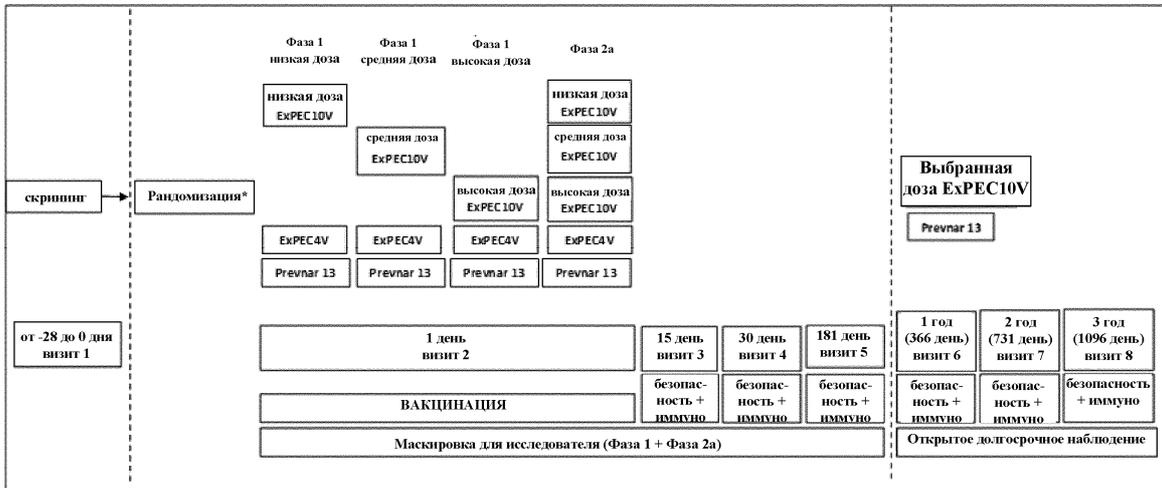


Фиг. 8

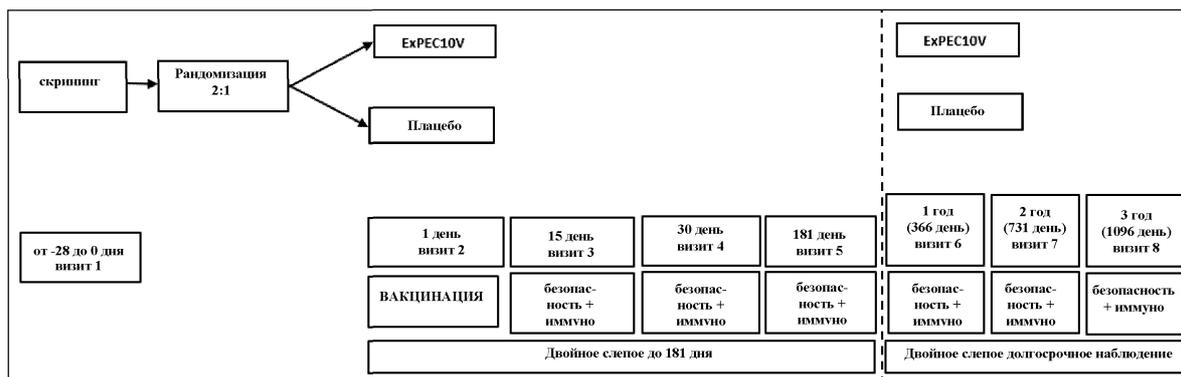




Фиг. 9



Фиг. 10А



Фиг. 10В

