

(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 O-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 Тённис, 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 O-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 O-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 α -L-Rha (1->6) α -D-Glc (1->3) α -L-FucNAc (1->3) β -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 α -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_x *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_x-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_y; и

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

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

когда O_x-антиген представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, PglB_y содержит аминокислотную мутацию N311V или аминокислотные мутации Y77H и N311V, а рекомбинантная клетка-хозяин дополнительно содержит последовательность, кодирующую 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_x представляет собой полисахаридный антиген O6A, PglB_y содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V;

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

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

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

когда антиген O_x представляет собой полисахаридный антиген O18A, PglB_y не содержит аминокис-

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

когда антиген O_x представляет собой полисахаридный антиген O75, PglB_y содержит аминокислотную мутацию N311V,

где в каждом случае аминокислотные мутации относятся к PglB_y дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6,

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_x представляет собой полисахаридный антиген O1A, PglB_y 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_x представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, а PglB_y содержит аминокислотную мутацию N311V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В одном воплощении антиген O_x представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, а PglB_y содержит аминокислотные мутации Y77H и N311V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В воплощениях, когда антиген O_x 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_x представляет собой полисахаридный антиген O6A, PglB_y 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_x представляет собой полисахаридный антиген O8, PglB_y 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_x представляет собой полисахаридный антиген O15, PglB_y 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_x представляет собой полисахаридный антиген O16, PglB_y 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_x представляет собой полисахаридный антиген O18A, PglB_y 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_x представляет собой полисахаридный антиген O75, PglB_y 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_x 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_x-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_y; и

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

где антиген O_x 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_x 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_x, 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_x E. coli, ковалентно связанного с белком-носителем, рекомбинантная клетка-хозяин включает:

(а) нуклеотидную последовательность генного кластера *gfb* для полисахаридного антигена O_x;

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

(в) нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу PglB_y, где: когда антиген O_x представляет собой полисахаридный антиген O1A, PglB_y содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V; когда антиген O_x представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, PglB_y содержит аминокислотную мутацию N311V или аминокислотные мутации Y77H и N311V, а рекомбинантная клетка-хозяин дополнительно содержит последовательность, кодирующую 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_x представляет собой полисахаридный антиген O6A, PglB_y содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V;

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

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

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

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

когда антиген O_x представляет собой полисахаридный антиген O75, PglB_y содержит аминокислотную мутацию N311V,

где в каждом случае аминокислотные мутации относятся к PglB_y дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, 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_x представляет собой полисахаридный антиген O1A, а PglB_y 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_x представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, а PglB_y 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_x представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, а PglB_y содержит аминокислотные мутации Y77H и N311V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В воплощениях, когда антиген O_x 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_x представляет собой полисахаридный антиген O6A, а PglB_y 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_x представляет собой полисахаридный антиген O8, PglB_y 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_x представляет собой полисахаридный антиген O15, а PglB_y 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_x представляет собой полисахаридный антиген O16, а PglB_y 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_x представляет собой полисахаридный антиген O18A, PglB_y 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_x представляет собой полисахаридный антиген O75, а PglB_y 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 бактопренолом, 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 бактопренол 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 биоконъюгатом Glc-модифицированного O4 против изолятов *E. coli* O4 с охарактеризованным статусом *gtrS*, как описано в примере 4; следующие изоляты были *gtrS*-отрицательными: A2625, stGVXN4988, OC24784, OC24787 и OC24788; следующие изоляты были *gtrS*-положительными: Y1382, E551, OC24334, stGVXN4983, stGVXN4994 и OC24794; также был включен штамм OC9487 (ATCC 35383; серотип O75), служивший отрицательным контролем;

на фиг. 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 биоконъюгатами 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 биоконъюгатом 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 биоконъюгата O4 (O4 Glc+) у крыс Спрег-Доули (Sprague Dawley), иммунизированных 3 различными дозами, как описано в примере 4; уровни антител в сыворотке измеряли с помощью ELISA на 0, 14 и 42 день после иммунизации; индивидуальные титры ($\log_{10} EC_{50}$) 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 биоконъюгатом O4-Glc+-EPA; крыс Спрег-Доули (Sprague Dawley) иммунизировали 3 раза внутримышечно буфером для приготовления композиции или биоконъюгатом O4 (Glc+)-EPA в дозе 4,00 мкг/доза; функциональность антител 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 биоконъюгата Q4-Glc+ в периплазматической фракции, позволяющие визуализировать продуцирование биоконъюгата O4-Glc+ для каждого тестируемого штамма. Моногликозилированный продукт примерно 180 кДа, дигликозилированный продукт примерно 320 кДа и тригликозилированный продукт примерно 450 кДа. А) Первый цикл скрининга PglB дикого типа на дорожке 3, N311V-PglB на дорожках 2 и 4, пустой контрольный штамм на дорожке 1 и другие варианты PglB на дорожках 5 и 6, 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 ¹
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-O-метил-манноза; Gal, галактоза; FucNAc, N-ацетилфукозамин и Rib, рибоза. Суффикс "f" относится к фуранозе, а суффикс "p" относится к пиранозе.

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

Термин "биоконъюгат" относится к конъюгату между белком (например, белком-носителем) и сахарным или сахаридным антигеном (например, олиго- и полисахаридным), полученным в клетке-хозяине, предпочтительно бактериальной клетке-хозяине, например, клетке-хозяине *E. coli*, где аппарат клетки-хозяина связывает антиген с белком (например, связывает с N). Предпочтительно, термин "биоконъюгат" относится к конъюгату между белком (например, белком-носителем) и O-антигеном, предпочтительно O-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 O-антигена и/или связывания O-антигена с целевым белком. Биоконъюгаты, которые описаны в данном документе, обладают преимуществами по сравнению с химически полученными гликоконъюгатами, в которых гликаны выделены из клеточной стенки бактерий и впоследствии химически связаны с белком-носителем, например, биоконъюгаты требуют меньшего количества химических веществ при производстве и являются более однородными с точки зрения получаемого конечного продукта и содержат меньше или совсем не содержат свободного (т.е. не связанного с белком-носителем) гликана. Таким образом, в типичных воплощениях биоконъюгаты предпочтительны по сравнению с гликоконъюгатами, полученными химическим путем. Термин "приблизительно", когда он используется вместе с числом, относится к любому числу в пределах ± 1 , ± 5 или $\pm 10\%$ от указанного числа.

Термин "процент (%) идентичности последовательностей" или "% идентичности" описывает количество соответствий ("совпадений") идентичных аминокислот двух или более выровненных аминокислотных последовательностей по сравнению с количеством аминокислотных остатков, составляющих общую длину аминокислотных последовательностей. Другими словами, используя выравнивание, можно установить процент одинаковых аминокислотных остатков для двух или более последовательностей (например, 90%, 95%, 97% или 98% идентичности), когда последовательности сравниваются и выравниваются для максимального соответствия, определенного с использованием алгоритма сравнения последовательностей, известного в данной области техники, или при выравнивании вручную и визуальной проверке. Последовательности, которые сравнивают для определения идентичности последовательностей,

могут, таким образом, отличаться заменой(ами), добавлением(ями) или делецией(ями) аминокислот. Программы, подходящие для выравнивания белковых последовательностей, известны специалистам в области техники. Процент идентичности белковых последовательностей можно определить, например, с использованием таких программ как CLUSTALW, 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-Glcⁿ), 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 (MBP), дифтерийный анатоксин, столбнячный анатоксин, обезвреженный гемолизин *A. S. aureus*, агглютинирующий фактор A, агглютинирующий фактор B, термолabileный энтеротоксин *E. coli*, обезвреженные варианты термолabileного 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* (OMP) 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 EPA).

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, EPA.

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, 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, подъязычного, буккального, внутрикожного, чрескожного, колоректального, внутривенного, интраназального, интра-рахеального, 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 O-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 опсонофагочитараго теста (ОРК или ОРКА), который представляет собой зарекомендовавший себя и общепринятый способ, используемый для получения разрешения на применение вакцин на основе гликоконъюгатов. Такие тесты хорошо известны в области техники и, вкратце, включают стадии выработки и выделения антител против мишени, представляющей интерес (например, полисахаридного O-антигена E. coli, например, гликозилированного полисахаридного антигена O4 E. coli), посредством введения субъекту (например, мыши, крысе, кролику или обезьяне) соединения, вызывающего выработку таких антител. Впоследствии можно оценивать бактерицидную способность антител, например, посредством культивирования бактерий, о которых идет речь (например, E. coli соответствующего серотипа), в присутствии указанных антител и комплемента и, в зависимости от теста, нейтрофилов и оценивать способность антител опосредовать гибель и/или нейтрализацию бактерий, например, используя стандартные микробиологические подходы. Пример анализа ОРК для биоконъюгированных вакцин против E. coli приведен, например, Abbanat et al., 2017, Clin. Vaccine Immunol. 24: e00123-17. Анализ ОРК можно проводить в моноплексном или мультиплексном формате, из которых обычно предпочтительнее мультиплексный формат (например, тестирование нескольких серотипов одновременно). Мультиплексный анализ ОРК в данном документе иногда обозначают "МОРА".

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

В конкретных воплощениях, где предложенная композиция содержит биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 E. coli и по меньшей мере биоконъюгат полисахаридного антигена O25B E. coli, эффективное количество полисахаридного антигена O25B E. coli приблизительно в 1,5-6 раз, например, приблизительно в 2-4 раза выше, например в 1,5, 2, 3, 4, 5 или 6 раз выше, чем концентрация любого другого биоконъюгата, присутствующего в композиции. В таких воплощениях эффективное количество полисахаридного антигена O25B E. coli составляет, например, примерно от 5 до 18 мкг на введение, например 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 мкг на введение. В некоторых воплощениях биоконъюгат или композицию по изобретению вводят субъекту однократно. В некоторых воплощениях биоконъюгат или композицию по изобретению вводят субъекту более одного раза, например, в режиме прайм-буст. В некоторых воплощениях время между двумя введениями составляет по меньшей мере две недели, по меньшей мере один месяц, по меньшей мере два месяца, по меньшей мере три месяца, по меньшей мере шесть месяцев, по меньшей мере один год, по меньшей мере два года, по меньшей мере пять лет, по меньшей мере десять лет или по меньшей мере пятнадцать лет. У людей желаемый иммунный ответ обычно может быть вызван однократным введением биоконъюгата или композиции по изобретению. В некоторых воплощениях предусмотрено повторное введение, например, через десять лет.

Клетки-хозяева.

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

Для получения полисахаридных O-антигенов E. coli, описанных в данном документе (например, гликозилированного полисахаридного антигена O4 E. coli) и биоконъюгатов, содержащих полисахаридные O-антигены E. coli, описанных в данном документе (например, биоконъюгата гликозилированного полисахаридного антигена O4 E. coli) могут применяться любые клетки-хозяева, известные 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 α -1,3-гликозидной связи. Пример аминокислотной последовательности такого фермента, обеспечивающего ветвление, представлен в SEQ ID NO: 4. Другие примеры содержат аминокислотные последовательности, которые идентичны ей по меньшей мере на 80%. Приведенные в качестве иллюстрации примеры нуклеиновых кислот, кодирующих гены *gtrS*, специфичные к полисахаридному антигену 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 О4 или гликозилированный антиген О4, путем введения в такую *E. coli* локуса *gfb* О4 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 О-антигена, поскольку характеристики штамма-производителя четко определены. Несмотря на то, что биоконъюгаты разных О-антигенов будут вести себя по-разному и процессы экспрессии могут быть оптимизированы для каждого производственного штамма, по крайней мере, основной процесс получения биоконъюгатов О-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 О-антигена *E. coli*, таких как биоконъюгаты О1А, О2, О6А и О25В, как описано, например, в WO 2015/124769 и WO 2017/035181, может быть использован в качестве основы для разработки производства других биоконъюгатов О-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 О4 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 О1А, О2, О6А, О8, О15, О16, О18А, О25В или О75 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем. Такие клетки-хозяева (например, рекомбинантные клетки-хозяева) содержат нуклеотидную последовательность генного кластера *gfb*, специфичного для полисахаридного О-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 О-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 О1А, О2, О6А и О25В подробно описано в WO 2015/124769 и WO 2017/035181. Примеры генных кластеров для каждого О-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 эндоксилазазы (XynA) *Bacillus* sp., термолabileного энтеротоксина LTIIb *E. coli*, эндоксилазазы 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 О-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 О-антигена *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, включает: (1) получение рекомбинантной клетки-хозяина, содержащей (а) нуклеотидную последовательность генного кластера *gfb* для полисахаридного О-антигена; (б) нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-носитель, предпочтительно ЕРА, 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 О-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 О-антигена, ковалентно связанного с белком-носителем, называется "соотношением гликан/белок", или "соотношением полисахарид/белок", или "соотношением PS/белок". В некоторых воплощениях полисахаридный О-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 О-антиген:белок составляет примерно от 1:10 до 1:2, например, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3 или 1:2, в зависимости от конкретного серотипа О-антигена. В некоторых воплощениях соотношение гликан/белок составляет от примерно 0,15 до примерно 0,45. В общем, более высокое соотношение гликан/белок полисахаридного О-антигена к белку-носителю является предпочтительным, поскольку в некоторых случаях высокое количество белка-носителя может привести к иммунологическому взаимовлиянию. Кроме того, более высокое соотношение гликан/белок поможет получить достаточное количество полисахаридного О-антигена, дозированного в форме биоконъюгата, при сохранении относительно низкого количества белка-носителя, что особенно полезно для поливалентных композиций, в которых композиция должна охватывать несколько серотипов, например, композиций, содержащих биоконъюгаты по меньшей мере 4 различных О-антигенов, по меньшей мере 5 различных О-антигенов, по меньшей мере 6 различных О-антигенов, по меньшей мере 7 различных О-антигенов, по меньшей мере 8 различных О-антигенов, по меньшей мере 9 различных О-антигенов, по меньшей мере 10 различных О-антигенов и т. д.

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

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

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

в) нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу $PglB_y$, и

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

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

когда антиген O_x представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген $O4$, $PglB_y$ содержит аминокислотную мутацию N311V или аминокислотные мутации Y77H и N311V, а рекомбинантная клетка-хозяин дополнительно содержит последовательность, кодирующую 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_x представляет собой полисахаридный антиген $O6A$, $PglB_y$ содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V;

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

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

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

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

когда антиген O_x представляет собой полисахаридный антиген $O75$, $PglB_y$ содержит аминокислотную мутацию N311V,

где в каждом случае аминокислотные мутации относятся к $PglB_y$ дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, 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_x представляет собой полисахаридный антиген $O1A$, а $PglB_y$ 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_x представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген $O4$, а $PglB_y$ 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_x представляет собой полисахаридный антиген $O6A$, а $PglB_y$ 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_x представляет собой полисахаридный антиген $O8$, $PglB_y$ 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_x представляет собой полисахаридный антиген $O15$, а $PglB_y$ 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_x представляет собой полисахаридный антиген O16, а PglB_y 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_x представляет собой полисахаридный антиген O18A, PglB_y 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_x представляет собой полисахаридный антиген O75, а PglB_y 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_x 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_x;

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

(в) нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу PglB_y, и

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

где PglB_y содержит аминокислотную мутацию N311V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6,

где антиген O_x 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_x 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⁺), 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⁺), (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_x E. coli, ковалентно связанного с белком-носителем, рекомбинантная клетка-хозяин содержит:

- (а) нуклеотидную последовательность генного кластера gfb для полисахаридного антигена O_x;
- (б) нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-носитель, содержащий по меньшей мере один сайт гликозилирования, содержащий консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 1, предпочтительно имеющую SEQ ID NO: 2, и

(в) нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу PglB_y, где: когда антиген O_x представляет собой полисахаридный антиген O1A, PglB_y содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483N и A669V;

когда антиген O_x представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, PglB_y содержит аминокислотную мутацию N311V или аминокислотные мутации Y77H и N311V, а рекомбинантная клетка-хозяин дополнительно содержит последовательность, кодирующую 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_x представляет собой полисахаридный антиген O6A, PglB_y содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V;

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

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

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

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

когда антиген O_x представляет собой полисахаридный антиген O75, PglB_y содержит аминокислотную мутацию N311V,

где в каждом случае аминокислотные мутации относятся к PglB_y дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, 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_x представляет собой полисахаридный антиген O1A, а PglB_y 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_x представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, а PglB_y 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_x представляет собой полисахаридный антиген O6A, а PglB_y 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_x представляет собой полисахаридный антиген O8, PglB_y 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_x представляет собой полисахаридный антиген O15, а PglB_y 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_x представляет собой полисахаридный антиген O16, а PglB_y 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_x представляет собой полисахаридный антиген O18A, PglB_y 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_x представляет собой полисахаридный антиген O75, а PglB_y 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⁺), 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 *wzy* и *wzx*, специфичных для серотипов O-антигена.

Таблица 2

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

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 Δ wzzE-wecG Δ waal Δ 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- β -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 α -Rha и у H6 с H5 для α -FucNAc для RU O4. Другие наблюдавшиеся пики принадлежали аминокислотам EPA и концевой Rha (tRha). Во-вторых, углеродный ЯМР-спектр содержал хорошо рассредоточенные и обеспечивающие идентификацию одиночные пики для RU O4. Углероды были идентифицированы косвенно через присоединенные протоны с помощью эксперимента HSQC (гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия). Эксперимент HSQC-DEPT (гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия с усилением без искажений путем переноса поляризации) дал инвертированные пики для групп CH₂. В эксперименте HSQC наблюдались кросс-пики для пентасахаридной RU O4 [5 аномерных, кольцевых, две N-ацетильных и две метильных (Rha и FucNAc)] группы, а также аминокислот EPA в характерных областях. Каждую из пар протон/углерод для O4 оказалось возможным найти на основании 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 O4</i>	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 Δ *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 α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)-D-GlcNAc О-антигена O16 *E. coli*. В штаммах-продуцентах *E. coli* O1A, O2 и O6A делеция или замена гена *gtrABS* отсутствует. В этих О-антигенах отсутствует мотив α -L-Rha-(1 \rightarrow 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- β -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 ¹
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> ^{N534Q}	Частота использования кодонов оптимизирована для <i>E. coli</i> ; природный сайт гликозилирования <i>PglB</i> инактивирован; SpR
pGVXN1217	<i>pglB</i> ^{N311V}	Частота использования кодонов оптимизирована для <i>E. coli</i> ; <i>PglB</i> с оптимизацией по субстрату; SpR

pGVXN1221	<i>pglB</i> ^{N311V,K482R,D483H,A669V}	Частота использования кодонов оптимизирована для <i>E. coli</i> ; PglB с оптимизацией по субстрату; SpR
pGVXN2381	<i>pglB</i> ^{Y77H,S80R,Q287P,K289R,N311V}	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

¹ 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 EC₅₀, 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 [¶]									
доза [¶]	O1A	O2	O6A	O25B	O4	O8	O15 [#]	O16	O18A	O75
высокая [¶]	*	**	**	*	**	ns	**	**	*	ns
средняя [¶]	*	**	**	**	**	ns	**	**	ns	ns
низкая [¶]	*	*	*	*	*	ns	**	**	ns	ns
высокая [¶]	**	**	**	**	**	*	**	**	**	**
средняя [¶]	**	**	**	**	**	*	**	**	*	**
низкая [¶]	**	**	**	**	**	*	**	**	**	**
высокая [¶]	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
средняя [¶]	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
низкая [¶]	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**

Темно-серыми прямоугольниками показаны серотип-специфические гуморальные ответы, для которых значения p были статистически значимыми. Светло-серыми прямоугольниками показаны серотип-специфические гуморальные ответы, для которых значения p не были статистически значимыми (ns). Критерий суммы рангов Уилкоксона с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. Сравнение животных, вакцинированных ExPEC10V (группы 1, 2 и 3), с контрольной группой, получавшей физиологический раствор (группа 4). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$. * 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 ExPEC10V, по сравнению с контрольной группой, получавшей только физиологический раствор (фиг. 9, табл. 8). Для серотипа O1A значительно более выраженный гуморальный ответ наблюдался также в день 1 (исходный уровень), когда вакцинированных животных сравнивали с контрольными животными. Эти результаты позволяют предположить, что некоторые животные предварительно подвергались воздействию E. coli или имеют антигена, перекрестно реагирующие с O1A-LPS.

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

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

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

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

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

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

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

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

Поскольку не ожидается, что при профилактике инвазивных заболеваний механизм действия конъюгированных вакцин будет зависеть от механизмов устойчивости к антибиотикам, считается, что вакцина ExPEC10V обеспечивает защиту от IED, вызванных лекарственно-устойчивыми и чувствительными к лекарственным средствам серотипами O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75.

Имеется предшествующий клинический опыт с ExPEC4V, более ранней вакциной-кандидатом, которая содержала набор из четырех конъюгатов О-антигена E. coli (O1A, O2, O6A и O25B), также присутствующих в ExPEC10V. Основываясь на результатах четырех клинических исследований (два завершённых исследования фазы 1, одно завершённое исследование фазы 2 и текущее исследование фазы 2), ExPEC4V хорошо переносилась участниками исследования, и при дозах до 16 мкг полисахарида (PS) на серотип (O1A, O2, O6A и O25B) никаких связанных с вакцинойстораживающих сигналов по безопасности не отмечалось. Большинство нежелательных явлений (НЯ) относились к 1 и 2 степени, сообщалось об очень небольшом количестве НЯ 3 степени. Полученные по запросу отсроченные местные НЯ (НЯ, которые начинаются после 5-го дня после вакцинации) наблюдались в основном при более высоких дозах ExPEC4V. В каждом исследовании было показано, что вакцина ExPEC4V является иммуногенной, демонстрируя дозозависимый иммунный ответ на вакцину, а титр иммуноглобулинов G (IgG), специфичных к О-антигену, возрастает, о чем свидетельствуют результаты иммуноферментного анализа (ELISA). Анализ опсонофагоцитарной активности (ОРКА), оптимизированный для ExPEC4V, продемонстрировал функциональную активность антител. Совместный анализ результатов ELISA и ОРКА показал корреляцию между результатами этих тестов (коэффициенты корреляции Пирсона $\geq 0,61$ и $\geq 0,48$ для дня 30 и дня 360, соответственно, в клиническом исследовании фазы 2 [исследование 4V-BAC2001]), обосновывая использование ELISA в качестве первичного измерения титров антител к ExPEC4V и для прогнозирования функциональной активности антител. Анализ данных по иммуногенности продемонстрировал стойкость иммунного ответа на протяжении трех лет после вакцинации ExPEC4V. На данный момент также показано, что сыворотки людей, вакцинированных ExPEC4V и имевших высокие титры 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
Основные	
<ul style="list-style-type: none"> Оценка безопасности и реактогенности различных доз ExPEC10V у участников в возрасте ≥ 60 и ≤ 85 лет 	<ul style="list-style-type: none"> Полученные по запросу местные и системные нежелательные явления (НЯ), регистрируемые в течение 14 дней после вакцинации (с 1 дня до 15 дня) Сообщенные спонтанно НЯ, регистрируемые с момента введения исследуемой вакцины до 29 дня после вакцинации (с 1 дня до 30 дня) Серьезные нежелательные явления (НЯ), регистрируемые с момента введения исследуемой вакцины до 181 дня
<ul style="list-style-type: none"> Оценка дозозависимой иммуногенности ExPEC10V на 15 день у участников в возрасте ≥ 60 и ≤ 85 лет 	<ul style="list-style-type: none"> Титры антител к ExPEC10V, измеренные в мультиплексном иммуноанализе на основе электрохемилюминесценции (ECL) и мультиплексном анализе опсонофагоцитарной активности (MOPA) на 15 день
Второстепенные	
<ul style="list-style-type: none"> Оценка корреляции между сывороточными титрами, полученными в мультиплексном иммуноанализе на основе ECL (общие антитела) и MOPA (функциональные антитела) на 15 день 	<ul style="list-style-type: none"> Титры антител к ExPEC10V, измеренные в мультиплексном иммуноанализе на основе ECL и MOPA на 15 день
<ul style="list-style-type: none"> Оценка дозозависимой иммуногенности ExPEC10V на 30 и 181 день у участников в возрасте ≥ 60 и ≤ 85 лет 	<ul style="list-style-type: none"> Титры антител к ExPEC10V, измеренные в мультиплексном иммуноанализе на основе ECL и MOPA на 30 и 181 день
<ul style="list-style-type: none"> Оценка в периоде долгосрочного наблюдения (ДН) безопасности дозы ExPEC10V, выбранной для дальнейших клинических разработок на основе первичного анализа на 30 день у участников в возрасте ≥ 60 и ≤ 85 лет 	<ul style="list-style-type: none"> Серьезные НЯ, связанные с исследуемой вакциной или предусмотренными исследованием процедурами, от 182 дня и до конца исследования
<ul style="list-style-type: none"> Оценка в периоде ДН иммуногенности дозы ExPEC10V, выбранной для дальнейших клинических разработок на основе первичного анализа на 30 день 	<ul style="list-style-type: none"> Титры антител к ExPEC10V, измеренные в мультиплексном иммуноанализе на основе ECL и MOPA через 1 год (366 день), 2 года (731 день) и 3 года (1096 день)

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

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

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

Общая схема исследования.

Это рандомизированное многоцентровое интервенционное исследование, включающее две когорты.

Для когорты 1 исследование проводится с использованием активного препарата в качестве контроля, с маскированием данных для исследователя и включает в общей сложности 404 взрослых участника в возрасте 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 Pevnar 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 Pevnar 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 Pevnar 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 Pevnar 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) ^а		
	Низкая концентрация ^б	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 ₂ РО ₄	6,19 мМ		
Na ₂ НРО ₄	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 ^аАктивный 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 Prevnar 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 колониобразующие 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 ≥ 2 -кратным и ≥ 4 -кратным увеличением титров сывороточных антител с 1-го дня (до вакцинации) средний геометрический титр (GMT);

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

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

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

Таблица 11
Когорта 1: схема вакцинации

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 ^a	400
G7	Плацебо	200
Суммарно		600

* ExPEC10V состоит из полисахаридных (PS) O-антигенов серотипов ExPEC O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75, биоконъюгированных по-отдельности с белком-носителем, генетически обезвреженной формой экзотоксина 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 SGGGDQ¹NATG SGGGKLAEEA FDLWNECAKA CVLCLKDQVSR SRMSVDPAL ADTNGQGVHL YSMVLEGGND
 ALKLAIDNAL SITSDGLTIR LEGGVEPNKP VRYSYTRQAR GSWSLNWLVV IGHEKPSNIK VFIHELNAGN QLSHMSE
 IEMGDPELLAK LARDATFFVR AHESNEMQPT LAISHAGVSV VMAQAQPRRE KRWSEWASGK VLCLLDPLDG VYNYLAQ
 NLDLDTWEGKI YRVLAGNPAK HDLDIKDNNN STPTVISHRL HFPEGGSLAA LTAHQACHLP LEAFTRHRQP RGWEQLE
 YPVQRLVALY LAARLSWNQV DQVIRNALAS PGSGGDLGEA IREQPEQARL ALTLAAAESE RFVRRQGTGND EAGAASF
 SLTCEPAK²Q NRTKGECAEP ADSGDALLER NYPTGAEFLG DGGDVSFSTR GTQNWTVREL LQAHRQLEER GYVFGY
 FLEAAQSI³VF GGVRRASQDL DAIWRGFYIA GDPALAYGYA QDQEPDARGR IRNGALLRVY VPRWSLPGFY RTGLTLF
 AAGEVERLIG HPLPLRLDAI TGPEEEGGRV TILGWPLAER TVVIPS⁴AIPT DPRNVGGDL D PSSIPDKEQA ISALPDI
 PGKPPREDLK LSGGGDQ⁵NA T

SEQ ID NO: 4 (аминокислотная последовательность GtrS O4)

MNNLMNWNCKLSIFIIAFILLWLRPDIILTNAQFWAEDSVFWYKDAYENGLFSSSLTTPRNGYFQTVSTFIVGLT
 ALLNPDYAPFVSNFFGMIRSVI IWFLFTEFRNFLLTTRIFLSIYFLCPLGDEVHANITNAHWYLSLYVSMIL
 IARNPSSKSWRFHDIFFILLSGLSPFIIIFILAASC¹FKFINNCKDHSVRSFINFYLRQPYALMIVCALIQGTSI
 ILTFNGTRSSAPLGF²SFDVISSIISSNIFLFTFVPWDIAKAGWDNLLLSYFLSVSILS³CAAFV⁴VKGTWRMKVFA
 TLP⁵LLIIIFSMAKPQLTDSAPQLPTLINGQGSRYFVNIHIAIFSLLCVYLLECVRGKVATLFSKIYLTILLFVMG
 CLNFVITPLPNMNWREGATLINNAKTGDV⁶ISIQVLPGLTLELRKK

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

ATGAATAATTAAATATGAATAACTGGTG¹TAAATATCTATATTTATTATTGCATTTATTTTGCATAGGCTTAGA
 AGGCCGGATATACTCACAACGCACAATTTGGGCAGAAGATCCGTTTTCTGGTATAAGGACGCCTATGAGAAC
 GGATTTCTAAGTTCACTAACAACGCCTAGGAATGGGTATTTCCAGACTGTTCTACATTTATAGTTGGTCTGACT
 GCTTTATTA²AAATCCAGATTATGCACCTTTTGGTTCTAAATTTTTTGGCATAATGATTCGCTCAGTAATTATATGG
 TTTTATTTACAGAAAGATTCAACTTCCSCATTCAGTACTAGGATTTTCTATCTATTTATTTCTATGCATG
 CCTGGATTTGGATGAAGTT³CATGCAAATATAACAATGCACATTTGGTATTTGTCA⁴TATATGTATCAATGATCCTG
 ATAGCTCGCAATCSAAGTTCAAATCATGGAGGTTT⁵CATGATATATTTCTTTATCTTGTATCCGGGCTCAGTGGC
 CCATTTATAATTTT⁶CATTTTAGCAGCTT⁷CATGCTTTAAATTTATAAATAATGTAAAGATCATATAGTGTAGA
 TCTTT⁸CATAAATTTACTTGCCTCAGCCATACGCAATTAATGATTTGTTTGCCTTTAATCAAGGAACTTCTATA
 ATTTAACTTTCAATGGCACACGTTCTCAGCACCGTAGGATTCAGTTTGTATGTGATTTCTGTTATTTATATCA
 TCGAATATTTTTTATTTACATTTGTCCCATGGGATATTGCAAAGGCTGGGTGGGATAATTTACTGTTATCTTAT
 TTTTTGTCTGTTTCGATTTTGTCTGTGCGGCCTTTGTTTTTTGTTAAAGGTACGTGGCGAATGAAAGTATTTGCA

ACTTTACCATTGCTAATTATAATATTTTCAATGGCAAACCACAATTGACAGACTCGGCACCTCAATTGCCAACA
 CTTATTAATGGGCAAGGTTCAAGATACTTCGTAAATATACATATTGCGATATTCTCTTTGCTATGTGTTTACTTA
 CTTGAGTGCCTCAGGGGGAAAGTGGCAACTTTATTTTCCAAAATATACTTAACAATTTTGCATTCGTGATGGGA
 TGTTTGAATTTTGTATCACCCCACTCCCAAACATGAAGTGGAGGGAAGGTGCTACTTTGATTAATAATGCAAAA
 ACTGGTGATGTCATTTGATTCAGTGTACCACCTGGCTAACACTTGAACCTAAGGAAAAATAA

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

MLKKEYLKNPYLVLFAMII LAYVFSVFCRFYVWWASEFNEYFFNNQLMII SNDGYAFAEGARDMIAGFHQPNDL
 SYYGSSLSALTYWLYKITPFSFESIILYMSSTFLSSLVVIPTILLANEYKRPLMGFVAALLASIANSYNRTMSGY
 YDTDMLVIVLPMFILFFMVRMILKKDFFSLIALPLFIGIYLWYPPSSYTLNVALI GLFLIYTLI FHRKEKIFYIA
 VILSSLTLSNIAWFYQSAAIIVI LFFALFALEQKRLNFMII GILGSATLI FLILSGGVDPILYQLKFYIFRDESAN
 LTQGFMYFNVNQTIQEVENVDLSEFMRI SGSEIVFLSFLGFVWLLRKHKSMIMALPIVLVGLFALKGGIRFTI
 YSVPVMAFGFLLSEFKAIMVKKYSQLTSNVICIVFATILTLAPVFIHIYNYKAPT VFSQNEASLLNQLKNIANR
 EDYVVTWWDYGYPVRYSDVKT LVDGGKHLGKDNFFPSFALS KDEQAAANMARLSVEYTEKS FYAPQNDI LKTDI
 LQAMMKDYNQSNVDLFLASLSKPDFKIDTPKTRDI YLYMPARMSLI FSTVASFSFINLDTGVLDKPFSTAYPL
 DVKNGEIIYLSNGVVLSDDFRSFKI GDNVVSVNSIVEINSIKQGEYKITPIDDKAQFYI FYLKDSAI PYAQFILMD
 KTMFNSAYVQMFFLGNVDKLNFLDLVINSRDAKVFKLKI

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

GenBank: BAA16209.1)

MLKLEFAKYTSIGVLNTLIHWVVFVGVCIYVAHTNQALANFAGFVAVSFSFFANAKFTFKASTTMMRYMLYVGFMG
 TLSATVWGWAADRCALPPMITLVTFSAISLVCGFVYSKFI VFRDAK

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

GenBank: BAA16210.1)

MKISLVVPVFNEEEAIPIFYKTVREFEELKSYEVEIVFINDGSKDATESIINALAVSDPLVPLSFTRNFGKEPA
 LFAGLDHATGDALIPIDVDLQDPIEVI PHLIEKWQAGADMVLAKRSDRSTDGRLKRKTAEFWFKLHNKISNPKIE
 ENVGDFRLMSRDVVENIKLMPERNLFMKIILSWVGGKTDIVEYVRAERIAAGDTKFNWKLWNLALEGITSFSTFP
 LRIWTYI GLVVASVAFIYGAWMILDTIIFGNAVRGYPSSLVSI LFLGGIQMIGI GVLGEYIGRTYIETKKRPKYI
 IKRVKK

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

продукт O4-EPA BVEC-L-00684f)

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCTCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCGATACCC
 AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTAGTACATTTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAA
 GAAATCCTCCTGGTAACTCAGCGCTCCAAGAACGGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA
 CTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGCGGTGACCATATG
 AACGTGCGTCAAGGGCAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCA
 TTTGTCTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATG
 ATTGACAGTTTCAACGAAACGGCCGCGAGCCAGGTGCTGGCAAAACGATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCC
 GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAAGCCGATGTTGAATTTATCGAAAAACCGGAT
 CAGCCGACAGCGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGTTCGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAAGT
 GAACGTAAGTCAAGCGTGGTGCATGGGGACGATTCAGCTGACTGATGCTATTGCGGAGCTGGCGAAAAACAATCC
 GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCCAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG
 TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCTGTAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA
 TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATATAACGGCAGTGAATAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAA
 TCTTCTGCGGTTGTTTTATAATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA
 GGATTTTCTTGTTCAGAGCGGATTTGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA
 ACGTCTGCATCATAGGCATGCATGCAGTGTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC
 CTCTATTAATCAAAGTGAAGCCGCTTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGTGAATAA
 CTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTGGTTTCAGCTGTAGTTCGTACATTTATAATAATACGCAGGATAGTGT

GTTAATGTCGATAAATTAACGTACGCCGAAACCGGGAATCACTTGCTGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATGTT
 TTTGAACATGCGGATATTTGCGATGCACCTGCAATGGCACGGATTTTGGCTCAGCATCAGCCGGATGCAGTGATG
 CACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTTGGT
 ACTTATGCTCCTTTTGAAGCCGCTCGCAATTACTGGTCTGCTCTTGATAGCGACAAGAAAATAGCTTCCGTTT
 CATCATATTTCTACTGACGAAGTATATGGTGATTTGCCTCATCTGACGAGGTAAATAATACAGAAGAATTACCC
 TTATTTACTGAGACAACAGCTTACGCGCCAAGCAGCCCTTATTCCGCATCCAAAGCATCCAGCGATCATTTAGTC
 CGCGCGTGGAAACGTACCTATGGTTTACCAGCATTGTGACTAATTGCTCTAACAATTATGGTCCTTATCATTTT
 CCGGAAAAATTGATCCATTGGTTATCTCAATGCTCTGGAAGGTAAAGCATTACCTATTTATGGTAAAGGGGAT
 CAAATTCGCGACTGGCTGTATGTTGAAGATCATGCGCGTGGCTTATATACCGTCTGTAACCGAAGGTAAAGCGGGT
 GAACTTATAACATTTGGTGGGCACAACGAAAAGAAAACATAGATGTAGTGCTCACTATTTGTGATTTGCTGGAT
 GAGATTGATCCGAAAGAGAAAATCTTTCGTGAGCAAACTACTTATGTTGCCGATCGTCCGGACACGATCCCGCT
 TATGCGATTGATGCTGAGAATATTTGGTCGCGAATTTGGGATGGAAACCACAGGAAACGTTTGGAGCGGGATTCCG
 AAGACAGTGAATGGTATCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAATGTGAAAAGTGGTGCCTATCAATCGTGGATT
 GAAGAGAATATGAGGGCCGCCAGTAATGAATATCCTCCTTTTGGCAAACAGGGCAGGTAGGTTGGGAACCTAC
 AGCGTCTGCGCACTCTGGGTAACCTGATTGCTCTTGATGTTTCACTGATTATTTGGCGATTTTCAAGTA
 ACCCGAAGGTGTGGCTGAAACCGTCAAAAAATTCGCCAGATGTTATTTGTTAATGCTGCTCATACCGCGG
 TAGATAAGGCTGAGTCTGAGAACCAGAAATTTGCACAATTACTCAATGCGACCAGCGTTGAAGCAATTGCAAAGCGG
 CTAATGAAGTTGGGCTTGGGTAATTTCACTCACTCACTACTGCTTCCCTGGAAATGGGACACGATCCCATGGC
 TCGAGACTGATGTAACCGCTCCGCTCAATGTTTATGGCAAACCAAATTTGGCTGGAGAAAGAGCATTACAAGAAC
 ATTTGCGCAAAGCATCTTATTTTCCGTACCAGCTGGGTATATGCAGGTAAAGGAAATAACTTTGCCAAAACAATGT
 TACGCTGGCAAAGAGCGCGAAGAATGGCTGTGATAAACGATCAGTTTGGCGCACCAACAGGTGCTGAATTCG
 TGGCTGATTGCACCGCTCATGCCATTCGCGTGGCATTAACAAAACAGAAAGTTGCTGGCTGTACCATCTGGTAG
 CAAATGGCACAACAACCTGGCAGATTACGCCGCGTAGTATTCGAAGAAGCCCGTAAAGCAGGGATTGACCTTG
 CACTTAACAAAACCTCAACGCCGTACCAACAACGGCTTATCTACTCCAGCCCGCTCCTCATAATTTCCGCTCA
 ATACCGAAAAGTTTTCAGCAGAACTTTGCGCTTGTCTTGGCTGACTGGCAGGTGGGCGTGAACGATGCTCAACG
 AATTATTTACGACTACGGCAATTTAACAAAATTTTGCATCTCGCTCATGATGCCAGAGCGGGATGAATTAAGG
 AATGGTGAATGAAAACCGGTAAAGGTATTATTCTGGCTGGTGGTCCGGCACTCGTCTTTATCCTGTGACGATG
 GCAGTGAGTAAACAACCTGCTGCCGATTTATGATAAGCCGATGATTTATTTATCCGCTTTCAACGCTTATGTTAGCG
 GGTATTCGCGATATTTCTTATTATCAGTACGCCACAGGATACACCGCGTTTCCAACAATTTGTTGGGGGACGGGAGT
 CAGTGGGGGCTTAATCTACAGTATAAAGTACAACCGAGTCCGGATGGCTGGCGCAAGCGTTTATTATTTGGTGAA
 GACTTTATTGGTGGTGATGATTGTGCACTCGTACTTGGCGATAATATCTTCTATGGACACGACTTCCCGAAATTA
 ATGGAAAGCTGCTGTTAAACAAAGAAATCGGTGCAACGGTATTTGCTTATCACGTCAATGATCCTGAACGTTATGGT
 GTCGTGGAGTTTGATAATAACGGTACTGCAATTAGCCTGGAAGAAAACCGCTGGAACCAAAAAGTAACCTATGCG
 GTTACTGGGCTTTATTTCTATGACAATGATGTTGTAGAAAATGGCGAAAAACCTTAAGCCTTCTGCCCGTGGCGAA
 CTGGAAATTACCGATATTAACCGTATTTATATGGAGCAGGGACGTTTGTCTGTGCTATGATGGGGCGTGGTTAT
 GCCTGGTTGGTACTGGTACACATCAAAGTCTTATTGAAGCAAGTAACTTCATTGCCACCATTGAAGAGCGTCAAG
 GGATTAAGGTATCTTGGCCGGAAGAGATTGCTTACCCTAAAGGGTTTATTGATGCTGAGCAGGTGAAAGTATTA
 CCGGAACCGCTGAAGAAAATGATTATGGTCAAGTATCTGCTAAAAATGATTAAGGTTATTAATAAAATGAACGTA
 AATTAACCTGAAATTCCTGATGTGCTGATTTTTGAACCAAAAAGTTTTGGTGATGAACGTGGCTTCTTTTTTGA
 GAGTTTTAACAGAAAGTATTTGAAGAAGCTGTAGGACGGAAGGTTGAATTTGTTTGGGATAACCATTCTAAGTC
 TAAAATAAATGATTGCGTGGGATGCATTATCAAACACAAAATACTCAAGGAAAACCTGGTTCGGGTAATTTCTGG
 TTCAGTATATGATGTTGCCGTAGATTTAAGAGAAAATCAAAGACATTTGGCAAATGGGTGGGTGTAGAATATC
 TGGGAATAATAAAGACAATTTGGGATCCCCGAAGTTTTGCCCATGGTTTTTATGTGTTGGAGGAGAATACCGA
 ATTTGTTTATAAATGTACCGATACTTATAACCCTGCTCATGAACACACATGCTATGGAATGATCCAACATCAA
 TATAAGTTGGCCAATCATACAAAACTGCAAGCCAATTTATTTCTGAAAAGATGCTAATGGACATCTTTTTTCA
 TAAAACCTATTTCTGAAATGCAATATTATGAGTTTAAATAGAAAACGTTTCTATAAATATGCTGGTTTTGCTGTG
 CCGACATTAGTTGCAGTCCCTGCTTTGGGATTCTTGGCAGGCTGCTTGGACCGGAGAATTTTGGACTTTTCA
 CTAGCATTCGCTTTGATAGGATATGCAAGTATTTTCGACGCCGGGATTAGTCGAGCTGTAATCAGAGAAATCGCT
 CTTTATCGAGAAAGTAAAAAGAGCAAATACAAATTTTTCGACAGCAAGTGAATCGTACTATTTTAGGGGTG
 GTTGCAGCTTTGTTACTTTATTTTAGTAGTAATAAAGTTGTTGAGTTATGAAATGTTAGTTCCGTTTATATTGAA
 ACAGCAGTGGCTGCATTTCTGTTATTTCAATTTATAAATACCTGTGTATCTGATTAACAGATTTGGCTGGTTAT
 CTGGAAGGGCTAGAAAAATTTGCAAATATAAATGTTTTCAGAGAATGATTTCTAGCACAAGCTTGGCTATATTACA
 GTGATATTTGTTATTACAATCCCTCGTTGCTTTATGCTATGATGGGTTGGTGGTGGGCGTGTGATTTCAATTT
 TTGATTAGCGCAATAAATTTGTCGAGATATTATTCTTAAAAGTAACTTTACTTTAATGTGGCAACTTGAATCGT
 CTTATCTCTTTTGGTGGATGGATAACAGTTAGTAATATCATAAGCCCAATCATGGCATATTTGACCGCTTTATC
 ATCTCTCATATTTGGGGGCTTCGAGAATTGCATTTTATACAGCGCCCTCAGAGGGTGTATCAAGGTTAATTAAT
 ATCCCATATGCTTTGGCAAGAGCTCTATTTCTAAATTTGGCATATAGCAATAATGATGATGAACGAAAAAATTA
 CAACCTACAGAGCTACGAATATAAGCATTGTATGCTTACCATAGTTGTTATTTGGTGCATTTTTTGCCTCATTC
 ATAATGACAACATGGATGGGACCTGATTATGCCTTAGAAGCAGCAACTATCATGAAAATACTTCTTGGCTGGTTTT
 TTCTTTAACTCTTTAGCGCAAATACCTTATGCATACTTGAATCTATCGGAAAGTCAAAAATACCGCATTTTGTG

CATCTCATAGAACTTGC GCCACTTATTATTATTGTATTACTTCCAAATGCATTTCCGCCATAATTGGCACGGCA
ATCGCTTGGTCACTTAGAACATTTTGTGATTTTGTATACTACTTTTCGATATCGAGAAGAAAATGATTGCGGTTG
ATATTGGCGTCTCAACCTACAATGGTGTAAATTTTATTCGGCAACAGATTGAATCTATCCAGAAACAACTTATA
GAAATGGCGTCTTATAATAAGTGATGATAAATCGAGTGATGATACTGTTGATATTATTAAGGATATGATGCTA
ACGACAGTCGTATCTATTTGGTAGGAAATAAAAGACAAGGAGGGTTATTGAGAACTTAAATATGCTCTTTCAC
AAACTACATCTGAAATTTGTACTATGTGACCAGGATGACATTTGGCCGGAGGAGCGTCTGGAAATTTCTATAG
ATAAATTAAGGCCTTGCAGCGTAATGATTTTGTCCGGCAATGATGTTACTGATTTGAAATTAGTAGACGAAA
ATAATGTTTGGATTGCAGAAAAGTTTTTATCGAACGAATAATATTAATCCACAAGATAATCTGAAAAATAATAATC
TTCTCTGGCGTTCAACGGTATATGGCTGTACTTGCATCATGAATAAGAACTTGTGATATTGCATTTGCCTATAC
CTACATATGCACATATGCATGATCAATGGTTGGCATTATTAGCGAAGCAATATGGTAACATTTTTTATTTCGACT
ATGCGTCTGTTTCGTTATAGGCAACATTCTACAAATGTTGTTGGTGGTAGAAAATAAACGCCATTTCAAATAATTA
ATTCACATACAAAAAACCTAAAAAGGATTAATTTGCTAGTGGATAGAACTGTTGCTTTAATTAATCAAATAACG
ATTTCTATCCAGGGAAATAAATGGAAAATAAATTTGATTACTTAAAATTTGGAGTGAATGAAGTATTACCTTATC
TTTTTAAAGGAAACAAGAAAGTTTTTTCATTTTGTGATTAATTAGTTTGGCATTACAAAATGATATATTTATT
ATTTTTTTTTGCACTGTTTATGATCTGTACGTTTTTAAACACACAGGCGACAGGCATTATATGTTGTATCTGCGTT
AGTATTTCTTTTTTGGCTTTAACCTATCCATCAGGAGGGGACTGGATAGGTTATTTTCTCCATTATGACTGCAT
GGTTAATGAGCAGTGAATAATGGTTTTATAATGTTTTGAACCTGGATATGAATTAATTTGTTTTCTTTATTTGGATA
TTTTGGGATTTGAGACAATTATTATTTTTATAGCCGCTGTAATGTAATTTCTAATATTAATTTTTGCAAAGCATTT
TGAAAACGGAAGTTTTGTTATTGTTGCGATAATGTGCATGTTCTTTGGAGTGTTTATGTTGAGGCGATTAGACA
GGCTCTGGCCTTATCTATAGTTATATTTGGGATTCACTCTTTTTTTGGGTAGAAAAAGGAAATTTATAACATT
AGTATTTATTTGCGTCACTTTCCATATAACTGCTTTGATTTGTTTTCTTCTAATGACTCCTCTATTTTCAAAGAA
ATTAAGCAAGATAAATAGTTATAGCCTATTAATTTCCAGTAGCTTCTTTTTCGCTTTTTCTGAAACCATATTAAG
TGCACCTCTTGAATTTTTGCCAGAAGGATCCATTGCCAGTGAAAAATTAAGTTTTTACTTAGCAACCGAGCAATA
CAGGCCACAGTTATCTATTTGGGAGTGGCACTATTCTTGACATTATACTTATTTTTCTGATATGTGTAAGTTTTAA
ACGAATAAAGAAATATATGCTCGCTAATATAATGCTGCAATGAGATATTGCTTATTTGGTTGCTGTCTTTATAT
TTCTTTCCGTTATTTTTATCGGGAAAATGATGCCAGTTATGACTCGCATTTGGTTGGTATGTTTTCCATTTGTTAT
AGTACTTCTTTATATTAACCTTGGGTTATTTAGAAATTTTTAAGAGGTATATAAATAAAGAGGGTGTGGGTATAG
CAAATTTAATGCTTTTTATTTTTTGTACAAATTTTGGACCATTAAACATATGATTATAGCTATTTATAATAT
AATGCACCAGGATATTTGCTGAATAGGTTTATGATGATTAGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
ATGTTTCGATTTGGGAAAGATAGGATATGGTTTTCTTATGTAGTATATAATATCCTGCATTCATTCGGATAATTTT
CTATGGAAGTGTCTTTGCTCTGTCTGTCTCTCATTTGTTGAAATTTTATGTTAATAAGAAGCTTTAGATAACCAC
TTAGGAACTGTATGTTTGTCTGTCCAAAATTTATATTTGTAAGTGGACGGCGCTGGCTTCCGGAGGTGCAT
TAACTATATTAAGCAATTTATAAAACATGCATCACAAAATTTCAAATGACTATATTTATGTTTGTATCTGCGGGAT
TGGAGTTGCCGGTCTGTGATAACATCATTTACATAGAAAACACACAAAAGGATGGTTGAAAAGAATATATTTGGG
ATTTGTTCCGTTGCTGGAAAGTTTTATCTCGAACATAAGATTAACGTTAAGAAAGTAATTTCTCTACAAAATTTCA
GTTTTGAATGTTCTTACGAACAGATTTTACTTGCACAGCAATTTCCCTTTTAGTAAAGTTGATTTTTTTTAA
AAAATATCACATCCGATAACGTAAGCTTTTTTTATATAAAAAGTTTTATTTCTATTTTATATTTAAATATGTGA
ATGCCAATACAACCATCTAGTGCAAACGAATTTGGATGAAAAAGGAGTGTGGAGCAATGTGATAAAATTAGTA
CCGAAAGGGTCTTGTATATAAAACCTGATATCAAAGCATTTAATAATACTAATTTTGTAGTATGATATGGATGAT
CTGCAAAAACACTCTTATATCCAGCGACACCACTTACCTATAAAAATCATTTGGTCATTCTGAAGGCGTTGGTTA
TTTTAAAGAAAAGTATTTATAGATGATCTGAAATTTCCAAGTACTTTTGAAGAATAGGTACAAAATTTTGA
ATAAGTTTGTGCAATTAATAAATACTTAAGCAAAAACGTTGATATCTCGGCGTTCTTTTCACTCGAAGTGCAAA
AAAAATATATGGCGGCATCTTTAATCGTTTTTCTAGCTATATCGAATCATATGGGTTACCACTCATCGAAGCTG
CTAGTTTAGGAAAAAAATCATTAGTAGTGATCTTCTTATGCCCCGGGATGTTTTAAAGGATTATAGCGGCGTAG
ATTTTGTAAATTTACAATAATGAAGATGGCTGGGCTAAGGCGTTGTTTTAATGTTTTAAATGGCAATTCGAAGCTCA
ATTTTAGGCCTTATGAAAAAGATAGTCGTTTCTTGGCCACAGTTCTTCTCTATTTTGAATAAGGTGATTTAT
GTTTTAATGGTAAAATATTTGTTAATTACTGGTGGTACGGGGTCTTTTCGGTAATGCTGTTCTAAGACGTTTTCTTGA
CACTGATATCAAAGAAATACGTATTTTTTCCCGGATGAAAAAAAACAAGATGACATGAGGAAAAAATAAATAA
TCCGAAACTTAAGTTCTATATAGGTGATGTTTCGCGACTATTTCGAGTATCCTCAATGCTTCTCGAGGTGTTGATTT
TATTTATCATGCTGCAGCTCTGAAGCAAGTACCTTCTGCGAATTCACCCAATGGAAGCTGTAAAAACGAATGT
TTTAGGTACGGAAAACGTAAGGAGCGCAATAGCTAATGGAGTTAGGCGAATTTGATGTTTGGAGTACAGATAA
AGCTGTATATCCTATCAATGCAATGGGATTTTCAAAGCGATGATGGAAAAAGTAATGGTAGCAAAATCGCGCAA
TGTTGACTGCTCTAAAACGGTATTTGCGGTACACGTTATGGCAATGTAATGGCATCTCGTGGTTACGTTATCCC
ATTATTTGTGCTGATTAATCAGGTAGACCAATGACGATAACAGACCCTAATATGACTCGTTTTCATGATGAC
TCTCGAAGACGCTGTTGATTTGGTTCTTTACGCAATTTGAACATGGCAATAATGGTATATTTTTGTCCAAAAGGC
ACCTGCGGCTACCATCGAAACGTTGGCTATTGCACTCAAAGAATTACTTAATGTAACCAACACCCTGTAAATAT
AATCGGCACCCGACACGGGAAAAACTGTACGAAGCGTTATTGAGCCGAGAGGAAATGATTGCAGCGGAGGATAT
GGGTGATTTATCTGTTCCACCAGATCTCCGCGATTTGAACTATGGAAAATATGTGGAACATGGTGACCGTCCG
TATCTCGGAAGTGAAGATTATAACTCTCATAATACTGATAGGTTAGATGTTGAGGGAATGAAAAAATTAAGTCT
AAAACCTCTTTTATCCGGGCACCTTCCGTTCTGGTGAAGATTATGAGTTGGATTGATAATATGAAAATTTTAGTTA

CTGGCGCTGCAGGGTTTTATCGGTGAAATTTGGTATTCGGGCTTAAGGAAGCTGGATATAACGAACTCATTACGA
TAGATCGTAACTCTTCTTTGGCGGATTTAGAGCAGGGACTTAAGCAGGCAGATTTTATTTTTACCTTGCTGGGG
TAAATCGTCCCGTGAAGGAGTGTGAATTTGAAGAGGGAAATAGTAATCTAACTCAACAGATTGTTGATATCCTGA
AAAAAACAAATAAAAACTCCTATCATGCTGAGTTCTTCCATCCAGGCTGAATGTGATAACGCTTATGGAAAGA
GTAAAGCAGCTGCGGAAAAAATCATTGAGCAGTATGGGAAACGACAAAACGCTAAATATTATATTTATCGCTTGC
CGAATGTATTCGGTAAGTGGTGTGACCAAATTTATACTCCTTTATAGCAACTTTCTGCCATCGCATTGCAAATG
ATGAAGCTATTACAATTAATGATCCTTCAGCAGTTGTAATCTGGTGTATATAGATGACTTTTTGTTCTGACATAT
TAAAGCTATTAGAAGGAGCGAACGAACTGGTTACAGGACATTTGGTCCAATTTATTTCTGTTACTGTTGGTGAAG
TGGCACAAATTAATTTACCGGTTTAAAGAAAGTCGCCAAACATTAATCACCGAAGATGTAGGTAATGGATTTACAC
GTGCATTGTACTCAACATGGTTAAGTTACCTGTCTCCTGAACAGTTTGCATACCGGTTCTTCTTATAGTGATG
ACAGAGGGGTATTCTGTGAAGTATTGAAAACGAAAACGCGGGCCAGTTTTCTGTTCTTTACTGCGCATCCAGGAA
TTACTCGGGGTGGTCATTATCATCATTCCAAAATGAGAAATTTATTGTGATCCGAGGAAGTGTCTGTTTCAAAT
TTGAAAATATTGTGACGAGTGAACGATATGAACTTAATGTTTCTCTGATGATTTTAAAATGTTTGAACAGTTC
CGGATGGACGCATAACATTAATAAATGGCTCGGATGAGCTAGTTGTTATGCTTTGGGCAAATGAAATATTTA
ATCGTCTGAACAGATACTATAGCGAGAGTTTTATCGTGAAAAAATGAAAGTCATGTCCGTTGTTGGGACTCG
TCCAGAAATTTATTCGACTCTCGCGTGTCTTGCAAAATTAGATGAATATTGTGACCACCTTATTGTTTCATACCGG
GCAAACTACGATTATGAACTGAATGAAGTTTTTTTTCAAAGATTTGGGTGTTCCGAAACCTGATTATTTCTTAA
TGCCGCGAGTAAAAATGCAGCAGAGACTATTGGACAAGTTATCATTTAAAGTTGATGAGGTCCTTGAAACAGGAAA
ACCAGAAGCCATGTTAGTACTTGGCGATACTAACTCCTGTATTTGAGCAATACCAGCAAAGCGTCGGAAGAAATCC
GATCTTCCATATGGAGGCTGGGAATCGTTGTTTTGACCAACGCGTACCAGGAAGAACTAACAGAAAAATAGTTGA
TCATACCGCTGATATCAATATGACATATAGTGATATCGCGCGTGAATATCTTCTGGCTGAAGGTACACAGCCCGA
TAGAATTTATAAAACCGGTAGCCCAATGTTTGAAGTACTCACTCATTATATGCGCGAGATTGATGGTCCGATGT
ACTTTCTCGCTGAATTTAACACCTGGGAATTTCTTTGTGGTAAGTGCCACAGAGAAGAAAATGTTGATACCCC
TAAACAACCTGTGAAACTGGCGAATATACTTAATACCGTGGCTGAAAAATATGATGTCCCGGTAGTTGTTTCTAC
TCATCCTCGCACTCGTAACCGCATCAACGAAAACGGTATTCAATTCATAAAAAATATCTTGCTTCTTAAAGCCATT
AGGATTTACAGATTACAACCATCTGCAAAAAATGCACGTGCTGTTTTATCGGATAGTGGGACTATTACAGAAGA
GTCTCCATTATGAACCTCCCTGCACCTCAATATACGAGAAGCGCACGAACGCCCGGAGGCTTCGAAGAAGGGCG
AGTAATGATGGTCCGCTTGAATCTGATCGCGTTTTACAGGCATTAGAAATATTGCAACACAGCCTCGTGGAGA
AGTACGCTTACTTCGTGAGGTTAGTGACTATAGCATGCCAAATGTTTCAAGATAAAGTTCTGCGTATTATCCATTC
ATATACTGACTACGTTAAACGGGTTGTCTGGAAGCAATACTAATGAACTTGCATTAATCATTGATGATTATTTG
CCCCATAGCACACGCGTTGGGGCTAAAATGTTTTCATGAGTTAGGCCTTGAATTACTGAGCAGAGGCCATGATGTA
ACTGTAATTACGCCTGACATCTCATTACAAGCAATTTATCTATTAGTATGATTGATGGTATAAAGGTTTGGCGCT
TTCAAAGTGGACCTTTAAAGGATGTAGGTAAGGCTAAACGTGCCATAAATGAAACTCTTTTACTTTTCGCGCA
TGGCGCGCATTTAAGCACCTCATTCAACATGATACATTTGATGGTATCGTTTTATTATTTCCCCCTCTATTTTTTG
GGCGACTTGGTTAAAAAATAAAACAACGATGCCAGTGCCCAAGCTATCTGATCCTAAGGGATATGTTTCCACAG
TGGGTCAATGATGACAGGTATGTTGAAAGCGGTTCCACCAATGAAAAATATTTTAGGTATTTGAAAAAAGTCA
TATCAGCAGGCTGGCCGGATAGGGGTAATGTCTGATAAGAATCTTGAGATATTTCCGCCAGACCAATAAAGGTTAT
CCGTGTGAAGTTTTACGTAATTTGGCCCTCAATGACTCCTGTGTCTGCCAGCGATGATTATCATTCACTTCGTCAA
AAATACGATCTAAAAGATAAAGTCATTTTTTTCTATTGGCGGTAATATTGGGCATGCTCAGGATATGGCAAACCTTA
ATGCGCCTTGCAGCAATATGATGCGTTATCATGATGCTCATTTCCTGTTTATAGGGCAGGGTGTGAAGTTGAG
CTGATAAAATCTCTTGCTGCAGAATGGAATTTAACTAATTTCACTCATCTACCTTCAGTGAACCAGGAAGAGTTT
AAATTAATTTTATCTGAAGTTGATGTGCGCCTGTTCTCCCTTTCATCTCGCCATTCTTCACATAATTTCCCGGA
AAATTACTAGGGTATATGGTTCAATCAATCCCGATCCTTGGGAGTGTGAATGGCGGCAATGATTTAATGGATGTA
ATTAATAAGCACAGAGCCGGTTTCAATCATGTTAATGGTGAAGATGATAAACTGTTTGAATCTGCACAATTGCTT
CTTAGTGATTCAGTTTTTAAAGAAACAGCTAGGTGAGAACGCTAATGTGTTGTTAAAGTCTCAATTTTCGGTTGAA
TCGGCGGCACATACTATCGAAGTCCGACTGGAGGCTGGAGAATGCGTTTTAGTTGATGACAATATTTCTGGATGAAC
TTTTTTCGCACTGCAGCAAATTTCTGAACGTTTGCAGCCTCATTATTTATTTGCACGCATCTCATCAGGAGAAGGTTT
AACGTTTACTTATTGCATTTGTACGCGACAGCTATGTTGAACCCCATGGCATGAGTTACCGCATCAGTGGGAAA
TGTTTGTGTCATGCAAGGGCAATTAGAAGTTTGTGTTGATGAGCAAATGGTGAAGATCCAAAACAGTTTGTG
TTGGAGACGGTACGGGAATAAGCGTCTGGAATTTTCCCAGGAGATATACATAGTGTCAAATGCCGTGTACCCAA
AAGCCCTTATGTTGGAGATAAAGGAGGGGCCATTTGACCCACTCAAAGCTAAGGCTTTTTCTAAGTGGTTATAGG
GCGATACACCACCGTTTTATCTTCTATCTTATTCTATACATGCTGGGTTACCATCTTAGCTTCTTCAAGCCGCGC
AACCCCGCGGTGACCACCCCTGACAGGAGTAGCTAGCATTTGACCACCCCTGACAGGATTAGCTAGCATATGAGC
TCGAGGATATCTACTGTGGTACCCGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACCTTCTAGAGA
ATAGGAACCTCGGAATAGGAACSTAAGGAGGATATTCATAT

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
AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAA
GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGTCAAAAACCACTTCGACACCTTTATGAGTTAGAATCA
CTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAACTACAGTCCATCTGTCCGCGGGCGTACCATTATG
AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGGACCTGCCATTGGTGACAACCCCA
TTTGTGCGTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGTGCCATG
ATTGCACGTTTCAACGAAACGGGCCGACCCAGGTGCTGGCAAAACCTATGCCGGTGGACCTCTCTGAATACTCC
GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGAT
CAGCCGACAGCGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTGCGTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAACGTG
GAACGTAACCTCAGCTATAGGCATGCATGCAGTGTCTGTGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCCTGCATTAATAC
GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTCGCGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG
TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCGTTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA
TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAATAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAA
TCTTCTGCCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA
GGATTTTCTTGTTCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA
ACGCTCGTCACATCATAGGCATGCATGCAGTGTCTGTGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCCTGCATTAATAC
CTCTATTAATCAAACCTGAGAGCCGCTTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGCTAGCGTG
AAGATACTTGTACTAGGGGCGCAGGATTTATTGGTCTGCTGTAGTTCGTACATTATAAATAATACGCAGGAT
AGTGTGTTAATGTGATAAATTAACGTACGCCGAAACCTGGAATCACTTGTGATGTTTTCTGACTCTGAACGC
TATGTTTTTGAACATGCGGATATTTGCCGATGCTGCTGCAATGGCGCGGATTTTTGCTCAGCATCAGCCGGATGCA
GTGATGCACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTGGATCGTTCAATTACAGGCCCTGCCGCAATTTATTGAAACCAATATT
GTTGGTACTTATGTCTTTTGGAAAGCGGCTCGCAATTAAGTCTGGTCTGCTCTTGTGATGGCGACAAGAAAAATAGCTTC
CGTTTTTCATCATATTTCTACTGACGAAGTCTATGGTGAATTTGCCCTATCCTGACGAAGTAAATAAAGAAACAA
TTACCCCTCTTACTGAGACGACAGCTTACGCGCCTAGTAGTCTTATTCGCATCAAAGCATCCAGCGATCAT
TTAGTCCGCGCGTGGAAACGTACCTATGGTTACCGACTATTTGTGACTAACTGTTGGAATAACTACGGTCTTTAT
CACTTTCCGGAAAAATGATTCACACTAGTAATTTCTTAATGCTGGAAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAA
GGGGATCAAATTCGTACTGGCTGTATGTTGAAGATCATGCGCGTGCCTTATATACCGTAGTTACTGAAGGTCAA
GCGGGTGAACCTATAACATTTGGCGGACACAACGAAAAAGAAAAACATCGATGTTGTGCTGACTATTTGTGATTTG
TTGGACGAGATAGTCCCAGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAAATTAATTTATGTTGCTGATCGCCAGGGCATGAT
CGCCGTTATGCGATTGATGCTGAGAAGATTGGTTCGCGAATTTGGGATGAAACCACAGGAAACGTTTGGAGTGGG
ATTCGTAACCGGTGGAATGGTATTTGGCTAATGCAAAATGGGTTGATAATGTGAAAGTGGTGCCTATCAATCG
TGGATTGAACAGAACTATGAGGGCCGCCAGTAATGAATATCCTCCTTTTTGGCAAAACAGGGCAGGTAGGTTGGG
AACTACAGCGTGTCTGGCACCTCTGGTAATTTGATTTGCTCTTGTGATTTCACTCCACTGATTACTGTGGTGAT
TTAGTAACCTGGAAGGTGTGGCTGAAACAGTCAAAAGAAATTCGACCTGATGTTATTGTTAATGCTGCGGCTCACA
CCGCAGTAGATAAGGCTGAGTCAGAACCAGAAATTTGCACAATTAATCAATGCGACTAGCGTTGAATCAATTTGCAA
AAGCGGCAAAATGAAGTTGGGGCTTTGGGTAATTCATTACTCACTGACTACGTATTCCTGGAAATGGCGACACGC
CATGGCTGGAGATGGATGCAACCGCACCGCTAAATGTTTACGGTGAACCAAGTTAGCTGGAGAAAAAGCATTAC
AAGAGCATTGTGCGAAGCACCTAATTTCCGTACCAGCTGGGTCTATGCAGGTAAGGAAATAATTTCCGCAAAA
CGATGTTGCGTCTGGCAAAAGAGCGTGAAGAAGTACCGCTTATTAATGATCAGTTTGGTGCGCCAACAGGTGCTG
AACTGCTGGCTGATTTGACGGCACATGCCATTCGTGTGCGACTGAATAAACCGGATGTCGAGGCTGTACCATT
TGGTAGCCAGTGGTACCACAACCTGGTACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAATGCAGGCATTC
CTCTTGCACTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAACAACCTGCCTATCCTACACCAGCTCGTCCACATAACTCTC
GCCTTAATACAGAAAAATTTACAGCAGAAATTTGCGCTTGTATTGCCCTGACTGGCAGGTTGGTGTGAAACGCATGC
TCAACGAATTTATACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTGATGGTGGAGCAAGATGAATTA
AAAGGAATGATGAAATGAAAACGCGTAAAGGTATTTATTTAGCGGGTGGTCTGGTACTCGTCTTTATCCTGTGA
CTATGGTTCGTGAGTAAACAGCTATTACCTATATATGATAAACCGATGATCTATTATCCGCTTTCTACACTGATGT
TAGCGGGTATTCGCGATATTTGATTTATGATACGCCACAGGATACTCCTCGTTTTCAACAACCTGCTGGGTGACG
GTAGCCAGTGGGGCTGAATCTTCAGTACAAAGTGAACCGAGTCCGGATGGTCTTGGCGAGGCATTTATTATCG
GTGAAGAGTTTATTTGGTGGTGTGATTTGTGCTTTGGTACTTGGTGATAATATCTTCTACGGTACGACCTGCCTA
AGTTAATGGATGCCGCTGTTAACAAGAAAGTGGTGAACCGGATTTGCCTATCACGTTAATGATCCTGAACGCT
ATGGTGTGCTTGTGATTTGATAAAAACGGTACGGCGATCAGCCTGGAAGAAAAACCGCTACAACCAAAAAGTAAT
ATGCGGTAACCGGGCTTTATTTTTATGATAACGACGTTGTCGAAATGGCGAAAAATCTTAAGCCTTCTGCCCGG
GTGAACTGGAATACCGATATTAACCGTATCTATATGGAACAAGGGCGTTTATCTGTTGCCATGATGGGGCGTG
GTTATGCGTGGTTAGACACGGGACACATCAGAGCCTGATTGAGGCAAGCAACTTTATTGCAACAATTAAGAGC
GTCAGGGGCTGAAAGTTTTCTGCCCGGAAGAAATGCTTACCGTAAAGGGTTTTGTTGATGCTGAGCAGGTGAAAG
TATTAGCTGAACCTCTGAAAAAATGCTTATGGTCAGTATCTGCTGAAATGATTAAGGTTATTAATAAATG

AACGTAATTA AAAACAGAAATTCCTGATG TACTGATTTTTGAACCGAAAGTTTTTGGTGATGAGCGTGGTTTTCTTT
TTTTGAGAGCTTTAACCAGAAGGTTTTTGGAGGAGCTGTAGGCCGCAAAGTTGAATTTGTTTCAGGATAACCATTCG
AAGTCTAGTAAAGGTGTTTTACGCGGGCTGCATTATCAGTTGGAACCTTATGCACAAGGAAAATGGTGCCTTGC
GTTGTCGGTGAAGTTTTGACGTAGCTGTTGATATTCTGTAATCGTAAATCGTCATCGACTTTTTGGCAAATGGGTTGGGTG
AATTTATCTGCTGAGAATAAGCGGCAATTTGGGATTCCTGAGGGATTTGCACATGGTTTTTTAGTGCTGAGTGAG
ACGGCGGAGTTTTTGTATAAGACGACAAAATTATTATCATCCTCAGAGTGATAGAGGAATAAAAATGGGATGATCCA
AGCATCAATATTTTCATGGCCAGTCGATTCACAAGTGTCTATCAGCTAAAGATAATAAGCATCCTCCATTAACA
AAGATGAAATGTATAGTTAAGATCACGATAAATCTTGAAGGGTTGCAAAAATGAATAAAATAGTGAGCAAAAG
TGAATAAGGAACGTAATCCACAATGCTGGCTATATGATGATTACTCAGATAGCTTTATATGTTGCACCATTATT
TATACTGAGTTATCTGTTAAAAACACTGGGGTTGCACAGTTTGGTAATTTATGCCTTAATACTATCAATCGTTGC
ATATTTACAGATTATAACGGATTATGGTTTTCTTTTTGCAAGTGTGCGATCTCACAGAATAGAGAGGACAA
AGAATATATATCAAAAATTTATCTGTCAACTATGACTATCAAGTTGGCGATATGCGCTTTCTTATTCTTATTGCT
CATGCTATTTTTAAATCTTTTGCCTGTGCAAGCTGAATTAACAAGGAATATTATATGGATATCTTCTTGTAAAT
AGGAAATACTTTCCAACCACAATGGTTTTTCCAAGGTATCGAAAAATTA AAAATCATAGCCCTTTCTAATGTTAT
ATCAAGATGCGCCGGTGTTTACTTTGATTTATCTATGTGAGGAATAGCGAGGATTTACAAAAGCACTTTTGTAGT
ACAGTCACTTCCATTAGTAATTTCTGCGATTGGATTAATATATTTATATTTGAAATATATCAATATTTTTC
GGAAAAAATTTTAAAGGTAATTTAAAAGAAGGTAAGGATTTTTTTCTTGCATCACTTTATTCTGTTATTCT
CAATAATAGTGGCATTTTCTATTAGGGATTTTTACTAATCCTGTTATTGTTGGTGTATATGCCCGCGTGA AAA
GATAGTCAAGGCCGTATTGTGCTATTACACCCTGACGCAAGCTATATATCCTTATAAATTTGTCGTAAGTTTTCT
ACTATCCGATTTTACGCGCATTGAGGCAGCAAAAAAACTGGTATACCAATATAAATTTTAGCATTTATAGCTGC
TGTATATCGTTGCAATTACCTTACCTGTTGCAATCGACTATCTTAATTTTCCAAAAGAAACAAATTTTGTAGTCA
AATATTAAGTGCATGGATCTTTTTTGGTGTCTTAATAATGTATTCGGCATTCAGATATTTGAGTGCATCAGGAAG
AAGTAAAAATATATAGTAGGATGGTATTCGTATCAGCGCTTATAACATTACTTTTGATTACTCTATTATTGCAGTT
TTGTAACGCCACTGGATGGCATGTGCAATATTTGGGTGAAATGTTCTTATCAATATTTTACTTAAGCGATA
TAAAAAATAATTTAAGGAATAGTTATGAAGAAGTTATTTATAGTGTTCGGTACTAGGCCGAAGCAATAAAGAT
GGCCTCTATCATTTGAATTTAAAAAAGATTGTAGATTCGAATATAAAAATATGTGTGACAGGCCAACATAAAGA
GATGCTTGATCAAGTTATGCAAGTATTTGATGTTAAACCTGATTATAATTTACGGATTATGCAGCCTGGGCAAC
ATTAGTATCTATAGCAACAAATATACTCTCACGGTTAAGTGAAGTTTTAATATAGAAAAGCCAGATATTATACT
TGTGCATGGGGATACAACGACTACCCTTGGCTGCTACTTTAGCTGGGTATTACCACCAATAAAAAGTTTTGTCATGT
GGAAGCAGGATTAAGAACAGGGGATTTACTCTCCTTGGCCTGAAGAGGGCAATCGTAAAGTTACAGGGGCATT
AGCATGATTTCAATTCGCCCAACAGAGAGATCAAAAGATAATCTCCTGAGGGAGGGGTCAAAGTAAATAATAT
ATTTGTAACGGTAATACCGTCATCGACTCTTTATTTTATGCAAAAGATATCATAGATAATGACCCTAATATAAA
GAACGCTTTACATAATAAATTTAATTTCTTGATAAAAAGCCGACGAGTAGTACTTATAACAGGTCATCGAAGAGA
AAATTTCCGGAAAGGTTTTGAAGATATATGCTTTGCAATAAAGGAATTAGCTTTTCAATTTATCCTAATGTAGATTT
TATTTATCCGGTGCATCTTAATCCCAATGTAATGGAACCAGTACATCGTATATTAGATAATATATGTAATATTTA
CCTTATTGAGCCCTGGATTATTTGCCTTTTGTATTTAATGAATGAGTCATATTTAATATTGACTGATTCAGG
GGGGATACAAGAAGAAGCGCCTTCGTTAGGTAACCCTGTTTTGGTTATCGGTGATACTACTGAACGCCCTGAGGC
GTTGAGGCTGGTACTGTTGTATTAGTGGGACTTCTAAGATAAAAATAGTAAATAAAGTAAACGGAGCTATTAAA
CAATGCTGATATCTACAATGCTATGTCCTGTTACATAATCCATATGGCGATGGAACAGCTGCTCAAAAAATCT
TAATGTGCTCGCCCAAGAGCTAATTTAATTTAAGCTAAAAATATGTTATTAATTTATTGCTGATTATCCAACGAA
ATGAATATGCGCGAGGAGCTATGCAACGAATAGATGCGATAGACTCTCTCATTGAGATCGCAAGCGAGTGTAT
TTGAATATTTCAATCAAAAAGCATCTAGTTGCGCTCAAATAGTTTCTTTAATAATGTTATAGTTGAAAATCTAAT
GCAATTATTCACAGAAACATCATAAAACAGTACATGCAAAAATCAACAATATATATGTTCAATCTGTTTATAAT
TTATTAAGGTTATAACGCTCATTGATCTAAAAAACAATTTCTTGATATACATGGTGTGTACCGGAAGAAGCTT
TTGGCAGATAATAAAAAATTAAGTAAAGTATATAACATGGTGGAAAAAAGGTTGCTTGGATGCAAAAA
TTAATACACGTCAGTACAGAAATGCAAAAACACTATGAAGCAAAATATGGAGTAAACTTGGCTGAAAGGTCAATA
GTGCTCCCGATTTTTGAATATAAAAATATAACCCAATCGCAAAACAAATGGACAGAAAATAAAATACGAAGTATC
TATCTTGGAGGATTACAAACATGGCAAAATATTGATAAAATGATTCAAGTTTGTGATGACACAGTGATAAACAA
GAAGCAGGTAAGTATGAATTTCACTTTTTCATCCCACAGAGTAACTTGGAAAGGTTTTATAGATAAATATTCGTTA
AAATACATAATATCAATGCTAATGCATCTACGCTATCACGTGATGAAGTAATTCCTTTCTAAAAGAATGTCAT
ATTGGTTTTGTATTGCGCGATGATATAATAGTAAACAGAGTTGCGTGCCCTACAAAATGGTTGAATATTTAGAG
TGTGGTGTGTTCCAGTTGTGCTCTCCCACCTATAGTGATTTTTTATTCGATGGGATATCAATACATTACTACA
GAGGAAATGGCTAACAGAAGTATAAGTTTGTGGATCTTGA AAAATGGCTGCACATAATTTACAAATTTTACT
TCTTATCAGAAGAGAACTACAAGGCACAGAAAGAACTTATTGCTCAACTGTGCTGAATTTTTTACATATATAAA
ATTATGTAAGCATATCGCGGGTCAGGTAATTTGATGCGTATCAAATATAAAGATAACGGTTATATATTATGTTTT
CTATTATGTTTCATTTGAGCTACTTAGTTTTACTCAAATCTGACTACTTTCTGCTGATTTTCTGCCATATACA
GAAATATACGATGGGACATACGGAGAAATCAATAATATTGAGCCTGCCTTTTTATATTTAACACGGTTGTTTCAT
TATTTAAATTTCCCTATATATTTTTTGCAATGTTAGTTTGTGCCTTATGTTAAGTTGAAAAATAAATATGCA
AGAAAAATAATTAAGATAGTTATATATATTTGTTCTGTATGATATGATCATTATTTATGTTTTTGCATGAA
ATGACTCAATTGCGCATAGCAATTGCAGTCACTATGTGCTATGTGTCGGTTTTATTATTACTTTTATAAAAATTTGT

ATTAACATGCACTGCCATGGATGGTGTGGCTATTTTGTTCATTACAGCGCCTTGCTTTTATTTATGTCATTA
 TTTATATACAGTTATAGGAGGTTATTAATAGTAATTAAGGGTTTGTAAATATGTATGAGCTTTTTAAACGTGTAT
 GCAGATACAATTGCACATATATTTGCCAATGAAAAAATAGTAAATTTATATATAGTAAATCATCATCATAGAC
 AATAGAATGATTTGGCAATATTCAACCTGAATAATATAATATTTTTTATCAATATTTATTTTGATCTTTATCTT
 AGCCGATATATAAAATTAATGATAATGAGGCGAAGTTTATTAAGTATGTGCAATGTTGAGGAATATTAGCCTTT
 TGTATTTCTTTCTGGCTAGTGGAGTCCCGGTGCTTATCGAAGTGCAGAGTTGCTGCGAATATTTTATCCG
 ATGGCTTAGTATTAATCCTTTTCGCATATAAAAAATAAATATGCGTTATTTTATTGCAAGTATTATAGTTATC
 CTTTCAGGCTTAATGTTGTTTATAACACTAAGGGCTGTATCAATAGTTGGTCAAGGATTATAAAATGAATGTTGC
 TATTTTGTGTCTACGTATAATGGCGAAAAATATTAGAGGAACAACCTGGATTGCTGCTTCAAAGTTATCA
 GGATTTGTAGTATATCCGTGATGACGGATCATCTGATAGAAGTAAATATAAATAAACCATAACGTAATGAA
 AGATAACAGATTTTAAACGTGGGTAATTCAGAAAATCTTGGTTGTGCTGCTTCGTTTATTAATTTATTAAGAAA
 TGCTTCAGCCGATATTTATATGTTTTGTGACCAAGATGATTATTGGCTTCCGAATAAATACAGCGTGTGTGGA
 TTATTTTTCGGCTATTGATCCTTTACAACCTACCTTGTATCATTGCGATCTAAGCGTTGTTGATGAAAACTTAA
 TATTATACAAAATTCATTTTTCAGCATCAGAAAATGTCAGCGTATGATTCAATGAGAAAAATAATCTTTTCAT
 ACAAATTTTGTGTTGGTTGTTTTCATGTGCTGTTAATGCTTCACTTTCGGAAATTTGTTCTTTTCGCGAATTTGAGA
 GCAGCATGTA AAAATGATAGCTATGCATGACTGGTGGTTAGCCGTGACTGCAAAAACCTTTTGGTTCGAAATCCATTT
 TGATAACTCAAACGATTTCTTTATCGACAACATCAGGGCAATGTATTAGGTGCAAAAATCATCAGGTATGATGCG
 TTTTATTCGATTAGGATTAATGGGCAAGGGATTTTCGCGAGTAGTATCTTTTAGAAAAAAGTTTGTGCGCAAAA
 TAAGCTTCTTTAGATGCTATGATAAAGATTTAAATCTTTCGCAAAAAAATCTATCAGGCTTGTAAATGAGGG
 CCTTAAAGAGAATCTTCAATGCTGACCTTTTAAATGTTTCTATCATGGTAGCTATATGCAAGGTTTTAAACG
 TAATCTTGCCTTAATATATTCAGTCTTTACACAAAAAAGAAGATAGTGTATCCTTATGAAAAAATGCTAT
 TATCGGTACTGTTGGCATACCAGCATCATATGGCGGATTTGAAACATTAAGTTGAAAATTTAACAAAGATACAATTC
 CTCGGGAGTTGAATATAATGTTTTTTGTTTTCATCGTTTTACTACAAATCCACCAAAAAAACATAATGGGGCCG
 TTTAATTTATATTCGCTTAAAGCCAATGGATGGCAGAGCATTGCGTATGACATAATTTGTTAGCATATTTCTAT
 TTTTTTGAAGCCTGATGTGATTCTGATTTTAGGGGTTTCTGGTTGTTTCAATTTTGCCTTCTTCAAACCTTTAAC
 ACGCGTAAAGTTTATTACTAATATTGATGGCCTGGAATGGCGAAGAGATAAATGGAATTCAAAAGTGAACGTTT
 CTTAAAATTTTCAGAAAAATCGCAGTTCAATATTCCGATGTCGTTATTACGGATAATGAGGCAATTTCTGAGTA
 CGTTTTTAAAGAGTATAAAGATAGCCGAGTTATTGCTATGGAGGGGATCATGCATGGTTAAATCTGAGGA
 TGTATTTACAACAAGAAATATAAAGCGATTACTACTCTTCTGTATGTCGATATCGAACCCGAAACAAATGTAGA
 ATTAATTTTAAAAACATTTTCAAAGCTAAAATATAAAAATAAATTTATTGGAAATTTGGAATGGCAGCGAGTTTGG
 AAAGAACTTAGGCTGCATTTTCTAACTATCCAAATATTGAAATGATTGATCCGATTTATGATCTTCAACAAT
 ATTTCACTTACGAAATAATGTCATAGGATATATACATGGTCATTGCGCTGGAGGAACAACCCCTTCTTTAGTCGA
 GGCAATGCATTTTAGTAAACCTATATTTGCATATGATTGTAAGTTTAAATAGGTACACTACTGAAAATGAAGCATG
 TTATTTTCTAATGAATCTGACCTCGCAGAGAAAATCATAATGCATTGTGAGCTATCATTAGGTGTCTCTGGCAC
 GAAAATGAAAAGAAATGCTAACCGAATAACACTTGGAGAGCAATAGCAGAAATGTATGAGGATTGCTATTAAC
 CTGTTAAACTTCAAATCTTTTACAATATATGGCATGACTATAAGCGCATTAATTTGTTTTTCAAGCCGCTCTCGCG
 GTGACCACCCCTGACAGGGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCTTATACTTTCTAGAGAAATAGGAA
 CTTTCGGAATAGGAATAGGAGGATATTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATA
 CTTTAAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTTCCAGGCCGCGAGCATTGAGCGCGGTGATCACACCTGAC
 AGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCCTCAACA
 TCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGAAGTATTGCGGAAATC
 CAGGCAAGAACTGGTTCTTACTATACGGTGAAAGAGTTTGTGCAATCTCTGGAACGCTCGTCGCATCCTGT
 TAATGGTGAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCA
 TCATTGATGGTGGTAACACCTTCTTCCAGGACACTATTGCTGTAATCGTGAGCTTTTCAGCAGAGGGCTTTAACT
 TCATCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAG
 AAGCCTATGAATGGTAGCACCGATCCTGACAAAATCGCCGCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCT
 ATATTGGTGGCAGGTGCTACTATGTGAAGATGGTTCAACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGA
 TTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCAACGAAGAATGGCCGACACTTTTACCGAGT
 GGAATAACGGTGAACCTGAGCAGTTACCTGATCGACATCACCAAGATATCTTACCAAAAAAGATGAAGACGGTA
 ACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACCGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGG
 ATCTCGCGAACCGCTGTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTTGACGTTATATCTCTTCTGAAAGATCAGCGTG
 TTGCCGATCTAAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGGCGACAAGGCTGAGTTTATCGAAAAAGTTT
 GTCGTCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGAGAGT
 ACAACTGGGATCTGAACTACGGCGAAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCAGGTGCGCAGTTCCCTGC
 AGAAAATCACCGATGCTTATGCCGAAAATCCACAGATCGTAACCTGTTGCTGGCTCCGTAACCTCAAGCAAATG
 CCGATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGTGCTGTTGCTTATGCGATACAGAACGGTATTCCGGTTCCGACCTTCT
 CCGCAGCGGTTGCCTATTACGACAGCTACCGTGCTGCTGTTCTGCCGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTGACT
 ATTTTGGTGCGCATACTTATAAGCGTATCGATAAAGAAGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

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

ATGACGAATTTAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCCTGCCACTAAGGCGATACCC
 AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAA
 GAAATCCTCCTGGTAACTCAGCGCTCCAAGAACGGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTATGAGTTAGAATCA
 CTCCTTGAGCAGCGCTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAATACAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG
 AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCA
 TTTGTGCTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGTGCCATG
 ATTGCAGTTTTCAACGAAACGGGCCGAGCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCC
 GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAACCCGGAT
 CAGCCGCAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTGCGTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAAGT
 GAACGTAAGTACTCAGCCTGGTGCATGGGACGTTTACGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAACAATCC
 GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG
 TATGGCTACGCAACCTGAAAGAAGGGCGAAGTTCGCTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA
 TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAAATTCGACGCAAAAGTAATTTGTTGCGAA
 TCTTCCTGCCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA
 GGATTTTCTTGTTCAGAGCGGATTTGGTAAGACAATTAGCGTTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA
 ACGCTCGTCACATCATAGGCATGCATGCAGTGTCTGGTAGCTGTAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC
 CTCATTAATCAAACCTGAGAGCCGCTTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAAATTAAGTGAAAAATA
 CTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTGGTTCAGCTGTAGTTCGTACATTTATAAATAATACGCAGGATAGTGTT
 GTTAATGTCGATAAATTAACGTACGCCGAAACCGGGAATCACTTGTGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATGTT
 TTTGAACATGCGGATATTTGCGATGCACCTGCAATGGCACGGATTTTGTCTCAGCATCAGCCGGATGCAGTGATG
 CACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTTGGT
 ACTTATGTCCTTTTGGAGCCGCTCGCAATTACTGCTGTCTGCTCTTGATAGCGACAAGAAAAATAGCTCCGTTTTT
 CATCATATTTCTACTGACGAAGTCTATGGTGATTTGCTCATCCAGATGAAGTAATAATACAGAAGAAATTACCC
 TTATTTACTGAGACGACAGCTTACCGGCCAAGCAGCCCTTATCCGCATCCAAAGCATCCAGCGATCATTTAGTC
 CGCGCATGGAAACGTACGTATGGTTTACCAGCATTGTGACTAATTGCTCGAACAACATATGGTCCGTATCACTTC
 CCGGAAAAGCTTATCCATTGGTTATTCTTAATGCACTGGAAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAAAGGGGAT
 CAAATTCGCGACTGGTTGTATGTAGAGGATCATGCTCGTGCCTTATATACCGTTCGTAACCGAAGGTAAGCGGGT
 GAACTTATAACATTTGGCGACACAACGAAAAGAAAACATCGATGTTGTGCTGACTATTTGTGATTTGTTGGAT
 GAGATTGACCGAAAAGAAAATCTTATCGTGAGCAAAATTAATTTGCTGATCGCCAGGGCATGATCGCCGT
 TATGCAATTTGATCCCGATAAAAATTAGCCGCAATTGGGCTGGAAAACACAGGAAACGTTTGAGAGCGGGATTGCG
 AAAACGGTGAATGGTATCTGGCTAATACAAATTTGGGTTGAGAATGTGAAAAGCGGTGCTTATCAGTCATGGATC
 GAACAAAACATGAGGGCCGTGAGTAATGAATATCCTGCTTTTTCGGCAAAACAGGGCAGGTGGGTTGGGAACTGC
 AGCGTGTCTGGCGCCGCTGGGTAATCTGATCGCTCTTGATGTTCACTCCACTAATTTATGTTGGAGATTTTCAGCA
 ACCCCGAAGGTGTGGCAGAAACCGTCAAAAAAATTCGTCCTGACGTTATTTGTTAATGCTGCTGCTCACACTGCAG
 TAGATAAAGCAGAATCAGAACCGGATTTTCGCACAATTACTTAACGCGACAAGCGTTCGAAGCGATTGCAAAAGCTG
 CTAATGAAAGTCGGGGCTGGGTTATACACTACTCTACTGATTTATGTTTTCCAGGCAGTGGTGACGCGCCATGGC
 TGGAAACGGATGCAACAGCACCCGCTAAATGTTTACGGTGAAAACAAAATTAGCTGGGGAAAAGGCATTACAAGAAC
 ATTTGCGCAAAGCATCTTATTTCCGTACCAGCTGGGTATACGCTGGTAAAGGAAATAACTTTGCTAAAACGATGT
 TGGCTTTGGCAAAAGAACGCGAAGAACGGCTGTGATAAACGATCAGTTTGGCGCACCAACAGGTGCTGAATTGC
 TGGCTGATTTGCACCGCTCATGCCATTCGCGTGGCATTAATAAACAGAAAGTTCGCTGGCTTGTACCATCTGGTAG
 CAAGTGGCACAACAACCTGGCACGATTTGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGGATTAATCTTG
 CACTTAACAAACTTAACGCCGTGCCAACACGGCCATCCACACCCAGCCGTCGACCCATAACTCTCGCCTCA
 ATACAGAAAAGTTTACGAGAACTTTGCGCTTGTCTTGCTGACTGGCAGGTGGGCGTGAAAACGTATGCTCAACG
 AATTTATTACGACTACGGCAATTTAACAAATTTTGCATCTCGCTCATGATGCCAGAGCGGGATGAATTAAGG
 AATGGTGAATGAAAACGCGTAAAGGTATTATTCTGGCTGGTGGTTCCGGCACTCGTCTTTATCCTGTGACGATG
 GCAGTGAGTAAACAATGCTGCCGATTTATGATAAGCCGATGATTTATTTATCCGCTTTCAACGCTTATGTTAGCG
 GGTATTCGCGATATTTCTATATTAGTACGCCACAGGATACACCCGCTTTCCAACAATTTATGGGGACGGGAGC
 CAGTGGGGTCTTAATCTACAGTATAAAGTACAACCGAGTCCGGATGGCTGGCGCAAGCGTTTATTTATTTGGCGAA
 GACTTTATTTGGTGGTGTGATTTGTGCACTCGTACTTTGGCGATAATATCTTCTATGGACACGTTATGCCGAAATTTG
 ATGGAAGCTGCTGTTAACAAAGAAAGCGGTGCAACGGTATTTGCTTATCACGTTAATGATCCTGAACGCTATGGT
 GTCGTGGAGTTTGATAAATACGGTACGGCAATTAGCCTGGAAGAAAACCGCTGGAGCCAAAAGCAACTATGCG
 GTTACTGGGCTTTATTTCTATGACAATGACGTTGTGGAATGGCTAAAACCTTAAGCCTTCTGCCCGTGGCGAA
 CTGGAATTTACCGATATTAACCGTATTTATATGGAACAAGGACGTTTGTCTGTAGCCATGATGGGGCGTGGCTAT
 GCATGGTTGATACAGGGACGCATCAAAGCCTTATTGAAGCAAGTAACTTCATTGCAACAATTAAGAGCGCTCAG
 GGATTAAGGTATCTTGGCCGGAAGAGATTGCTTACCCTAAAGGGTTTATTGATGCCGAGCAGGTGAAAGTATTA
 GCCGAACCGCTTATCAAGAATCAATATGGTCAATATTTGCTGAAAATGATCAGCGAATAGTATATGGGAACTCAA

TGATGGATATTAATTAATCTCTTTGCAAAAACATGGGGATGAGCGCGGTGCATTAATGCTCTTGAAGAGCAAC
 GAAATATACCTTTTCGAAGTCAAAAAGATATATTACATACTTGAGACTCTTAATGGAGTAAGACGCGGATTTTCATG
 CGCACAGGTTACTCGTCAGTTAGCTATTTGTAGTCAAGGGAGCTTGTAAATTTTCATCTGGATAATGGTAAAGAAA
 CAAAGCAGGTGGAACCTTAATGATCCAACAATTGCGTTGCTGATAGAACCCTATATATGGCATGAAATGATGATT
 TTAGTGATGATTGTGTGCTGCTTGTAAATGCGGATGATTTCTATAAAGAGTCTGATTATATCCGCAATTATGATG
 ATTTTATTAGAAGAGTAAATCAATTGAGAATTCATAAGCTAAGTGACGTCCAGACAACATCAATTTGGTGATGGA
 ACAACTATCTGGCAGTTTGTGTGATACTAAAAGGTGCTGTAATTTGGTAATAATTGCAACATCTGTGCAAAATACC
 TTAATTTGAAAATAACGTTGTAATTTGGTAACAATGTCACAGTCAAAAGCGGTGTGTATATTTGGGATGGCGTTAAA
 ATAGAGGATAATGTTTTATTGGTCCTTTGTGTAGCATTACAAATGATAAGTATCCTCGCTCTAAAGTCTATCCT
 GATGAATTTTTGCAAAACAATAATACGCAAAGGAGCATCAATAGGTGCTAACGCAACCATCCTGCCAGGAATTGAA
 ATTTGGTGAAAAGCAATCGTTGGTGCGGGGAGTGTGTAACCAAAAATGTACCGCCATGCGCAATAGTAGTAGGT
 AATCCAGCTCGATTTATTAATGGGTAGAGGATAATGAATAAAATGATTTTTTTAGATCTTTTTGCAATTAACCA
 GCGACAGCAAAAGAATTAGTCTCTGCGTTTAGTAGGGTCTAGATTCTGGTTGGTATATCATGGGCGAAGA
 TGAGCAGTTTCGAGAAAGAGTTTCGACAGAACTGTGGAGTTAAGTATTGCATTGGTGTAGCAAATGGCCTTGATGC
 GTTGATACTAGTATTGAGGGCATGGAAGAATTTGGCTATCTTGAAGACGGTGACGAGGTATTAGTACCGGCAAA
 TACATATATTGCTTCTATCTTGTCTATAACAGAGAACAACCTTGTTCCTGTTCTTGTGAACAGATATAGAAAC
 TTATAATATTAATCCTGCTTTAATTGAAAATACATTTACGGAAAAAACTAAAGCAATATTACCGGTTCACTTATA
 TGGTCTATTTGTGCAATATGCCAGAAATAGTGCAATCGCCAGAAAATATAATCTGTTGATTCTTGAAGATTGTGC
 ACAAGCACATGGTGCAATACGTGATGGTGCAGAAAGCTGGAGCTTGGGGGGATGCTGCAGGATTTAGTTTTTATCC
 AGAAAAAACCTTTGGAGCTTTGGGGGATGCGGGGAGCTGTACTACAATAATGCAGAAATATCCTCACTATAAAA
 AGCTTTGCGAAATTTGGGTACATAAGAAAATATGAAAATATTTATCAGGGATTGAATAGTTCGATTGGATGAACT
 GCAAGCAGCTTATTGCGTGTAAAATCCATACATTTACCGAAGTACTGCGATTCCGATGTACGAAGGCCAAGGTGCGCATGTTTGGCATT
 ATATAATCGTGAAATAAAAAACCTGCGGATTACGTTACCAGTGTACGAAGGCCAAGGTGCGCATGTTTGGCATT
 ATTTGTAGTAAGAATCGCTAATCGTGAAAATTTCCAGTCACTATTATAGAGAAGGGTATCAAAACCTTAATTC
 CTATCCATTACCACCCATAAGCAGCAAGCATATCAAAATATGTCTAGCCTTAGCCTTCAATTACTGAGCAAAT
 TCATGATGAAGTCATTTCTTTACCTATAAGTCCGGTAATGAGTGAAGATGATGTCAATATGTAATCAAAATGGT
 CAATGATTACAAGTAATGAAAAATTTCTTCAGGTAACATATATTATCCGCTATCTATACATTCATTAATGATT
 GCGGGTTTTATCATCGGTAAGGTAGTAGCAATTTATACAGGGCCATCAGGGGTAGCAATGCTTGGCCAAAGTGC
 AGTTTTAATCACAATAGTTGCAGGTACTCCTCTGCACCTGTAAAGCACAGGCCCTTGTTCGATATACCTCGGAAAAT
 TGGCAAGAGGACAAGAAGCATGCGCGCCATGGTGGCGCGCATGCTTAAAGGGTTACTCTGTTTTTATCTTGCTT
 ATTTATCCCGTTGTTATTTATATTGTGCGAAAATATTTAGTGAGTTACTTTTTAGCGATGGACAATACACATGGTTA
 ATCATTTTCGCATGTTGTATATTGCCATCTCCATTATAAATACATTGATCGCTTCAGTTTTAAATGGTCAACAA
 TTTTATAAGCAATATATATTGGTTGGGATGTTTTCTGTATTCATTTCTACTATGTTTATGATTTTTGTTGATTGTA
 GCTTATAATCTTAAAGGTGCATTTGATTGCCACAGCTATAAATAGTGTCTATTGCTGGTCTTGTATTTGGTTTTATTT
 TGTCTCAATAAATCTTGGTTTAGATTTAAATATTGGTGGGGTAAAACGGATAAAGACAAAATATAAAAATTTAT
 CATTATACTCTGATGGCTCTGGTTTTCTGTTATCTCCATGCCTACAGCATTGATGTGTATTAGAAAAATATTGATT
 GCTAAAACCTGGTTGGGAGGATGCAGGGCAATGGCAGGCCGTATGGAAGATATCTGAGGTTTATCTTGGTGTGTG
 ACAATGCTTTGTCAACATATTTCTTACCAAGATTGACAATATAAAAAACAAGTTTCTTATAAAAAAGAAGTA
 AATAGTACTATATTATACATAATATCTATTACTTCATTCATGGCGTTGAGTATCTATTATTCCCGCATTTGGTA
 ATAACAGTTTTATTTACTGAACAGTTTCGCTCAGCTCGTGAATTTTTTTATTACAACCTATAGGGGATGTAATA
 AAAATTGCTGGGTTTTCTTTATGCATACCCTTTCAAAGTCAGGGGCATACTAAACTATTCATCAGTTCAGAAGT
 ATTTTTCTATGCTCTTTATCATTACCACCTATATTTTTGTTGTAAATATGGAGTACATGGTGCTAACATAAGT
 TATGTCAATACATATAGTTTATATTTTTGTGTTTGCATTTGTGTTTACTAATTTTTATTAATGTTAGAAGAAATAAT
 TAAAAACAGAGGTTGAATTTTTGAAAATAATTATACCTGTCTTAGGATTTGGCAGGGCTGGTGGTGAAGAGTTCT
 TTCTAAGCTGGCAACTGAATTGATGAATATGGACATGATGTAAGTTTTGTTGTTCCAGATAATAGAACTAATCC
 ATATTATGCTACCACAGCAAAAATTTGCACGAGTAAATCTAGTCAAAACCGTGTAAAAATATTGAGAATCATTA
 AAATTACTATAATCTGTGGCGTAAATGCATAGAGTTAAATCCTGATGCTGTAGTTGCTAGTTTTCTATTTGACTGC
 CTATCTTGTGCGCATTATTACCAATCACCCGTGTAAGAAATATTATTATATTAGGCGTATGAAGTTAATTTTTT
 TGATAATATAATATGGAATTAATAGCGGGTTTAAACATATTTTACCAGCTTAAAAAAATACTAAATAGTCCTAA
 TTTGCTTCTCATAAACATGATGATTTTATAGGAGTAGTTCTTGCAGGAGTAGATTTAAACGTTTTCTATCCGAA
 ACCATCAATAGGTTATTAATGGTACACATCAATAGGGATTTGGTAGAAAAGAGAAGCACAAAGGAAGACTAG
 CGAAATTTATTTAGTATTGTGTTCACTGGAAAATAAAGCTGGAATTTAATCAATATTGCGATCTATCTGGAAGA
 AGTTGATAAGCAGCGTTAATCGCTGCCGGGTTTCAGGTTAATTTTTTTCCGATTACTTCTGATTTAGAATTGGC
 ATCCTTTTATCGAAGCAATGACATCATGATTGCTGTTGAGTAAATGAAGATGGCGCTTTCATTATCTCTGTGC
 TGAATCAATGGCTTGTGGTTGTCTTGTATTTCAAATATGCGCCACTTACTGAAACTAACAGTGTACTTAAAT
 AGTCAAGTTTGTGCTTGCAAACTTGGTGAAGCAATTAATCTTTGTCTCAATCTTGACCTAGAAGAAAAAGCAA
 AGAAATCCAATCTAATATTTCTGTGTTGAATAAATATGACTGGAAAATTTGTTGGTGAACCTTTCAATAGTTTATT
 GTTAGATGCAAAATAAATAGTATACGTTGATGGGGAAAATATGAATATTGTTAAAACCTGATATTCCAGATCTGATC
 GTTCTTGAACAAAAGTGTTTAGTGATGAACGCGCTTTTTTATGGAGAGTTATAATCAGATTGAATTTGAGAAG
 GCAATAGGAAGGCACGTAATTTTTGTTTCAGGATAATCATTCAAAATCTAGTAAAGGCGTACTACGTGGGTTGCAT

TATCAATTAGCACCCTATGCACAGGCTAAATTAGTTCGATGTGTTGTAGGTCAGGTATTTGATGTTGCTGTTGAT
 CTTAGAAAAAATTCACCAACGTTCAAAAAATGGTTTGGAAATAACCCTTTCCGCAGAAAAATAACGACAATTATGG
 ATACCCGAAGGATTGCTCATGGTTTCTTGGTGACCAGTGATGAAGCTGAGTTCATTTATAAGACAACAACTAC
 TATGCTCCTGGTCATCAGCAAGCAATTATTTACAATTGATCCTATTTTAAACATCGATTGGCCTTTCTCGAGTAGT
 GCTCTGTCAATTATCACAAAAAGATCAAGAAGCAAAATTTTTCAGAATTATTGGACAGTGAACCTGTTCTAATAA
 AGTGTGCCACCTTATCCGTCTGAAGGATAGGTGGTTGCTTATATTTTTTTGAGTATGTTTGTATAATGACAGAAA
 ATAGTCCGAAATATAAACACGATAAAAGCTTAATAAGTTTATCTACTTATTTTTTATATTTACACTTATGTAG
 GCTTTATATCGCAAATACCCAGTTTTTGGGGCGAAGTAGAGACTATGATAATTATATACAGATCTTTTCTGGTA
 AAGAAGGGGAGGGGTTCTTGAATTATTTATCGCGGATTGATGTTAATAACGACCAGCTATGAAACTATCATT
 TTATAATTTTAAACATGTTCTTTTTTTATAAAGGCAAGTTTCTCGCTAACTATTCGCGTAATTTTTTCAGGCTTGA
 CCTTATCTTTATTTTATATGCAAGCGTTGCACTTTGGGTTTATAGATTATACTCAATTCAGAAATGGTCTATGTA
 TTTCCATTTTAAATGTTTTCCGTATACTATTTATTTATAAATAAACCGACTTATTTTTATTTCTCGGTATTATGTG
 CAATTGCAACTCATTGGTCTGCTTTGCCTTTTTGCTTTTATATCCTTTTGTCTATTCAACAAAAATAAGACGCC
 TTGGTTATTTTTGTTTCAGTATTTCTGTTTTGATTGCGATCTCAGGAGAAGGAAAAGAGATCATATCTTTATAA
 GAAATTTTGGAGTGGGCAAAAAATAGGAAATGAAGCTGGTGTAAATTTAATAAATTCATTATCCCTTACCGCTA
 TTTCTCGGTTTATTATTAGTTACATATCAAGCATTGAAATGAAAGGAGAAATTTAAGGCTTTTCTTTTGTATG
 GTGTCATGCAATAGCTGACTTTTAGCCTTTCTCTCTACCTGTTATGGCTTTCCGTATTTTGGAAATGTATTTTT
 TCCTTATGCTAACCATTTGGGGTGTATTAAGCAAAAAAGAAATTTATTTTTTTTTGCAAAAGTGTATTTT
 TATTGTATCTAACATACTATTATCATATGGTCTTTGGAGTGATTAATGTGTAAGGCTAAGGTGTTGGCTATAAAT
 GTTACTTACAACCCGAAATTTATTCGATTGACGGAATGTATTAACCTTTAGCCCCACAAGTTGAGAGAATAAAT
 CTTGTAGATAATGGCTCAAATAATAGTGATTTGATAAAAAATATCAGTATTAATAACCTTGAATTTATTTACTT
 TCGGAAAAACAAGGCATTGCATTTGCTCAGAACCATTGGTGTAAAGAAGGGCCTGGAAGCAAAAGAGTTTACTAT
 TTATTTTTCTCAGATCAGGATACTTGGCTTTCTAGCGATGTTATTGAAAACTTAAGAGTACATTTACGAAAAAT
 AATAAAAAAGGTAAAAATGTTGCTTGTGCTTCTCCTTTTTTTTAAAGACCATCGTTCAAATTATATGCATCCGTCA
 GTCAGCCTAAATATTTTTACGAGTACAAAAGTTATATGTAAGTAGACGATGATCTTTATCCCTCGCATGTT
 ATTGCTTCTGGGATGTTAATGTCTCGTGAAGCATGGCGCGTCTGCGGACCATTTTGTGAAAACTCTTTATAGAC
 TGGGTTGATACAGAATGGTGTGGCGTGCATAGCTAATAATATGATTATTGTTGAGACACCATCAGTCAATCATT
 TCTCATGAACCTTGGGTATGGGCAGAAAAATTTTTGCTGGTGCATCTGTTACAATACATAATTTCTTTCAGAAATTTT
 TATAAAATACGCAATGCAATATACTTAATGCTGCATTTCAAATTTATAGCTTCAAGTATCGTTATCATGCTTTTTT
 CATCGCAAAAGATGTTGATTTTGAATTTTATATTTGAAAGAAAAATTAATTTCACTGAAGGTTGTTTTTAA
 GCTGTACGTGATGGTATGTTCAATAATTTTTAATACGAAAATAGTTAGGCTCAAGGTGTTTAAATGGAAGAAAAAT
 AATATGAAGACGGTCTGTAGTTGGCACAGTGGGTGTTCTGCTTGTATGGTGGGTTGCAATCACTTGTTCAG
 AATCTAATTTGATTATCAATCTGATGGTATACAATATCAGATATTTTGTCTTTCAAAAAATATGATAAAAAATTT
 AAAATTTATAAAAAATGCAAGATTAATCTATTTGCCGATAAATGCCAATGGCGTCTCTAGCATAATTTATGATATT
 ATGTGTTAATTTATTTGTTTATTCAAAGGCCAGATGTTGTTTAAATTTGGGGGTGTCTGGTGTTTATTTCTA
 CCAATTTATAAACTATTTTCAAATCAAAGATTATTGTCAATATTGATGGGCTTGAATGGCGTAGAAAATAAATGG
 GGAACGTTTGTAAAGAAATTTCTTAAATATCTGAGGCGATCTATTTAGAATAGCTGATATTTATCATTTTCAGAT
 AATCAAGCAATAGCTGATTTATGTGGAATAAAGTACAAGAAAAAAGTGTAGTTATAGCTTATGGCGGAGATCAT
 GCCACTAATCTTAGTACACCGATAGACAATGATCAAAAAAAGAAGGTTATTTATTTGGGGCTTTGTAGGATAGAG
 CCTGAGATAATATAGAAATGATTCTGAATGCCTTCATTAATACAGATAAAAAAATTAATTTATGGGTAATTTGG
 GATAACAGCGAGTATGGACGCCAGCTAAAAAATATTTATTTCAAATATCCAAATATCACCCCTACTAGAACCTAAC
 TATAATATTGAAGAGCTTTATAAACTAAGAAAAAATTTGCTTGCATACATTCATGGACACTCGGCTGGTGAACA
 AACCTTCTTTTAGTTGAAGCGATGCATTTTAAATTTCTATTTTGGCTTTGCGATTGTGACTTTAATCGTTACACA
 ACTAACAAATTTAGCTCATTACTTTAATGATTCTGAACAACCTAGCTTATTAGCAGAAAGTTTGTCTTTTGGAAAT
 CTTAAATGTGAGTATTAGATTTAAAAAATTTATGCTGAAGATATGTATAACTGGAGGCATATAGCTGCTATGTAT
 GAATCTATTTATTAACGCATTAACAATAATATAATTTGACCTTATATAGCAGGGAAAGATCACGTAACGCTGCGG
 CGCGCCGATCCCATATGAATATCCTCCTTAGTTTCCATTTCCGAAGTTCCTATTTCTTTCTAGAGAATAGGAACTT
 CGGAATAGGAACTAAGGAGGATTTTATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTTACTT
 TAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTTCCAGGCCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGG
 AGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCCTCAACATCG
 AAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGAAGTATTGCGGAAAAATCCAG
 GCAAGAACTGGTTCCCTACTATACGGTGAAGAGTTTGTGCAATCTCTGGAACGCCTCGTGCATCCTGTTAA
 TGGTGAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCA
 TTGATGGTGGTAACACCTTCTTCCAGGACACTATTCGTCGTAATCGTGAGCTTTTACGAGAGGGCTTTAACTTCA
 TCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCTGGTGGCCAGAAAGAAG
 CCTATGAATTTGGTAGCACCGGATCCTGACCAAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATCGCTTACCTATA
 TTGGTGGCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTTCAACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTG
 CTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGA
 ATAACGTTGAAGTGAAGGTTACCTGATCGACATCACCAAGATATCTTCAACAAAAAAGATGAAGACGGTAACT
 ACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACCGGTAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATC

TCGGCGAACCGCTGTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTTTGACAGTTATATCTCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTTG
 CCGCATSTAAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCAGCCAGCCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTC
 GTGCGCTGATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGCCTGCGTCTGAAGAGTACA
 ACTGGGATCTGAACCTACGGCGAAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCTGCAGA
 AAATCACCGATGCTTATGCCAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTACTIONCAAGCAAATTGCCG
 ATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGATGCTGTTGCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCGGTTCGGACCTTCTCCG
 CAGCGGTTGCSTATTACGACAGCTACCGTGTGCTGTTCTGCCTGCCAACCTGATCCAGGCACAGCGTGACTATT
 TTGGTGGCATACTTATAAGCGTATCGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTA

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

ATGACGAATTTAAAGCAGTTATTCCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGCGGATACCC
 AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAA
 GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGGGTGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA
 CTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATTTGCCCGCCGGGCGTGACAATTATG
 AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTGGGCCACTCCATTTTATGTGCACGACCTGCCATTGGTGACAATCCA
 TTTGTCGTTGGTGTCCAGACGTTGTGATCGACGACGCCAGCGCCGACCCTGCGCTACAACCTTGTGCCATG
 ATTGCGCGCTTCAACGAAACCGGGCCGACCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCT
 GTCATCCAGACCAAAGAGCCGCTGGACCCGGAAGGTAAAGTACGCCGCATGTTGAATTCATCGAAAAACCGGAT
 CAGCCGACAGCGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTTGGTGCCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGAACTT
 GAACGCACTCAGCCTGGTGCATGGGGGGTATTACGCTGACTGATGCCATTGCCGAACCTGGCGAAAAACAGTCC
 GTTGATGCCATGCTGATGACCGGCGACAGCTACGACTCGGTAATAAATGGGTTATATGCAAGCGTTCGTGAAG
 TATGGACTACGCAACCTCAAAGAAGGGGCGAAGTCCGTAAAGGGATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA
 TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAGATTAGCGGGCAAAGTAATTTGTTGCGAA
 TTTTCCCTGCCGTTGTTTTATATAAACAATCAGAATAACAACGACTTAGCAATAGGATTTTCGTCAAAGTTTTCCA
 GGATTTTCCCTGTTTCCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCATTTGAATTTTACGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA
 ACGCTCGTCACATCGTAGACATGCATGCAGTGTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGTGAAATTA
 TAAAGTCACTTCTATAGAACATCGCATTTCAATAATATAATACACCTAAATGAATAGGATACAACCTGTGCACA
 ATTTATTAAGGCTTAAAGATAAAAATAAAAAACGTATTTTAGGGTTGTATATATTGCAGTTATTTAATTATATCG
 CGCCATTGGTAATTATCCCTATCCTGATAAAAATATATTGGGTTGGGGGAATATGGGGAATTGGTCTATATTACAT
 CTATTTATCAAATAGTGGCTTTGATTATGATTTTGGCTTACTTACACAGGACCTGTGGTTGCTGCGAGACATA
 GATGTGAGACCCAAAATTTACAGCGCTATTACTCAATAGTTGTTCTTTTAAAATCATTGCTTTTTATAAATTGCAT
 TAACATGTGATTTTTATGTGCAGATTAATATAGTCCACTTGTCAATTTTTGGGTTTTTGTCAATTTTTCTAT
 GCACTATTGGTAATATATATCGCCCAATTTGGTTTTTGCAGGGGATTGGTGATTTTAAAAAATTTTCACTAC
 AAGTAATAGTGAGAATAACATTTGTTTATCATACTTCTGTTTATGTCTGTAGTGGCGGAGATAATGTTTTTATCC
 TAAGTTTTTTGCAAAATGCAACATTACTCATATGCTGTATACTTATGGCCAAATATTCATATTAGCCATGTTT
 TTCATCTTAAACCTAATGAATGCATTTGGAATTTAAGAAGCGAGGAATGTTTTTATTTGGCGTAATAGGTACGA
 TTGGTTACAATGGTCTAATTCCTGTGTTAATTGAAACCTTTGCGGTAATACGAGTCTTGGTGTTTTTTCAATCG
 TTCAAAAATGACAACAGCATGTCAAAGTCTAATTAATCCAATATCACAGTATATGTTATCTCAAGTTTCAGAAA
 TTAAACSTCAAGATAAAGTGTTTTATATAGAATTAAAAAAGTTTTTTTGTGCATTTAACAATTAGCATAATTG
 CATGTTTATGTTATATGGGGTAGGGCAATATGTGGCGACTTTTATAGGTAAGGTTGACGTTTCATTTGTTATTA
 TTTTATTTGCGTCAATAATTACCATTTTTTTCATCTTTAAATAATGTCCTTGGTATACAGTTTCTTATACCGACAG
 ATAATGTAAAAATACTACGAAGTATAAATGTTATGGCGGGAATTTGTTGTTAGTTTGTCTGGCTGTTAATAT
 CACGCTTTGACATTTCTGGGGGGGTTTTTATTAACCTAATTTGGTGTGTTTCTTGTATTTCAGTATGCTAGCTTTTA
 TTGCCCATCGAAAGTGGGAGCGAGATATAATGAAAGTGAAGGCGGTTCTGCTATTACATTTCTATTTAAGTTT
 AATGCTGACAATTTTAGTGTACTGTTTGGTAATGAACCAAATAAATCACAATATATCCTTGTATAGCAACGAT
 AACAGTTTTTTATATCGCATATATCACTAATAAATAACTTCTCCGGCCAGCCTTCTCGTTATATCATCTTTTTGT
 GTTTTTAGGTTGTCCGCTTTATTTATCTTTGTTGCAAACTATGATTATAGGATTGCCGATTGGTTTTATGAAGG
 ATATATGGATGACGATGTGATTTTGGCTAATGCTATAACACTAATGTATTATGGTTATACATTGGGACTAAT
 TCTATGCAAAAATACTGAAAAATTTTATCCGCATGGTCTTATCCTGAAAAACAATTGCTAAAAATAAAGTTTTCT
 TTTGACTTTATTTTTTCTGGGTTGATAGGATGTTGTTGAAAAGGGATATTCTTTTTAACTTTATAGAATCTAA
 TAGTTATGTTGATTTTTATCAATCAAATATAACAACGCCAATAGGTTATGATTTTCTATCTTATTTATTTATTG
 TTCTTTTTCTCTTATATGTGCGTTTTATATACAGTTTCAAGCAAAATAAAAAATTTCTTTTTATTGCGATATGCAT
 TGCTGCATTTAGCACCTTTGAAGGGTAGTGTAGTGAAGCTATAACGTTTCTTTTAAACGGTTACATGTATATATT
 TAATGAAGTAAAGACAAGAACTTACGCTGCTGATTACAATGATTTTTGTTTTTAGCGTCATTTTTGTGATTAG
 TGAATTTATCTCAATGTGGCGCACTGGAGGGATTTTTTTTCAATTAATGCAGGGTAATAATCCTGTTATAAACTT
 TGTATACGGCATGGGAGTATCATATCTTCCATTTATCAATCAGTAAAACTACAACCTATTGTGAGGGGGATATAA
 TGTTACCTATCTATTACGCCAGTTAATAAATAACTTGTCTGTCATATTTAATGTCAAATTTGAGCTTCCCGAAAT

AAGCTATAGCCATTTGGCCTCATAACAGCAAACCCAGAACTATATAATCTTGGGTTCCGACTTGGGGGGAGTTA
 TTTAGCAGAATCGTTTTTAGCATTGGTCTGATTGGATGTTTTATTATACCCTTTTTACTTTTACTTAATTTAAA
 TGTATTGGAAAAATATACAAAAACAAACCAATTATATATTTTGGTTTATATAGTGTGTTGCCACCTATATTATT
 CACACCAAGAGAGACTTTGTTCTATTTCTCCCTACTCTGTCAAAGTATATTTGTTGCTTTTTTAGTTACATT
 ATACATCCAGTATAAAAAAGGATTGACCAAAATGTCAGAAAAAATGTCAGCATAATAATCCCAAGTTATAACAGG
 GCTCATATTTCTTAAGGAGGTATACCAAGTTATTTTCCAGGATGAGACTTTAGAGGTTATAGTTATCAATGATGGA
 TCAACAGATAATACAAATAGTGTATTAGCTGAAGTGAAGGAAAAATATTTCTCAGTTAGTTATTTTAGAAAAATGAA
 ACGAATAAAAAACAGATGATTCTAAAAACCGAGGGATTGAAATAGCCAAAGGGAAATATATTTTTTTTTTGGTGAT
 GATGACTCTTACCTCTTACCCGGTGTATATCTCGGTTATTGGCTACAAAATATGAGACAGGCGCTGATGTAATC
 GCGCAAGAATACTTTATATGAATAATAACGAGAAAACAATTGAAGATTGCATAAATCGACATAAAAAAGAGGGG
 CGTTTTGTTAGTGTAAATAGATTGGATTTTAGTTATACATGTGATTGGACCATCCGATTGAATGTTTTTAT
 GCACAGCCTTTTTGTTCTAGCTGAAAGGGAACTAATATCGAAATATCGAATTTGATATATCTTATACGGGAACTGC
 TATCGTGAGGAACTGATTTTATGCTATCTCTATTTTATAAAAATAAAAAATTTATATATGATTCAAAGGCTTTG
 TTAATAAATTTACCTCCAAGAAAAGCGACGGGAGGGGCAAGAACAGCTAATCGATTAAAAATATCATTACGAAAGT
 TGCATAAATAATTATAGATTTTTTAAAAAATATAATGATAATTTGAATCTTCTTTTCAGGACAAAAGCATGCTATA
 TTTTACCAGCAGTGTCAATTCGTTCTGCTAAAAATGAAGTCTGTTTATCGGGAAGTTTTTAAAAATGATTATATA
 TCGCCCGGTATAATGGTTTCCAGGAGGGCAAGGTGGGGTGGAAAGGGTTGTTGCCCAACAATGTAACATTTCTAAA
 AATTTGGGGGTTAAAGTCATTATACCTTGATAAAACATACTTCAAATTTCTAACAAAATCGTAACAAAAAATAC
 AAGTAGCCTTTTATCCAATATTAGTTTCTCTTTTATTTAACCCTTACAAAATACGTGGCTGACGTTTTAAAGTTA
 TTGCACATGGCTATTTCTCTCTTTTTATAGGAATGACATCTTAATAGCTCATGGCAATATGAAATGTTATTTTC
 AACAGTCATGAATAAAAAACCTAATCGGTTGTCTGGCAGTGGTCTTTTATCTTTCTATGAGCGTTGGGCTGGAG
 CATTTTCAAATAATCTGGGCTGTTTCAAATAAGGTTAAAGTGAATGGAATGAGCTTTACAATATTAATTCAC
 ATAAAATCAAAGTTGTTTCAAATTTTATAAATCTTGCACAATTTGATTACACTGATGTTAATGAAGCAGAATATG
 TGACATTTGTCCGGGATTTGGAAAAAGGAAAAGGAATAGATGATCTGTATTACATATGTAATAATCTGCCAGATA
 CTTCCTTCCATTTAGTTTCAAGTATTTCCGCCCCACAAAATTTTGCTTCGCTAAATAATGTTCTGACCAGCATTTG
 CTGTCCCTATGCGAAAAATGCCAGAAATATTTAAGAAATCCAGAGTACTTATTTTACCCTCTATTATGAAGGAT
 ATGAGCTGGTTACTATTGAAGCGCTATGCTGTGGTTGCCCTGTGATAGGCTATAATGTTGGTGAATTAGAGAGT
 TGTATGAGAAAAGTTTTCTGGCGTATTTATTGCCAATAATAAAGAAGATTTAGCACAAAGTAGCCTACAATTA
 TTAGTCTTGATAATGAAAAATATTATCATTTGAGACAACTATTTTATAGCAAGCGTGAGCTTTTTTCTGAAGAGA
 GATATGCGGAAATTTTAAACGGCGGCATTTAATGAAAAAATAAGAACTCTGTCTCATTTCAATTAACATCATAT
 AATGAACCTTACCGGAGGAGGATATTTTACGTACGCTTGTAGTTTTTCTACAAAAACGAATGTTAATTTAACA
 CTTATTGATAAAAAATCCTCAGGTAACCTATTGCAAGACAATACTTTTCAACATATATCATTTATTAAGGTAAA
 CGTCAGGATATAATATCCAGGCTTTTTTTTTATACCATCATTTTATGTCCCTTATATTTTCTCAATAATTAATAAT
 TTACGGAAGCAAGATATTTCTGCTTTTCACAACTCTCGGCTTGGATTGTTATGTCTGCTTTTTTAGAATACTCATG
 CCCCCAAAAAGATCATATTGTTTACGGATAACTTCGAATATGACTTAATAAGACAAAAAGATAAAAAACATAACT
 ACTTTTATTGAAAAATTAATTTGTTTATCTCAATGAATTTATCGGGCTTAAAGAAATTCAGATTTAGTTAGCTATATT
 ACCCGCAAGATAAAAAATGCAATGGATAAATTTTATGGGATTAAAAAAGCAGAAATTTAATTTCTCCCTGTGATA
 TTTAGTAGAGAAAAACCAACTGATGATTTGTGAGTCACTTTTATTAATGAGTATAATCGAATGAATAATGATAAT
 AGGAAAAAGTAGTATTTACTGCATCTTTTATTTTTTTCCAAATATAGATGCTGCCAATATGTTTTAAATGCA
 GCAAAGTCTAATAATGATTATTGCTATATTTTGGCAGGTAGGAAAAGTACTACTTTGAATCTTCTGATTTGGAT
 AATTTATTTTTTTTTCGATAATCTATCTAATAGTGAATGTCATATTTATATCTGCTTGTGATGTTTTTTATTTCT
 CCTATAGTTTTTAGGAAGTGAATGAAAACAAAAATTCAGAAAGCACTATCATATGGATTTATATTTTATGCGACA
 GAGCATTCCTTAATCGGCTATGATGAAATATACACAATAAGGAGTGTGTTAAAAAATCTCACATTTGGATGAG
 GAATTTCCATAAGATTTCAAGATGAAAAGTATCAATAAACAGCTAATAATGTCTTATCAGCAAAAAATATTATTCA
 CATTATCGGTTTTAATGGCCATGAACTTGATATAATAAATTTTACGATTTAGTTAGTGGAGATATAATATGAACAT
 ATTAGTAACTGGTGGTCTGGATATATCGGATCTCATAACGGCTATTGAATTAAGTGCAGGTGATGAGATTAT
 CGTTCTGGACAATTTTCAAGTATGCTTCATACAAGTGTATCGAAAAAATAAAAGAAATTAAGTGCAGCTGATTTTAT
 AACAATTAAGTGGAGATGCTGGGTGTAGGAAGCACTCTCCGCTATTTTCAGAAACACGCCATAGATATAGTTAT
 TCATTTTGTGGCTTTAAATCTGTTTTCAGAGTCTAAAAGTGAACCTTAAAGTATTACCAGAATAATGTTGGAGT
 GACCATTAATTTTATACAGGTAATGGAAGAGTACAGAAATTAAAAAATTTATCTTTAGTTTATCTGCGACAGTCTA
 TGGTGAACCAAGATAAATCCAATTCAGAAACAGCTAAAATTTGGAGGAACACGAATCCATATGGCACATCGAA
 GTATTTTGTGAAAAAATTTAGAGGATGTTAGTTCCACGGGAAAACCTGGATATAAATTTGCTTGGAGATTTTTAA
 TCCTGTCCGTGCTCATTTAGTGGTAAAATAGGTGAGGCTCCATCTGGTATCCCTAATAATCTTGTCTCTTATTT
 ATTTGGATGTTGCGAGTGGTAAACGTGATAAATATTTATTTATGGCAATGATTACCCTACTAATGATGGACAGG
 TGTAAAGGATTTTATTCATGTTGTTGACTTAGCGAAAGGTCATTTGGCTGCAATGAATTTAAGTATCAATTC
 GGGATATAATATCTTTAATCTTGGTACAGGAAAAGGTTATTCGGTACTTGAATTAATCACTACACTTTGAAAAAT
 AACAAACATTAAGGTCAATAAATCTTTTATAGAGAGAAGGGCAGGGGATGTTGCGTCTTGTGTTGGCTGATGACGA
 TAAAGCTAATTTCTTTTATTTGGACTGGCAAGCCGAACAACTCTAGAACAGATGTTATTGGACTCGTGGCGTTGGAA
 AAAAAATATCCAGACGGATTCTGAATATAAAAGGTTTTCAGTTTTATGAATCAATCAGAGCAGAGAAAAAATA
 CTGGTTCTTACACCTCGCTTTCCCTACCCTGTCTTGGAGGGGATAGATTAAGAGTCTATATGTTATGTAAGAA

CTTTCCAAAAATATGATCTTATTCTTCTGAGCTTATGTGATCAACCACTAGAACTTGAAATAAATATAAATGAC
 TCGGCTTCAAAGAAATTCATCGTGTCTATCTACCAAAATATAAATCATATTATAATGTATTTAAAGCTTTGGTT
 ACGCAAAACCCTTGCATTTGCTTATTATCAATCGGACACATTTAAGAATAAATACAATAAATTAATAAACA
 TGCGATGCAGTATTTTGTCTATCTGATAAGAGTTGCTGATTATGTTAAGGATACAGACAAGTTCAAAATCTTGAT
 ATGACAGATGCAATATCTTTGAATTACAGTCGCGTTAAAAAATTAGCAAGTAAAAAAGTTTGCCTGCAATTATT
 TATTCTCTGGAACAAAAAGATTAGAATCATATGACGTTCTGTGGCGAATCTTTTTGATTTGACCCTTTTATT
 TCATCCGTAGACCGTGACTATCTCTACCTAATCTGGGCGAGTAATATCCATATAGTCAATAATGGGGTTGATACA
 TCAGCCTTGAGATATATAAAAAGAGAAAATAAAAATCGATAAGCCTGTGGAACCTTATATTTATCGGAAATATGTAT
 TCTTTACAAAATATGGATGCTGCAAAACATTTTGTCAAGAATATTTTACCTTGTGTGATGATGAGTTAATATT
 ATTTTTAAAGTGATTGGTAAGATCTCAGAACTAATAAAAATATATTTAAATTCATTTAAAAATACAATTGCTTTA
 GGTACTGTTGATGATATCAATTCTTCCGCTTCTACAGGCATATAGGTATATGTCTGTTGCTTGGAGCAGGC
 GTACAAAATAAAATCTTGAATACATGGCTTTAGGTTTACCATGTATTACATCTAGCATTGGTTATGAAGGTATT
 AATGCAAAATCAGGTAGCGAAATTTTTTGTGAGATACAGTAGAGCAATATAAAAACGCTACTAAGAGAAATAATT
 TACGATTTAATCGTTATACTGAAGTGGCTGAAAATGCCCGTAGTTTTGTAGAAAATAATTTTTCTTGGGAATCA
 AAAGTTGCCAATTTAATGAATACATTAGATGAGAAATTATATGAACAATAATAAAATTTATTACACCTATCATTAT
 GGCTGGTGGTTCAGGCAGTCCGTTGTGGCCACTATCAAGAATCTCTATCCGAAACAATTTCTTAGCCTAATCGG
 TAGTCATACCATGCTTCAAACAACGGCTAATCGTCTGGATGGTTTGGATTGTACCAACCCCTTATGTCATTTGTAA
 TGAACAATACCCTTTTATAGTTGCTGAACAGCTTAGAAAATCGATAGATTGACTTCAAAGAATATCATCCTTGA
 GCCTGTTGGGCGTAACACTGCCCTGCATTGACGCGCTGCTGATGTCTAAGTCTGATAAAAGTGCAGA
 TGATCTTATGCTCGTACTGGCTGCAGATCACGTTATACACGATGAAGAAAAATTTTGAACGCTGTTAGATCGGC
 AATTCATACGCTGCTGATGGGAAATGGTAACATTTGGTATAAATCCAGACAAAGCAGAACTGGTTATGGTTA
 TATACATCGAGGACAATATATTAATCAGGAAGATTCGATGCAATTTATAGTGTATCATCATTGTTGAAAAGCAAA
 TCATGAGACAGCCACTAAATATCTTGTCTCCGCTGAGTATTTTGAATAGCGGTATGTTTTGTTTAGTGCAAA
 TCGTTATATAGAGGAACCTAAACAATTTCCGCTGATATTTTATCCGCTTGTGAAAAGCAATTTGCTTACGCGAA
 CTTTGACCTTGATTTTTGTGCGTTTAGATGAAAGTTCTTCTCTAAGTGCCTGAAGAATCAATTGATTACGCTGT
 AATGAAAAACAAGACGCAATTTTATTCCAATGGATGCTGGCTGGAGTGATGTCCGTTTATGTTCTCT
 TTGGGAAATTAATGATAAAGACTCAGACGGCAACGTAATAGTTGGGGATATTTCTCTCATGAAACAAGAATTC
 TTTCATATATCCGGAATTTGTTGCTACAGTTGGATGGAAAATTTAGTTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
 TGTCTCAGAGAGAAAATAAAGTTCCAGGATGTAAGAAAATAGTAGAACAATAAATAAATTCAGGCTCGTAG
 CGAGCATATGTTTCATCGGAAGTATATCGTCTTGGGGTAAATATGATTCCATTGACACAGGGGAGCGTTATCA
 GGTCAAACGTATAACAGTAAATCCTGGTGAAGGACTTTCTTTACAAATGCACCATCATAGGGCAGAACATTGGAT
 CATAGTTTCTGGAACGCAAGGGTACTATAGGTTCTGAAACTAAGATTCTTAGCGAAAATGAATCTGTTTACAT
 ACCTCTTGGTGAATACACTGCTTGGAAAATCCAGGAAAATTCCTCTTGATTTAATTTGAAGTTCTGTTCTGGATC
 TTATTTAGAAGAAGACGATGTTATCCGTTTTTCCAGGACCGATATGGTCTAGCTAAATTTTTGATAATGTAACGTT
 AGTAGAAGAGCGCTAATATTTTTAGTTAATCTGTAATAAGTATTATTTGTTTAAAGGTATATCATGTCCGAGTTTAC
 CCTGCTTTAAAGCCTATGATATTCGCGGGAAATTAGGCGAAGAACTGAATGAAGATATTTGCTGGCGCATTGGTC
 GCGCTTATGGCGAATTTCTCAAACCGAAAACCAATTTGTGTTAGGCGGTGACGTCCGACTCACCAGCGAAACCTTAA
 AACTGGCGCTGGCGAAGGGTTACAGGATGCGGGCGTGGATGTGCTGGATATTGGCATGTCCGGCACCAGAGAGA
 TCTATTTCCGCACGTTCCATCTCGGCGTGGATGGCGGCATCGAAGTTACCGCCAGCCATAACCCGATGGATTACA
 ACGGCATGAAACTGGTGGCGAAGGGGCTCGCCGATCAGCGGTGATACCGGACTGCGCGACATCCAGCGTCTGG
 CAGAAGCCACAGCAATTTCTCCGTTGATGAAACCAACCGCGGTGCTATCAGCAAAATCAATCTGGTGGCCTT
 ACGTTGATCACCTGTTCCGTTATATCAACGTCAAAAACCTCACGCGCTCAAGCTGGTGAATTAATCCGGGAACG
 GCGGCGGGTCCGTTGGTGGACGCCATTTGAAGCCGCTTTAAAGCCCTCGGCGCACCCGTGGAATTAATCAAAG
 TGCACAACACGCCGACGCCAATTTCCCAACGGTATTCTAACCCTGACTGCCGGAATGTCCGCGACGACCCC
 GCAATGGGTCATCAAACACGGCGCGGATATGGGCATTTGCCTTTGATGGCGATTTTGACCCTGTTTCTGTTTG
 ACGAAAAGGGCAGTTTATTGAGGGCTACTACATTTGCTGGCCTGCTGGCAGAAGCGTTCTCGAAAAAATCCCG
 GCGCGAAGATCATCCACGATCCACGTCTCTCTGGAACACCGTTGATGTGGTGACTGCGCAGGCGGCCACCCCG
 TAATGTGCAAAAACCGACACGCCTTTATTAAGAAGCTATGCGCAAGGAAGACGCTATCTACGGTGGCGAAATGA
 GCGCCCACCACTTCTCCGTTGATTTGCTTACTGCGACAGCGCATGATCCCGTGGCTGCTGGTCCCGAACTGG
 TGTGCTTGAAGGAAAAACGCTGGGCGAAGTGGTGGCGACCGGATGGCAGCGTTTCCGGCAAGCGGTGAGATCA
 ACAGCAAACTGGCACACCCCGTTGAGGCGATTAACCGCTGGAACAGCACTTTAGCCGCGAGGCGCTGGCGGTGG
 ATCGCACCGATGGCATCAGCATGACCTTTGCCGACTGGCGCTTTAACCTGCGCTCCTTAACCCGAACCGGTGG
 TGGGTTGAATGTGGAATCGCGCGGCGATGTACCCGTGATGGAAGAAAAGACAAAATTTATCCTTGGATTACTGA
 ACAAGTAATTCAGTAATTTATATAAATGGGTTTTAAAAAACGAAAAGATGAGATATCCGGTGTGGTATATCCA
 AGGTAATGCTATTCAGTATCTCTATGAGTGAGTTAACATCTATACCACATTTAAGCCGCACACTTCCGGATCCCC
 ATATGAATATCCTCCTTAGTTCTTATCCGAAGTTCTTATTCTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACT
 AAGGAGGATATTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTTACTTTAATAAGTACTTT
 GTATACTTATTTGCGAACATTCAGGCGCGGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTC
 CAAGCAACAGATCGGCGTAGTCCGTTATGGCAGTGTGGGACGCAACCTTGGCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTA
 TACCCTCTCTATTTTCAACCGTTCCGTTGAGAAGACGGGAAGAAGTGATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAACTGGT

TCCTTACTATACGGTGAAAGAGTTTGTGCGAATCTCTGAAACGCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCAGG
 TGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATTGATGGTGGTAA
 CACCTTCTCCAGGACACTATTTCGTGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTAACTTCATCGGTACCGGTGT
 TTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTGGT
 AGCACCGATCCTGACCAAAATCGCCGCGGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGCCGATGG
 CGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTC
 TCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTACCGAGTGGAATAACGGTGAAC
 GAGCAGTTACCTGATCGACATCACCAAGATATCTTCAACAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGT
 GATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGTACCGGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGTGGATCTCGGCGAACCGCT
 GTCGCTGATTACCAGTCTGTGTTTGCAGCTTATATCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTGGCCGCATCTAAAGT
 TCTCTGTTCCGCAAGCACAGCCAGCAGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTCGTGCGCTGTATCT
 GGGCAAAATCGTTTCTACGCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGTGCTGCTGAAGAGTACAACCTGGGATCTGAA
 CTACGGCGAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCTGCAGAAAATCACCGATGC
 TTATGCCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTAATCAAGCAAATTTGCCGATGACTACCAGCA
 GGGCTGCGTGATGTCGTTGCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCCGGTTCCGACCTTCTCCGACGCGGTTGCCTA
 TTACGACAGTACCCTGCTGCTGTTCTGCCTGCAACCTGATCCAGGCACAGCGTGACTATTTTGGTGCCGCATAC
 TTATAAGCGTATCGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

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

ATGACGAATTTAAAGCAGTTATTCCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCGATACCC
 AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTAGTACATTTGTTGACGAGATGTTGGCTGCAGGGATCAA
 GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAAGCGGGTCGAAAACCACTTCGACACCTTATGAGTTAGAATCA
 CTCCTTGAGCAGCGGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGCGTGACCATTATG
 AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCA
 TTTGTCGTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATG
 ATTTGCAGTTTTCAACGAAACGGGCCGAGCCAGGTGCTGGCAAACGTTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCC
 GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAAGGTAAAGTCAAGCCGATGTTGAAATTTATCGAAAAACCGGAT
 CAGCCGACAGCGTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTGCGTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAAC
 GAACGTACTCAGCCTGGTGCATGGGGACGTTTACGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAACAATCC
 GTTGATGCAATGCTGATGACCGCGCACGTTACGACTCGCGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCCGTTTGTGAAG
 TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGCGAAGTTCGTAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA
 TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAATAATTCGCAGCAAAGTAATTTGTTGCGAA
 TCTTCCCTGCCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA
 GGATTTTCTTGTTCAGAGCGGATTTGGTAAGACAATTAGCGTTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA
 ACGCTCGTCACATCATAGGCATGCATGCAGTGTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC
 CTCTAATTAATCAAACCTGAGAGCCGCTTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGCTAGCAT
 CGCTTAAGATCTAGGATTTTATTATGTTACTTCTGTAATTTATGGCTGGTGGTACCAGCGAGTCTCTTGGCCGA
 TGTCACGCGAGCTTTATCCGAAACAGTTCTCCGCTGTTCCGGCAGAACTCCATGCTGCAGGAAACCATCACCC
 GACTCTCGGGCCTTGAATCCATGAACCGATGGTCACTGTAAACGAAGACACCGCTTCTGGTGGCTGAACAGC
 TACGCCAGCTCAATAAGCTGTGCAATAATATTTCTTGAAGCCGCTCGGGCGCAACACCGCCCGGCCATCGCCC
 TGGCAGCCCTTCAGGCCACCCGCGACGGCGACGACCCGCTGATGCTGGTCTCGCCGCTGACCATATCATCAATA
 ACCAGTCGGCCTTCCACGACGCCATCCGGTTCGCCGAGCAGTATGCTGATGAAGGTCACTGGTCACTTCCGTA
 TCGTGCCGAATGCCCGGAAACTGGCTACGGTTACATTCAGCGCGCGTGGCGCTCACCGATAGTCCCATTCCG
 CGTACCAGGTGGCCCGCTTTGTGGAGAAGCCGGATCGCGAGCGCGCCGAGGCTTACCTCGCTCCGGGGAGTACT
 ACTGGAACAGCGGCATGTTTATGTTCCGCGCAAGAAATACCTCATCGAGCTGGCCAAATACCGTCCGGATATCC
 TGGAAGCCTGCCAGGCTGCGGTGAATGCCCGGATAATGGCAGCGATTTTCAATATCCCGCATGATATTTCT
 GCGAGTGCCCGGATGAGTCCGTGGACTATGCCGTTATGGAGAAAACCGCGATGCGGTGGTGGTGGTCTCGATG
 CTGACTGGAGCGACGTGGCTCCTGGTCCGCACTATGGGAGGTGAGCCGAAAGACGAGCAGGGCAATGTCCTCA
 CGCGGTGACGCGTGGGTACACAACAGCGAAAACCTGCTACATCAACAGCGACGAGAAGCTAGTGGCGGCCATTGGCG
 TAGAGAATCTGGTGATTTGTGACACTAAGGACGCCGTGCTGGTGAATCGCGAGCGTTCCAGGACGTGAAGA
 AGGCGGTGAGTTCCTCAAGCAGAACCAGCGCAGCGAGTACAAGCGCACCGTGAAGTTTACCGCCCTGGGGCC
 GTTGGCAGCTAGTGGTCCAGACCCCGCTTCAACGTCAACCGCATCACGGTGAACACAGGCGGTGCCTTCTCGA
 TGCAGATGCACCACCATCGCGCCGAGCATTTGGGTTATTTCTCGCCGCCACCGTCAAGTGTCAACCGTAAGC
 AGTTCCTGTGTCCGAGAACCAGTCCACCTTATTCCGATTGGCGCCGAGCACTGCCTGGAAAACCTGGCTGTA
 TTCCGCTGGAAGTGTGGAGATCCAGTCCGGGGCGTACCTTGGCGAGGACGACATTATTGATTTAAAGACCAGT
 ATGGTCTGTGTAATTTTTCGGGACAAGACGCAAGTACACAGTTAACTTGTTTAAAGCTTATGACATCCG
 TGGTGAACCTGGGTGAGGAACTGAACGAGGACATCGCTACCGTATCGGTGCGCCCTACGGCGAATTTCTGAAAC

CGGGAAGATAGTGGTGGGGGGCGATGTGCGCCTCACAAGCGAGTCGCTGAAGCTGGCGCTGGCCCGGGTTAAT
GGACGCCGGTACCGACGTGCTGGACATCGGCCTGAGCGGTACCGAAGAGATTTACTTTGCCACCTTCCACCTTGG
GGTAGATGGTGGCATCGAGGTGACCGCGAGCCACAATCCTATGAACACACCGGCATGAAGCTGGTGGCGGAGAA
TGCCAAGCCCATCAGCGCGACACCGGCCTGCGGGATATCCAGCGCCTGGCGGAGGAAAACAGTTCCCGCCAGT
GGACCGGGCGCTCGCGGGACCTGAGCAAGATATCGTACTGAAGGAGTATGTTGACCATCTGATGAGCTACGT
GGACTTCTCGAACTTACCCCGTCCACTGAAGTTGGTGGTGAACCTCCGGAAAACGGGGCTGCGGGGCACGTGATTGA
TGAGGTGGAGAAACGCTTTCGCGGGCGCTGGGGTGGCGGTAACCTTTATCAAGGTGCATCACCAGCCGGATGGCCA
TTTCCCTAACGGTATCCCGAATCCGCTGCTGCCGGAGTCCCGCCAGGATACCGCCGACGCGGTGCGCGAGCATCA
GGCCGACATGGGGATTGCCTTTGACGGCGACTTCGATCGCTGCTTCCCTGTTTCGATGACGAAGCTTCCGTTTATCGA
GGGGTATTACATTGTTCGGCCTGCTGGCTGAGGCGTTCCTGCAGAAGCAGCCGGGAGCGAAAATCATTACAGACCC
GCGCTTACGACGTGGAACACGGTAGACATCGTGACCCGCAACGGCGGCCAGCCGGTATGTCGAAGACGGGGCATGC
GTTTCATCAAGGAGCGGATGCGTCAGGAAGACGCTATCTACGGCGGGGAGATGAGTGCGCACCATTTACTTCCGCGA
TTTCGCCACTACTGCGATAGCGGGATGATCCCGTGGCTGCTGGTGGCGGAGCTGCTGTGTCTGAAGAACAGCTCGCT
GAAATCGCTGGTGGCGGACCGCCAGAAGGCGTTCCTGCGTGGGAGAGATCAACCGCAAGCTAAGTAATGCTGC
TGAGGCGATCGCCCGCATCCGGGGCGAGTATGAGCCGGCGGCTGCACACATCGACACAACGGACGGGATCAGTAT
TGAATACCCTGAATGGCGCTTTAACCTGCGCACGTCTAACACCGAGCCGGTGGTGGCTCTGAACGTTGAGTCCAG
AGCTGATGTGGCGCTTATGAATGAAAAACGACCCGAGCTGTTACACCTGTTAAGCGGGGAATAAGGTGAGAGATT
TACTAACGACGATTTTATCGTTATCGGGGATTTATCTGGAGCAGTGTAAACGCGATTTTCAGGCACGGTATCAAA
CTAGTATGCTGGGCGCACTATGGCTCGTTTTACAACCGCTCTCTATGATTCTGGTCTATACCCTGGTTTTTTCCG
AGGTGATGAAGGCAAGAATGCCCGATAATACCGGGTGGTTTTGCCTATAGTATTTATCTCTGTTCCGGGGTACTGA
CCTGGGGATATTTTACTGAGATGCTGGATAAAGGTGAGAGCGTATTTATTAACAATGCTAATCTGATCAAGAAAC
TCAGTTTTCCGAAAATCTGTCTGCCGATCATCGTGACGTTATCGGGCGGTGCTAAATTTCCGCGATTATTTTCAGTC
TGTTTTCAATTTTTATCATTGTACCGGTAACCTCCCGGCTGGCTCTTTCTCTCGGTGATACCGGTCCCTGCTTT
TGCAGATCCTGTTTTGCGGTGGGATGATCCTTGGTGTGCATGAACGCTTTTTTCAGGGATGTGGGGCAAC
TGTTTGGCGTTGCGCTGCAATTCTGGTTTTGGTTTACACCCATTGTTTTATGTAATTCATTACCTGCATGGG
CAAAAAATCTGATGATGTATAACCCGATGACTCGGATCATGCAATCTTATCAGTCCATCTTCGCTATCATCTGG
CCCCAACTGGTATTCGCTATGGCCAGTATTGGCTCTCGCCATTATTTTCTGCGTCTCGGTTTCAGGATGTTCC
GCAAGCATGCGGGCGATATGGTGGATGAATTATAATGAGTTATATCAGAGTAAATAATGTCGGTAAGCCGATCG
CCAGTATCACTCAAAGACCGGGAGACTGATCGAATGGTTATCCCCTCTGAATACCAAACGCCATAATTTGAAATG
GATCCTCCGCGATATTAATTTCAAGTCTCGCTCCGGGCGAGGCTGTCCGTTATTCGGTATCAACGGTGCAGGCA
GAGTACCCTGCTTAACTCATAACCCGGAGCTCCAGGCCGACGACTGGAGAAAATTGAAATCTCCGGACGTTCTCG
TGCATTACTCGAATGGGGATGGGGTTTTATTCTGATTTCACTGGTGGCAGAAATGTTTTATATGTCTGGCAACT
GTTGGGGTTATCGTCAGAGAAAATAACTGAACTGATGCCGAAATGAAGAGTTTGTGAGATTGGGGACTATAT
CGATCAACCTGTGCGCTCTACTCCAGTGGGATGCAAGTTCGATTAGCTTTTAGTGTAGCGACGGCTATCCGTCC
TGATGTGCTAATTATCGATGAGGCATTATCTGTTGGGGATGCATATTTCCAGCATAAAAGCTTTGAGCGTATTCG
AAAATTTCTGTCAGGAAGGGACCACGCTGTTGCTGGTATCCCATGATAACAAGCGATCCAAAGCATTTCGACCCG
GGCCATTTTATTTGAATAAAGGCCAAATGAAATGGAAGGTGAACCTGAAGCAGTATGATGATTTATACAAATGCTCT
TCTGGCCGATAAACAAAATCAGTCCATTAACAAGTTGAGCATAATGGTAAAACGCAACTGTTTTAGGCACTGG
TGAGGTGACTATCTCTGAGGTTTCTCTCGATGAACAGGGCAATGTGACTGAATTTGTTTCGGTAGGGCATCG
TGTCAGCTTTCAGGTCACGTTGAGGTCAAGGACGATATTCCTGAGCTTGTGTGGGATATATGATTAAGGATCG
ACTTTGGCAGCCGATTTTCGGGACCAATACGTACCATCTCAATCAGACACTCACCTCCCTGAAAAAAGGAGAAAA
GCGTTCGTTCTTATTTCTTTTCGATGCGAGATTGGGGTTGGCTCCTATTTCTGTGCTGTCGCGTTGCATACTTC
CAGTACGACCTCGCAAAAACATGAATGGCGCATCTGGCCGTTGTTTCAACGTCGTTAACACGGAAACAACA
AGAGTTTGTGCGCGTCTCTGGTTGCCGCTGAACGGAGATTTCTTAAATGGGTTTCGTGTTTTATCGTTCATTT
GAAGAACGACACAGAGGTTTCGGTTGAAGAAATCAAGCGCCGCTTGAAGTTTTTATTTACCTTTTTCTGCAAGTCTG
AAGGACATTTATCCTGATGGCGTATTGCGGATATTGGTTGCGGACGTGGCGAATGGTTGGAGATCCTGACTGAA
AATGGCATTGCGAACATCGGCGTCTGATCTCGATGATGGCATGCTGGCGCGGCCAGGGAGCCGGACTGAATGTG
CAGAAAATGGATTGTCTGAGTTTTTGCAAAAGTCAGGCGGATCAGAGCCTGATAGCCTTGACCGGTTTTTCATATT
GCTGAGCATTTCGCGTTTTGAGGTCCTGCAGCAACTCGCCATGCATACCTACGGGTGCTGAAACCAGGTGGTTTTG
CTGATCCTCGAAAACGCCGAACCCGGAGAATGTAAGCGTCGGCACCTGTTCATTTTATATGGATCCAACGCATAAT
CATCCTCTGCCACCGCCACTGCTTGAAGTTTTTACCTATTCAATTATGGTTTTTACCCGAGCAATTACCGTTCGTCTG
CAGGAAAAAGAGGTTCTTCAATCTCCGGATGCAGCCGTTAATTTGGTCGATGTAACAAAGGGGTGAGCCCGAC
TACAGCATCATTTGCTCAGAAAGCAGCGCAACAGATATTTTGAACGCTTTGACACCTGTTTACCCAGCAGTAC
GGTCTGACGCTGGATGCTCTGAGCAACCGTTACGATGCGATTTTTGCGCCAACAGTTTTTCGTCCGTTGTCTCACGG
CTGGAGACGTTGAACCAAACCTATATGCAACAGATAAGCCAAATGTGAGAGACTATTGAGCGTTGCAAGGTGAG
GTTGACGATCTGAGTCATGTCATCGATCAGAACCATCAGCTTCATCAGCAAATGGCGGATTTACATAACAGTCGT
TCATGGCGTATTTACTCAACCACTACGCTGGTTGTCTTTGCAACGTCAATTATTACGTGAGGAAGGGGCTAAAGTG
CGAGCCCGTAGGGCTGGGAAAAAATATTGCGCAAAGGGATGGCGCTCTCGCTGGTCTTTTTCCATCGTTACCCT
AAGTCTAAGGTTTTATCTGTTAAGGTTCTGAGAAAACTGGCTGCTATACATTGCTACAACGTTTTGTTCCAACGC
GTAATGCTGGTGAATCTGACACGATGATGATGCAGTCCAGAAGATATGATGTGGTACTGAAGAAATGACAAGT

CGCGCGATGAGTATTTATAACGAATTAATAAATAAAAAATACGGAGAAAATAACGATGCGTATTGTGCATAGATTTAC
AAGGCCGACAGACGGAAAGCCGCTTTTCGTGGCATCGGTTCGTATAGTATCGCAATCGCCAGAGGCATAATCAGAA
ATAACAGCCGGCATGAGATTTTCATCGCGCTATCCGCCATGCTGGATGAGTCGATTGCAAATATTAAGCCGCAAT
TTGCCGATCTCTCCGCCGAGAAAATATAGTCGTATGGCATGCCGTAGGCCCTGTTTCGTGCGATGGACCAAGGTA
ATGAATGGCGTCGGGAGAGCGCAGAACTGATTCGGGAGCGCTTTCTTGAATCATTGTGTCCAGATGTCGTTTTCA
TTACGAGTTTTGTTGAAGGTCATGTCGACGATGCGGCTACATCGGTACACAAAATTTAGTCGTGAGTATAAAGTAG
CCGTTACTGCACCACGATCTTATCCCCCTCGTGCAGGCGGAAACCTATCTGCAGGACGATGATACAAAACCCCTACT
ATTTACAGAAAGTTGAGTGGTTAAAAACGCTGACCTTTTGTGACTAACTCTGCTTATACCCGACAGGAAGCGA
TCGAGCATCTGCATTTACAGGGCGATCATGTGCAGAATATTGCAGCCGCGAGTCGATTCTCAGTTTTGTATGGCGG
AGGTGGCAGCGAGCGAAAAAGAGACCGTCTTGGCCATTACGGTATTACGCGCGAGTTCATGTTGTATGCGCCCG
GAGGATTTGACTCAAGGAAAAACTTTAAACGGTTTATTGAGGCTATGCCGGGCTCAGTGATGCTTACCGTCCGA
GTCATCAACTGGTCATCGTCAGTAAGCTTTCCATCGGTGATCGTCAGTATCTGGAATCCCTTGCCTCAGGTAATG
GTTTACAGCAGGGCGAACTGGTACTCACTGGTTATGTGCCGGAAGATGAGCTGATCCAGCTCTATCGCCTATGTA
AGCTGTTTACTTTGCTTCACTACATGAAGGTTTTGGGTTGCCGGTTCTGGAAGCAATGTCGTGCGGTGCGCCGG
TGATTGGCTCAAATGTACCAGTATTCCTGAAGTCATCGGTAATCCTGAGGCATTATTGACCCCGTATTCTGTCT
CTTCCATGAGGGATAAGATCGCGCAATGTTTACTGATGATACCTTCTCGCGCGTCTGAAAGAAATGGCGCAGC
AGCAAGCGCGTAATTTCTCTTGGGATAAAGCTGCGGTGACTGCTCTGGAAGCTTTGAAAAGATCGCGGTAGAA
ACACCGTACTGCGCAGGTTTTGCTTGAAGCTTTGATTGAGGCAAGATCCTTGCCTATCTCAAGGGCAGCCAGATG
ACCGCGATCTGCGCTTGTGCGCAACGGCCATTGATTACAATCTGAAAACGGCAGAACTTTATCAAATCGACGATA
AATCGCTGAACTGGCGTGTGGAAGGCCATTGATAGCTCATATAGTCTGGCGTTGGTCAACCGCAATTTGCC
GGGACTCTCAGCCGATGGTGTAGAGGTTTTATTGCATTCCTACTGAAGGACCGAGTATTGTTGCCCGAGATGCT
CGTTTTATGGCACAGTCGAAAATAGTGATCTTCTGGCATTTTATAATCAATGTGACACCCGCAAGAGTAACGAAA
AGATAGATATTTATAGCAGAAATATCTATCCACCGCGGTTACCAAAATGGATGCCAAAGTAAAATTCCTTCAAT
GTTATGCTTTGGGAGAAAACGGGCTTTCCGCAACCGTGGATCAATGAATTTAATCGGGAACCTTGACGGGATGCTGT
GTACTTCGGAACATGTTTCGTAATAACTGATTGATAACCGACTGAATGTGCCCGCATTTGTTGTTGGCAATGGCT
GTGACCATTGGCTCAATATCCCAGCCGAGACGACAAAAGATGTGGATCACGGAACATTCGGTTTTCTGCACGTCT
CTTCTGTTTTCCCACGCAAAGGGATACAGGCAATGCTTCAAGGCTTGGGGGAAGGCGTTCACTCGTGCATGACAATG
TTATCTTAATCATTAAAGACTTTTAAACAATCCGCACAATGAAATGACGCATGGCTGGCTCAGGCCAGGCTCAAT
TCATAGACTATCCCAAAGTTGAAGTGATCAAAGAGGATATGTGAGCCACCGAGCTTAAAGGGCTTTATGAAAGCT
GTGATGTTTTGGTTGCTCCAGGTTGCGCTGAAGGCTTTGGTTACCTATTGCTGAAGCAATGCTGAGTGGGCTAC
CGGCTATCGTCACCAATTTGGAGCGGGCAACTTGATTTGTTAATTACAAAATTCATGGCTGGTTGACTATCAGT
TCACTCGGGTAAAACGCACTTTGGTCTGTTTTCTCAGCCTGGGCCAGTGTGGATATTGACAACCTAACAGATG
CATTTAAAAGCGGCAGCCTCAACCGATAAATCAGTGCTGCGTGACATGGCCAATGCTGGTGCAGGCTTCTTCTGC
AGCAGTTTACCTGGAAAGCGGTTGGCTGATCGTTCTTGCAGGCGGTCAAGACTCTGCGTGCCGATATTGATATTG
CACAGCATCGGGCGCGCATTGGCTGGGTGACGACCTGGAACACGAAATGTGGGATCGCAACCTATTCACAGCATC
TGGTGGAAAGCGCACCTCATGGCGCGGATGTTGTTTTGCTCCCCAGGTGAGCGCTGGCGATCTTGTGTGTGCAG
ACGAAGAGTTTGTACTTCGCAACTGGATTGTAGGTAAGAGAGCAACTATCTGAAAACCTCCAGCCACACATTTG
ATGCTCTGAGACTCAGTATTGTGATCCAATTAAGTAACTATGGAATTTTAAATCATCGAGAATTCGCGGCTTTA
TTCGTCGCCAGCATGACGCGGTCGTTTCAAGTTGTTATGACGATGCACTCAACTGTGGATCCGCTGGAAAAAGAGC
CGAGCTGGAATTTCCGCTTGTCTGAAATGAAAGAGGCGCTGGCACTTTGCGACCGGTTGTTGGTGCATTCGATTG
CCGATATGAACCGCTTAAAGATTTAGGCTTAACTGCGAATGTTGCTTTATTCGCGCAGGCTGTTATCACTACT
CCGCAGCGAGCGTCACACGTCAACAGCAGTCTTTACCGCTAATTGCGAGCTATGGCTTCTGCTTACCGCATAAGG
GCCTGATGGAAGTGTAGAAATCCGTCCATAGACTCAAGCAAGCCGGTAAACCGGTTGTTTACGACTGGTGAACG
CAGAGTATCCTGTTGGGAGTCACGCGATCTGGTGGCAGAGCTTAAAGCTGCTGCTCAGCGGTTAGGTGTTACCG
ATCTGATTGAGATGCATAATGATTTCTTACCTGATGCGGAGAGTCTGCGGTTGCTTTCAGAAGCCGATCTTCTGA
TTTTTGTCTATCAGAATACTGGGGAGTCTGCTAGCGGGGCGGTACGTTATGGTATGGCGACTCAAAAACCTGTTG
CGGTAACGCCCTGGCGATATTTGATGATTTGGACGATGCCGTCTTTAAATTTGATGGATGCAGCGTGCATGATA
TCAGTCAGGGGATTGACCGGATCCTGAATTCATCCGTGAACAGAATCTTTGGGAACAGGACTCAACACGCTG
CCGATGCATGGCGGGAACAACATGATTTCAAGCTGTTTACGCGCTCTGGTTAATATGTGTCAAGGCTTAGCTA
AAGCTAAATATTTTAAATAAAAATATCTCTTGTATTTTTGCTTTGAATACAAGAGGGGTTAGATAATGTGT
CAATTTATGAAAATATTTTTGCTACTGAGCCAATTAATAACCCATTAACGGGCATCGGTGCGGATTTCCCTGG
AGCTGGTTAAGCGGCTGGCGGTCGCCCCGGAATTAAGAATTAAGCTATTTACGGTGGCTGCTTTATAGAAC
AGATCCCTTTGGTGGAGAATAAAGCGATACCAAAGCCAGCAATCATGGTCTGTGTCGGGCTTTCTACGCCGAC
AGACGCTGTTGATTGAGGCTTATCGCTGCTGCATCCGCGGCCAGGCGTGGGCATTGCGCGACTATAAGGATT
ATATCTACCATGGCCCAATTTTTATCTGCCGATAAACTGGAACGCGCCGTGACCACGTTTTCATGACATATCCA
TTTTTACCTGCCCGGAATATCATCCAAAAGATCGGGTTTCGCTATATGGAGAAGTCCCTGCATGAGAGTCTGGATT
CGGCAAAGCTGATCCTGACCGTTTTCTGATTTCTCGCGCAGTGAATTTATCCGCTTGTCAACTATCCGGCGGAGC
GGATCGTAACCACCAAGCTAGCCTGCAGCAGTACTATATCCACGCGAGCCCGGAGAGTGTCTGCCGTTACTGC
AGAAATATCAGCTGGCGTGGCAGGCCACGCGCTATATATCGGCACTATGGAGCCACGTAATAATATCCGAGGCC
TGCTGCATGCCTATCAGCTGCTACCGATGGAGATCCGATGCGCTATCCGCTAATCCTTAGCGGCTATCGCGCT

GGGAAGACGATGTGCTGTGGCAGTTAGTCGAGCGCGGTACTCGGGAAGGCTGGATCCGTTACCTCGGATATGTTCCGGATGAAGACCTGCCGTATCTGTACGCAGCGGCCAGAGTCTTTGTTTATCCCTCCTTCTACGAGGGATTCCGGTTACCTATTCTGAAGCGATGTCTTCCGGTGTGCCGGTAGTATGCTCCAATGTCACCTCTTTGCCTGAGGTTGTTGGGATGCCGGCCTCGTTGCCGATCCTAATGATATAGACCGCGATTAGCGCGCAAATTTTGCAGAGCCTGCAAGATGATAGCTGGCGGAAATCGCCACCGCGCGCGGTCTTGCTCAGGCGAAACAGTTTTCGTGGGAGAACTGTGCGACACAGACCATTAACGCCATAAATTACTCTAAGGGTGTGAGTTGAGAGTTCTACACGTCTATAAGACTTACTATCCCCATACCTACGGCGGTATTGAGCAGGTCATTTATCAGCTAAGTCAGGGCTGCGCCCGCGGGGAATCGCAGCCGATGTTTTCACTTTTAGCCCGGACAAAGATACAGGTCCTGTCGCTTACGAAGATCATCGGGTCATTTATAATAAACAGCTTTTTGAAATTTGCCCTCCACGCCGTTTTCGCTGAAAGCGTTAAAGCGTTTTAAGCTGATTAAGATGACTACGATATCATCAACTACCATTTTTCCGTTTTCCCTTTATGGATATGCTGCATCTTTCGGCGCGGCTGACGCCAGGACTGTGGTAGCCCTATCCTGATATAGTGAACAAAAACGGTTAATGAAGCTGTACCAGCCGCTGCAGGAGCGATTTCTCAGCGCGTAGATTCGATCGTTGCCTCGTCGCCAATTACGTGGCTTCCAGCCAGACCCTGAAAAAATATCTGGATAAAACGGTGGTATCCGTTTTGGTCTGGAGCAGCAGGACGTGCAGCACGATCCGCAGAGGGTCGCGCACTGGCGGAACTGTCCGGGATAAGTTCTTTCTCTTCTCGTCGGCACTTTCCGCTACTACAAAGGGCTGCATATTCTGATGGATGCCGCTGAGCGTAGCCGACTGCCAGTGGTGGTTGTAGGGGGCGGGCCGCTGGAATCGGAAGTCGGCGTGAAGCGCAGCAGCGGGCTGAGCAATGTGATGTTTACCGCATGCTCAACGACGAAGATAAGTACATTTCTTCCAGCTCTCCGGGGCGTGGTATTTCCCTCGCATCTGCGCTCTGAGGCGTTTTGGCATTACGTTATTGGAAGGCGCAGCCTTTGCAAGCCGCTGATCTTGGCAGATCGGTACAGGTACCTTTTTCATTAACCAGGACAAAGTGGTGGTTGCGTGA TTCCGCCGAATGATAGCCAGGCGTGGTGGAGCGATGAATGAGCTCTGGAATAACGAGGAAACCTCCAACCGCTATGGCGAAAACCTCGCGTCTGTTTTGAAGAGATGTTTACTGCCGACCATATGATTGACGCCTATGTCAATCTCTACACTACATTGCTGAAAAGCAAATCCTGAGCGGCCCGAGCTCGTCGACTCGAGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCTCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACCTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTCAGGCCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGGATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCCGTTATGGCAGGTATGGAAACGCAACCTTGGCCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTTCAACCGTTTTCCGTGAGAAGACGGAAAGAGTGATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAACTGGTTCTTACTATAACGGTGAAGAGTTTTGTGCAATCTCTGAAAACGCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATGATGGTGGTAAACCTTCTTCCAGGACACTATTCGTCGTAATCGTGAGCTTCAGCAGAGGCTTTAACTTCATCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATGGTAGCACCGATCCTGACCAAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTTGGTGGCGATGGCGCAGGTCACATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATGGAAACGCGGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTC ACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGAAATAACGGTGAACGAGCAGTTACCTGATCGACATCACCAAAGATATCTTACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACCGGTAATGGACCAGCCAGAGCGCGTGGATCTCGGCGAACCGTGTGCTGATTACCGAGTCTGTGTTGCACGTTATATCTTCTCTGAAAAGATCAGCGTGTGCCGCATCTAAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTCGTCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGCCTGCTGAAGAGTCAAACTGGGATCTGAACTACGGCGAAATCGCGAAGATTTCTGCTGCTGGTACTCCGTCCGTGCGCAGTTCCCTGCAGAAAATCACCAGATGCTTATGCCGAAAATCCACAGATCCGCTAACCTGTTGCTGCTCCGTACTTCAAGCAAATTCGCGTACTACCAGCAGGCGCTGCGTGTGCTGCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCCGGTCCGACCTTCTCCGCAGCGGTTGCCATTTACGACAGCTACCGTGTGCTGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTACTATTTGGTGGCATACTTATAAGCGTATTGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

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

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCGATACCCAAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCACTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAA GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACCGCGTGCAGAAACCACTTCGACACCTTTATGAGTTAGAATCACTCCTTGAGCAGCGGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTTATG AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTTGGTACAACCCA TTTGTGCTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCGCTACGTTACAACCTTGTGCCATGATTGCACGTTTTCAACGAAACGGGCCAGCCAGGTGCTGGCAAAACGATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCCGTCATCCAGACTAAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGATCAGCCGACAGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTGCTGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAAGTGAACGCTACTCAGCTGGTGCATGGGACGTAATTCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAACAATCCGTTGATGCAATGCTGATGACCGGCAGGTTACGACTGCGGCAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTTGTGAAGTATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA

TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAGTAATTTGTTGCGAA
 TCTTCCTGCCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA
 GGATTTTTCTTGTTTCCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCGTTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA
 ACGTCGTACATCATAGGCATGCATGCATGCTCTGTGTAGCTGTAAAGCCAGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC
 CTCTATTAATCAAACCTGAGAGCCGCTTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGCTAGCATG
 AGCAAACCTAAACTAAATGTTCTTTACCTTGCAATAAGTCAGGGTGCCAATTACCTACTGCCATTATTAATTTTT
 CCTTATCTTGTAGAGTCATTGGTGTATCGAATTTTTGGTGTATCTGAGTTTTTCATTGATAACTATAACAAGTGTG
 TTAATGGTTGTTGAATATGGTTTTGGATATAGTGGGACAAGAGAAATAGCACTAAATAACGATAAAAAATACCAT
 TCTGAATTTTTTGGCGTGTGGTGTCTGCTGTTTTATTAATGCTAATTCAGCTATAAATACTCATAATACTC
 TTTTTTTTTATTTTTAACGACGTTAAGTCTTTGTTATGTGTGGTTTTCTGTCCGTAATTCAGGTTGTTTTT
 AATCCAAATTTGGTTTTGCAAGGTAAGGAAATGATGAGTGTGATGGCTGTGCTGCTACTATTTTTACGAGGCATA
 GCAGTCGTTGCAGTTTTATCTAATTATAAAACCCGCAACGCCGATGTACATCAGTGCCTTATTATTGAGCATGCCA
 TATATTTGTAATCTCTGTGGCGTTGCCTACTTACTTATTATCAAGGAGATTTTTTTATGTAGGCCACCATA
 AAGAAAATCAAGTAATTTAAAAAATGGATTTCATTTTTTTTGTTCAACACTTGCAGTGTAGTGCATACACAATG
 TTGACCCCTCTGTATTGGGTGGCGTATCTGGAAAGTTGATGTAGGCATCTTAACTCAGCTAACATGATCAAAA
 CAAGGTTTGGCTGGACTTGCATCACCATTAGTCCAAGCTTTTTATCCAAGAATTAACATTTTTGCAAAGAGAGAAT
 CCATATATTGCAAACCTAAAACTAGAAATGATTCTTAAATACTTGGCTTGTTTTTTACATGGCTTTAGCAATACCA
 TTTTTACTTTTTGCCAACCAATTATCATTATTAATATTCGGCATGAAAGGTGAAGTAATTCAGGTTGCAATGCAA
 TTAATGACATTGCTTCTATATTCATAGGTTTTAATACAGTTGTGGGTTACTTGTATTAGTACCTAATGGGATG
 CAAAAACAGTATTTCAAATCTATTTTCTAGGAACCTACTTGTTTAAGCATAGTTTATCCAGCATGTAATAT
 TATGGAGCAACGGGTGCGATTGTGAGTCTTATTGTAGCTGAAATTTTTCGTTGGCATGGGAATGCTTAAACAATTC
 ATTAAGTAAATAAAACCGTATGTAGGCCCTATAAATTATGAATATCTCGGTAATAATATCTGTTTGGAAACGCC
 CAGTTCATAGAAATGATTCTCTGAGCTCGATTCTCAGGCTAAAGACAATAGTCTACACCTAGAAGTAATTTG
 TTTCCGATAGTCATAGTGGTAAGAAAATGATGATGTAGTTGCTGATAATATTCATAAAAAAGAAAATATTAATA
 TTATCCATCAACATACTAAAAATATACTCTCCGCTAAGCGCAATTTCCGAGCATCCCTAGCCCATGGGGATTATT
 TAATATTTCTTGATGATGATTGTATACCCGCAAGTGGATATATATCATCGTTGCTGACTATTTAAAAAAAATGA
 ATAGTAAAAGCGTTTTATGTGGGGAAGTTAGATTGCAAAATGAACCTATTGAGACCAGCAATTAATCTCCTACA
 GGAATCTTTACACCCTAAGTTAGTGATAGTCTGATATCTCTATGAATGCCTGGACTTTTTGTGCAATGAATTT
 GTGTTCTTGATAGAAAGGCATTTTATCAGGTATAGTTTATATAATGAAAATTTTTATTGGTTATGGTTGTGAAG
 ATCATGATTTGGTTGGCAACTTGAAAAAATGACTTCAAAATTAATTTTTGCTGATTTTAAATATTAATCACG
 AATACAGTGGCGATATAGAAGGATATACAAAAAAATTCGTGCTACAGCACGTGATGGTATGAATGTATTAAGCA
 AAGTAAGCCCTGAAATGTTTTCTACTAATAAAAAATTAATCTAGTTGAGAAAATATTTAGTAAACACAAAACGT
 TTAGTAAAATATGCCAATCAATATTTTCAATAAATTTATTTTTAAAAAATAATACAATTTTTAAAAAAAACAG
 ATGCAAATAAAAACTCTATTTCCCAATTTCTTACAGATATGTGTTGATTTCCGCATATATACATGGTATTGGAG
 AGCGTGGCACCTCAAAAACAGATGATTTGCTTAAGAAGTGGTATATATAGATGATGCTATCTTCATTTATTAAGA
 CATTTGTATGGAAGTTAAAAACAATGAAGTATAATGCATTTGATGGCTTTTTATTATTTTTTTGTTGTTTTTTTT
 AGATTTGCTGCTGATAAATCTTTCTTATATTTGGCATTATTTCTGCAATTTTTTGGTATTATGATTTTGGCT
 AATTTTTATGATTACTATGGGCAATGGATTGGTATCTATAGATCGTAAAAATTTGTTGCTGTTATCTATATTCATA
 ATTTATTTTTTTATTTTTGTTTGGTTTTCGATTTGTTTCAAAAAGCCATTCTTTCAAAGTTATTTTACCCTAGA
 TTATTTATGTTGTTTTATTTTTCAATTTGTTTCTGCTATTTATTTAGTAAATAGATTCAAAAAGGGTACTTGA
 TTAATGGAGCGAATATTAGTGTATTTCTCTGGGTTCAAATAGTTATTTTTTTTTGGTATGTATATAAGTCCAGAG
 TTAAGAAAGATTGTTATATACTTTCTTTGGTATGTCTGACTCTGTTAATCTTTGGGAACAAAATGCTAAAGTAA
 GGATTTGGGTTGTCGGGTGAAATAAATTTTATGACACCAATTTTTGATGATCTATATGTCATTTTTTATGATGAAA
 AGGCGTTATGCTTTAATTAATTTGTTGCTGACTCAAATCGTAAATTTCTAACATGGCTGTGATTGCAGCCATT
 ATTTGGTATCGGTTGCTCTAGACTTAATATTAATATAAAAAATGCAACAGTATTGATTTTGGGAGTTTTAGTTTAT
 AGCTTAGGAGCGGTGTTCTTTCTCGATTTTATGATGAGTTTCGTTTTCTGGAGATGGCACAAGAAGTCTGGATATC
 TTATTTACAGCAACATGTGTTGTTGTAGGTAATTTAGATTTTTTTAATATATATTTGGATTACAGCAAACATA
 TCTTCATCAATCCCGATATTAACAAAGTTCGGATATGGGCTGGTTATACTGTTTAAATACGGTGGGTTAACA
 TTTATTACACTTTTTTTATTTTTAATCTTTACTATTTCTATTGCGACATTTGGAATGACATATCAAGCAATATA
 TGGATGTTAATTTGGGATAATTTTTCAATACCAAGGTTTTAGTTTTAGGATCTAACGGCTATTTCTTTCTATCTTTT
 ATATATATGTTTTTGAATAGAGTAACACTTAGTGGACAGAGTTCAATTAATAAGTTAGGTCAAGTAAGTAAA
 TAGCTTCCAGAGTATATTTGTCAATGATTTGAGGTTCCGTTATTATGTTTTCATCTAAAACACTGTTAATTA
 CTG
 GTGGTACTGGCTCTTTCCGGGAATGCTGTATTAATAGATTTCTTGATACAGATATTGCAGAAAATCCGTATATTTA
 GTCGTGATGAAAAAACAAGATGATATGCGGAAAAAATAAATAATCAAAAATTAAGTTCTATATTTGGTGTATG
 TCAGAGATTACCGTAGTATTTGAAATGCGACTCGCGGTGTTGATTTTATATATCATGCAGCGGCCTTAAGCAAG
 TTCCATCATGTGAATTTTATCCTATGGAAGCCGTTAAACTAATATCCTTGGTACGGAAAATGTTCTTGAAGCAG
 CTATAGCGAATGAAGTGAAGAGGGTTGTATGCCTAAGTACTGATAAAGCTGTATACCCGATTAACGCAATGGGTA
 TTTCAAAAGCTATGATGGAAAAGGTGATGGTCCGGAATCCCATAATGTTGATCGCAATAAAAACAGTAATATGTG
 GTACCCGTTATGGGAATGTTATGGCATCTCGCGGTTGAGTTATCCATTTATTTGTTGATCTATTAGAGCGGGCA
 AGCCACTCAATAACTGATCCTAATATGACCCGCTTTATGATGACTCTTGGAGATGCGGTAGATTTAGTTCTTT

ATGCGTTTTGAACATGGTAATAATGGTGATATCTTTGTGCAAAAAGCACCTGCAGCAACTATTGACACATTAGCTA
 TTGCTTTAAAGGAATTACTAAATGTTCTGACCATCCGGTAAATGTCATTGGAACGCGTCATGGCGAGAAATTAT
 ATGAAGCTCTACTTAGTCGTGAGGAAATGATCGCTGCTATAGATATGGGCGATTATTACCGTGTCCCGCCAGATC
 TTCGTGACCTTAATTTAGGCAAATATGTTGAGCAAGGTGATAGCCGAATATCTGAAATAGAAGATTATAACTCTC
 ATAATACTCAACGGTTAGATGTTGAAGGCATGAAAGAGCTCTTGCTAAAATTAGCCTTTATTTCGAGCAATTCGTG
 CTGGTGAAAAATATAATCTGGATTCATGATATGAAAAATATTAGTTACTGGTGCAAATGGTTTTATTGGTCGTAAT
 TTATGTTTGAGGCTTGAGGAACCTGGTTATAAAGATCTTATTAGAATTGATCGAGAATCAACGAAGCAAGATCTT
 GAACAAGGCTTACAGGATGCCGATTTTATTTATCACTTAGCTGGTATCAATAGACCTAAGACTGATGATGAGTTT
 ATTTCTGGAAACAGTGATTTAACAAAGCATATAGTTGAGTATCTCCTTTCTATTGGTAAGAATACACCAATTATG
 CTAAGTTCTTCGATACAAGCTGAACTTAATAATGCTTATGGGGTTAGCAAAGCTGTAGCTGAAAGCTATGTGCAA
 AAATATGCTGCTGCTAGTGGTTCTTCGTATTATATTTTTCAGATATCCAAACGTTTTTGGTAAATGGTGAAGCCA
 AACTATAATCTTTTATAGCAACTTTTTGCTACAATATTTCCAATGATATTGAGATTACTATCAATGATGACAGCA
 ACGCCAGTCAATCTGGTCTATATTGATGATGTTTTGTACTGATGCTATAGCTCTTCTCTCTGGGACGGTTGAAAGT
 GGATATAAAGTTGTTGCACCAATTTATTCAACAACAGTTGGTGAAGTTGCAGAATTAATTTATAGCTTCAAAAAT
 AGCCGTTCCACCCTGATCACAGAGGCTGTCGGGGCGGGATTTACCCGTGCATTGTATTCTACATGGCTGAGTTAT
 TTACCAGCAGAGAAGTTTGCCTACAAGGTACCTTTTTATGGGGATGCCCGCGGAGTCTTTTTGTGAGATGTTGAAA
 ACGCCTTCAGCGGGGACGTTTTTCATTTTTACTGCTCACCTGGTATTACGCGTGGCGGACATTACCATCACAGT
 AAAAATGAGAAGTTTTTGGTCATTTCGAGGTGAGGCATGCTTTAAATTTGAACATGTGATTACCGGTGAGCGATAT
 GAATGAAAGTTTTCATCGGGTGGTTAAGATTGTTGAAACAGTTCTGGTTGGACACATGACATTACAAATATT
 GGAAGTGTGAATTAATAGTCATGCTCTGGGCAAATGAAATTTCAACCGTATGAGCCCGATACATTGCGAGA
 CCTCTATAATGAAAAAATTAAGTTTATGTCTGTTGTTGGAACCCGTCCTGAGATTATCCGTTTGTGAGGGTTT
 TTGCTAAGTTTGTGATAACTGCGAGCATATTATTGTCCATACTGGTCAAATTTATGATTACGAATTAATGAAG
 TGTTCTTCAATGACTTGGGTGTTGCAAAACCTGATTATTTTTTAAATGCAGCGGGTAAAAATGCGGCGGAAACCA
 TTGGTCAGGTATTATTAAGGTAGATGAAGTATTAGAAATCGAAAAACCTGAAGCAATACTGGTATTGGGCGATA
 CGAATTCATGATTTCTGCCATTCGGGCCAAACGCCGTAAAGTGCCTATATTTCAATATGGAAGCAGGTAACCGTT
 GTTTGATCAACCGGTGCCTGAAGAAACCAACAGCAGTATTGTTGACCATACGGCTGATATCAATATGACCTACA
 GTGATATTGCTCGTGAATATCTCTGGCTGAAGGTATCCAGCTGATCGGATCATAAAAACTGGTAGCCCTATGT
 TTGAGGTTCTTTCATATTATATGCCCAAATGATGGTTGATGCTATCGCGTTTGAATCTACAGTCTGGTG
 AGTTTTTTGTAGTAAGTGCAGCATCGTGAAGAGAATGTTGATTCTCCAAAACAGCTCGTAAAGCTTGCAGAACATTC
 TAAATACTGTTGCTGAAAAATATAATCTTCCAGTTATTGTCTCCACACACCCCAAGGACACGTAACCGAATCCGTG
 AGCAAGGAATGAATTTTCAATCAAATATAAATCTACTGAAACCATTTGGGTTTCCATGATTATAACCACTTGCAGA
 AGAACTCACGAGCTGTGCTTTGAGATAGCGGTAATCACTGAAGAGTCATCCATCATGAATTTCCAGCGGTAA
 ACATCCGGGAAGCGCATGAGCGTCCGGGAAGGCTTTGAGGAAGCATCCGTGATGGTGGGGTTAGAGTGTGAAC
 CGGTATTACAAGCGCTGATATTCTGGCAACACACCCGAGGTGAAGTCCGTTTACGTTAGGTTAGTATTGAT
 ACAGCATGCCAAATGTGTGCGATAAAGTTGTGAGAATTTGTTCACTCTTACACAGATTATGTTAAGAGAGTCTGCT
 GGAAAGAATATTGATGAACTTGCTTTAATCATAGATGATTACCTGCCAACAGTACTCGTGTGGTGCAAAAAT
 GTTTCATGAACCTGCTCAAGAATTTATCCAGCGTGGGCACGATGTTACGGTAATTAATCTCTGGTACGGGCATGCA
 AGAAGAGATTTCTTTGATACCTTTGAGGGGTAACCAATGCGGTTTTTAAAGCGGGCCGCTCAAGGATGTAAG
 TAAAATTCAGCGAGCGGTCAATGAAACGCTTTTGTCTATCGGGCGTGGAAAGCCATCAAAAATGGGTAAAAAA
 AGAGACCTTTGAGGGGGTATTATTATTACCTTCCATATTTCTGGGGGCTTTAGTTAAAAAAATTAAGCTCG
 TTGCCAATGCTCTGCTTATTCTTTAAGAGATGTTTCCACAATGGGTAATTGATGCAGGAATGCTTAATGC
 TGGTTCCCAAATAGAACGCTACTTTCTGTTTTTGA AAAAATATCTTATCGTCAGGCAAATCGTATTGGACTTAT
 GTCTGATAAGAATCTTGATGTTTTTTCGAAAGATAATAAAGGCTATCCGTGCGAAGTTTTTGCCTAATTGGGCATC
 CCTAACCCAACGATCATACCCAAGGATTATATACCACTACGTAAGCGACTTGGCCTAGAGGATAAAACCATTTT
 CTTCTATGGTGAAACATAGGTCATGCACAGGACATGACAACTTGATGCGACTTGTGAGAAACATGGCAGCATA
 TCCTCAAGCTCATTTCTATTTATTTGGCCAGGGGGATGAAGTTGAATTAATTAATTCATTAGCATCTGAGTGGGC
 ATTGACGAATTTACCTATTTGCCCTCGGTTAACCAAGATGAATTTAAGTTCATTTTGTGCGAAATGGATATCGG
 CTTGTTTTCTTTCCGCTAGACACTCTTCCATAATTTTCTGGTAAGTTATTAGGCTATATGGTTGAGTCTGCT
 ACCTATTTTAGGTAGCGTAAATGCCGAAATGATTTGCTGACATTGTCAATCAAATAATGCGGGATTAAATCCA
 TGTCAATGGTGAGGACGATAAATATGTCAATCTGCGCTATTAATGTTGCATGATATTGATGTGCGCCGCAACT
 TGGTTCGGGGGCGAATATATTGTTGAAAGAACAATTTCCGTTGAGTCTGCGGCACAGACGATAGAAATGAGGTT
 GGAGGCATGCAATGCGATTAATTGATAATGACCAACTCGACGAATTATATGATCAAGCCGGGCAATCGAACGTT
 TACGTTCCCACCTTATGATGCACGGCTCGCATCAAGAAAAGGTACAGCGTTTACTTATTGCATTAGTAAAGGGCA
 GCTATGTTGAACCGCATTATCACGAACTTCTCATCAGTGGGAAATGTTCAATGTTATGGAGGGGCAACTTCAGG
 TTTGTTTGTATGGTAGAAATGGTGGGTTATAAAGCAATTTATAGCAGGAGATAATACTGGAATGAGCATTGTGG
 AGTTTTCTCCGGCGATACACAGTGTGCAATGCCATCTCCGCTGCTTTATGGTGGAGTTAAGGAGGGGG
 CTTTTGACCTTCTTTTGA AAAATCGTTCTGTGTGAGCGCCGCGAGCTCGTGCAGTCCGAGGATCCGTTGAGGCTG
 GAGCTGCTTGAAGTTCTTACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTATATGG
 AATAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACA
 TTCCAGGCCGCGAGCATTGAGCGGGTATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTA

GTCGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAAC
 CGTTCCCGTGAGAAGACGGAAAGAGTGAATGCGGAAAATCCAGGCAAGAACTGGTTCCCTACTATACGGTGAAA
 GAGTTTGTGCAATCTCTGGAAACGCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTAAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCT
 ATTGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATATTGATGGTGGTAACACCTTCTTCCAGGACACT
 ATTCGTGTAATCGTGAGCTTTAGCAGAGGGCTTTAACTTCATCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGG
 GCGCTGAAAGGTCCTTCTATATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTGGTAGCACCGATCCTGACCAA
 ATCGCCCGCTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGCCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAG
 ATGGTTCACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTG
 AACCTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTACCAGTGGAAATAACGGTGAAGTGAAGCAGTACCTGATCGAC
 ATCACCAAAGATATCTTCAACCAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCT
 AACAAAGGTACCGGTAATGGACCAGCCAGCGCGCTGGATCTCGCGAACCGCTGTCGCTGATTACCGAGTCT
 GTGTTTGCACGTTATATCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTGGCCGATCTAAAGTTCTCTGCTGGTCCGCAAGCA
 CAGCCAGCAGGCGACAAGGTGAGTTCATCGAAAAGTTCGTGCTGCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTAC
 GCCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGTGCTGCTGTAAGAGTACAACTGGGATCTGAACTACGGCGAAATCGCGAAG
 ATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCTGCAGAAAATCACCGATGCTTATGCCGAAAATCCACAG
 ATCTCAACCTGTTGCTGGTCCGTACTTCAAGCAAAATTCAGGATGACTACCAGCAGGCGCTGCTGATGCTGCT
 GCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCCGGTTCAGACTTCTCCGCGAGCGGTTGCCTATTACGACAGCTACCGTCTGCT
 GCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTACTATTTTGGTGCGCATACTTATAAGCGTATTGATAAA
 GAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

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

ATGACGAATTTAAAGCAGTATTTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGGGATACCC
 AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCACTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAA
 GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAGAACCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA
 CTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG
 AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGAACCCCA
 TTTGTGCTGCTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATG
 ATTGACGTTTCAACGAAACGGGCGCAGCCAGGTGCTGGCAAAACGATGCGGGGTGACCTCTCTGAATACTCC
 GTCATCCAGATAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAAGCGGATTTGTTGAATTTATCGAAAACCGGAT
 CAGCCGACAGCCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGTGCCTATGTCTTCTGCCGATATTTGGCCGAACTG
 GAACGTAATCAGCCTGGTGCATGGGGACGTAATCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAACAATCC
 GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACGTTACGACTGCGGCAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG
 TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGGCAAGTTCGGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAA
 TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATATAACGGCAGTGAATTTCCGACGAAAAGTAATTTGTTGCGAA
 TCTTCCGCGTGTGTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTCCAA
 GGATTTTCCCTGTTTCCAGAGCGGATTTGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGGAGTGGGTA
 ACGCTCGTCACATCATAGGCATGCATGCAGTGTCTGGTAGCTGTAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC
 CTCTATTAATCAAACCTGAGAGCCGCTTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGTGAATA
 CTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTTGGTTCAGCTGTAGTTCGTCAATATAAATAATACGCAGGATAGTGT
 GTTAATGTCGATAAATTAACGTACGCCGAAACCGGAATCACTTGTGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATGTT
 TTTGAACATGCGGATATTTGCGATGCACCTGCAATGGCAGGATTTTGTGCTCAGCATCAGCCGGATGCAGTGATG
 CACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTTGACCGTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTTGGT
 ACTTATGTCCTTTTGAAGCCGCTCGCAATTAAGTCTGCTCTTGTATAGCGACAAGAAAAATAGCTTCCGTTTT
 CATCATATTTCTACTGACGAAGTCTATGGTGATTTGCCTCATCCAGATGAAGTAATAATACAGAAGAAATACCC
 TTATTTACTGAGACGACGCTTACGCGCAAGCAGCCCTTATCCGCATCCAAAGCATCCAGCGATCATTTAGTC
 CGCGCGTGGAAACGTACATATGGTTTACCAGCAATTTGACTAATGCTCGAACAACATATGGTCCCTTATCATTT
 CCGGAAAAGCTTATTTCCACTGTTTATTCTTAATGCACTGGAAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAAAGGAGAT
 CAGATCCGCGACTGGTTGATGTTGAAGATCATGCGCGTGCCTTATATACCGTTCGTAACCGAAGGTAAGCGGGT
 GAAACTTATAACATTTGGTGGCACAACGAAAAGAAAACATCGATGTAGTGCTCACTATTTGTGATTTGCTGGAT
 GAGATTGTACCGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAATCACTTATGTTGCTGATCGTCCGGGACACGATCGCCG
 TATGCTATTGATGCTGAGAAGATTGGTCCGCGATTGGGATGGAACCACAGGAAACGTTTGAAGCGGGATTTCGT
 AAAACGGTGAATGGTACCTGTCCAATACAAAATGGTTGATAATGTGAAAAGTGGTGCCTATCAATCGTGGATT
 GAACAGAATGAGGGCCCGAGTAATGAATATCCTCCTTTTGGCAAAACAGGGCAGGTAGGTTGGGAACCTAC
 AGCGTGCTTGGCACCTTTGGGTAATTTGATTGCTTTTGTGTTCACTCTACTGATTATTGCGGTGATTTTAGTA
 ATCCTGAAGGTGTAGCTGAAACCGTAAGAAGCATTCCGCCGATATTTGTCAATGCAGCCGCTCACACCGCAG
 TAGACAAAGCAGAAATCAGAACCGGAGTTTGCACAATTAATTAACGCAACAAGTGTGGAAGCGATTGCGAAAGCAG
 CAAATGAAGTTGGAGCCTGGGTTATCCATTAAGTCTGACTGATTACGCTTTCCTGGAATGGCGATATGCCATGGC

TGGAGACGGATGCAACCGCACCTAAATGTTTACGGTGAACCAAGTTAGCCGGAGAAAAAGCGTTACAGGAAT
 ATTGCGCGAAGCATCTTATTTTCCGGACCAGCTGGGTCTATGCAGGAAAAGGAAATAACTTCGCCAAAACGATGT
 TACGCTGGCAAAGAGCGTGAAGAATTAGCGGTATTAACGATCAGTTTGGTGGCCAAACAGGTTGCTGAAGTGC
 TGGCTGATTGTACAGCACATGCCATTCTGTGCTGACTGAATAAACCGGATGTGCGAGGCTGTACCATTGGTAG
 CCAGTGGTACCACAACCTGGTACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGCATTTCCCTTG
 CACTCAACAAGCTCAACGCGATACCAACAACAGCCTATCCTACACCAGCTCGTCCACATAACTCTCGCTTA
 ATACAGAAAAATTTGAGCAGAACTTTGCGCTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTTGGCGTGAACGAATGCTCAATG
 AATTATTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTGATGGTGGAGCAAGATGAATTTAAAGGA
 ATGATGAAATGAAATGCGTAAAGGTATTTATTTAGCGGGTGGTCTGGTACACGCTTTATCCTGTGACTATGG
 CTGTGAGTAAACAGCTATTACCTATTTATGATAAACCGATGATCTATTACCCGCTCTCTACACTGATGTTGGCGG
 GTATTCGCGATATTTTGGATTATCAGTACACCTCAGGATCCTCCTGTTTTCAACAATTGCTGGGTGACGGTAGCC
 AGTGGGGCCTGAATCTCAGTACAAAGTGCAACCTAGCCAGATGGCCTCGCGCAGGCATTTATCATCGGTGAAG
 AGTTTTATTGGTGGTGTGATTGTGCTTTGGTTCTGGTGATAATATCTTTTACGGTCCAGATCTGCCGAAGCTAA
 TGGAGGCGCTGTTAAACAAGAAAGTGGTGAACGGTATTTGCCTATCAGTTAATGATCCAGAACGCTATGGTG
 TCGTTGAGTTTTGATAAAAACGGTACGGCAATCAGTCTGGAAGAAAACCGTTAGAACCAGAGTAATTTACGCCG
 TTACAGGTCTGTACTTTTATGATAACGACGTGGTTCAGATGGCGAAAACTTGAAGCCGTCTGCACGTGGTGTGAT
 TAGAAATTACAGATATTAACCGTATTTATCTTGAGCAGGACGCTGTCTGTGCGGATGATGGGGCGTGGCTACG
 CGTGGCTGGACACGGGGACTCATCAGAGTCTGATAGAAAGCAAGTAATTTTATTGCGACAATTGAAGAGCCGAGG
 GATTGAAGGTTTTCTGTCTGAAGAGATTGCATTTCTGTAAGGTTTTTATTGATGTTGAGCAAGTAAGAAAATTAG
 CTGTACCATAATAAAGAATAATTATGGGCAGTATCTTTATAAAAATGACGAAGGATTCAAATTAATGAATGTGAT
 TAGAACTGAAATTTGAAGATGTGCTAATTTCTGGAGCCAAGAGTATTTGGTGTGATAGAGGTTTTCTTTTATGAGAG
 CTTTAAATCAATCAGCATTTGAACATATTTCTAGGCTATCCGGTTCAGCTTTGTTCAAGACAATCACTCACGTTTATC
 AAAAAATGTACTCAGAGGCTTTCATTTCAACGCGGCGAGTACGCACAAGATAAACTTGTACGCTGCATCATGG
 AGCATTTTTTGTGTTGCTGTTGATATTCGACCCAATTCCGTTATCCTTTGGTAAATGGTGTGTTCTGCTTTTC
 AGCTGATAATAAGCAGCAGTTGTGGATACCAAAAGGTTTTGCTCATGGCTTTTTGGTTCTGTCTGATATCGCTGA
 ATTTCAATATAAACTACAACTATTTATCATCCTGAAAGCGATTGTGGAATATGTTGGAATGATGAACGCATTGC
 AATTGATTGGCCCCAAACATCAGGGTTAATCCTTTCCGCCAAAAGATGAAAGGCTCTTTACGTTAGATGAGCTTAT
 CAGATTTAAATTAATTCATGAATACGAATAAATTATCTTTAAGAAGAACGTTATATATCTGGCTGTCTGTTCAA
 GGTAGCAATTTATCTTTTACCATTGCTTACATTTCCATATCTTGTAAAGAACACTTGGTCTGAAAATTTCCGTATA
 TTCGGTTTTTGGCAAGCGACTATGCTATATATGATAATGTTTTGTTGAATATGGTTTTCAATCTCACAGCAACTCAG
 AGTATTTGCCAAAGCAGCAGATAGTAAAGATAAAGTAACGCTATTTTTTTGGGCGGTGATTTTTTCAAAAATAGTT
 CTTATCGTCATTACATTGATTTTTCTTAACTGATGACCTTGCTTGTTCCTGAATATAACAAGCATGCCGTAATTT
 ATATGGTCTGTTTTGTTCTGCATTAGTCGGGAATTTAATCTACCCTATCTGGCTGTTTTCAGGGAAAAGAAAAATG
 AAATGGCTGACTTTAAGTAGTATTTTTATCCCGCTTGGCTATATCCCTTAACATTTATTTTTGTGAACACAAAG
 TCAGATATAGCAATTTGCCGGTTTTATTCAGTCAAGTGCAAATCTGGTTGCTGGAATTTATGCACTAGCTATCGTT
 GTTCAATGAAGGTTGGATTGGTAAAGTTACGCTATCATTACATAATGTGCGTGCATCTTTAGCAGACGGTTTTTCA
 GTTTTTATTTCCACATCTGCTATTTAGTTTATATTTCTACGGGAATAGTTATTTATCCTGGGATTTATATCCGACC
 ACGTCCGTAGGGAATTTTAAATGCGGCCAATACTATAAGAAACGCGCTTCAAGGGCTATTTAAATCCTATCACCCAA
 GCAATATACCAAGAATATCAAGTACGCTTGTCTTAAATCGTGTGAAGGTTGTGATTTTAAATTAAAAAATCATTG
 ACCTGCTGAGTTTGTGATTGGTGGTGTCTTTTTTATTAAATCTGCTCTTGGGTGCATCTATACTAGTAAAAATAAGT
 ATAGGCGGGGATATGATAATGCAGTATTGTGCTAATGATATATCGCTCTGCCTTTTCTTATTTCAATTAAGT
 AATGCTATGGCATTCAAGTTATGCTGACCCATAATTTAAGAAAGAATTCAGTAAGATTTTAAATCGCTGCGGGT
 TTGTTGAGTTTTGTTGTTGATTTTTCCGCTAACAACCTTTTTTAAAGAGATTGGTGCAGCAATAACATTTGCTTGCA
 ACAGAGTCTTAGTTACGTCACCTCATGCTGATGTTCTGTAAGAAATAATAAATTAAGTTGCTGAGGATTTTAT
 GTACGATTATATCATTTGTTGGTTCTGGTTGTTGGTGGCGTTTGTGCGAATGAGTTAAAAAAGCTAAACAAAAA
 AGTTTTAGTGATTGAGAAAAGAAATCATATCGGTGGAAATGCGTACACAGAGGACTGTGAGGGTATCCAGATTCA
 TAAATATGGTGCACATATTTTTTATACCAATGATAAATATATATGGGATACGTTAATGATTTAGTAGAATTTAA
 TCGTTTTACTAATTTCTCCACTGGCGATTTATAAAGACAAAATTTTCAACCTTCTTTTTAATATGAATACTTTCCA
 CCAAATGTGGGGAGTTAAAGATCCTCAAGAAGCTCAAATATCATTAAATGCTCAGAAAAAAAAGTATGGTGACAA
 GGTACCTGAAAATTTGGAGGAGCAGGCGATTTCAATAGTTGGGGAGGACTTATACCAAGCATTGATAAAGGGTTA
 TACGGAGAAGCAGTGGGGAAGAGTGCAAAAGAATTGCTGCAATTTATTTAAGCGAATCCAGTGAAGTTTAC
 GTTTGATAACAATTTATTTTTCCGATCGCTATCAAGGTATTTCCGGTGGGAGGCTACACTAAGCTTATTGAAAAAT
 GCTTGAAGGTGTGGACGTAATAATTAGGCATTGATTTTTTGAAGACAAAGATTCTCTAGCGAGTAAAGCCCATAG
 AATCATCTACACTGGACCCATTGATCAGTACTTCGACTATAGTTTTGGAGCGTTAGAATATCGCTCTTTAAATTT
 TGAGACGGAACGCCATGAATTTCCAACTTCCAAGGGAATGCAGTAATAAATTTCACTGATGCTAATGTACCATA
 TACCAGAATAATTGAGCATAAACATTTTACTATGTTGAGACAAAGCATACGGTTGTTACAAAAGAATATCCATT
 AGAGTGGAAAGTTGGCGACGAACCTACTATCCAGTTAATGATAAATAAAAACATGGAGCTTTTTTAAAGAAATATAG
 AGAGTTAGCTAGCAGAGAAGACAAGGTTATATTTGGCGGGCGTTGGCCGAGTATAAATATTTATGATATGCATCA
 AGTGATATCTGCCGCTCTTTATCAAGTAAAAATATAATGAGTACGGATTAATGATCTATCTTGAATTTAGTGTC
 TTTCTCATTACAGCATTTATCTGTTTTATATCTTAAAGAGGATATATTTTATCCAGCCGTATGCGTTAATATCATC

TTCGCACTGGTCTTATTGGGATATGAAATAACGTCAGATATATATGCTTTTCAGTTAAATGACGCTACGTTGATT
 TTTCTACTTTGCAATGTTTTGACATTTACCCTGTCACTGTTTATTGACGGAAAGTGTATAGATCTAAATATCAGA
 AAAGTCAATAATGCTATTTATAGCATAACCATCGAAGAAAGTGCATAATGTAGGCTTGTAGTTATTTCTTTTCG
 ATGATATATATATGCTAGGTTAAGTAACTACCAGTTCGGGACTAGCTTACTTAGCTATATGAATTTGATAAGA
 GATGCTGATGTTGAAGACACATCAAGAAATTTCTCAGCATACATGCAGCCAATCATTCTAACTACTTTTGGCTTTA
 TTTATTTGGTCTAAAAAATTTACTAATACAAAGGTAAGTAAAACATTTACTTTACTTGTTTTTATTGTATTCATC
 TTTGCAATFATACTGAATACTGGTAAGCAAATTTGCTTTATGTTTATCATCTCTTATGCATTATCGTAGGTGTT
 AATAGAGTAAAACATTATGTTTATCTTATACAGCTGTAGGTGTTCTATTTCTCCTTGTATATGCTCTTTTACGT
 GGACTGCCTGGGGGATGGCATATTATCTATCCATGTATTTGGTCAGCCCTATAATCGCGTTTCAGGAGTTTTAT
 TTTTCAGCAAGTATCTAACTCTGCCAGTTCTCATGCTTTTTGGTTTTTTGAAAGGCTGATGGGGCTATTAACAGGT
 GGAGTCTCTATGTCTGCATAAAGAATTTGTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 TATGTTTATATTTCCGCGGAGCTAAGCTATTTGATGATGGTTATTCATGGCTGTATTTTCAGGTGTTTTATGGAGA
 TTGTCTCGAAATACATATCTGTGAAATATTTTATTTCATATTTTATTATACCTTTTCTTTCATTTTTTATCAT
 GAAAGCTTCATGACTAATATAGCAGTTGGATACAAATAACTCTTTGTATCATAGTATTTCTCTCAATTTCTTAAG
 GCCCAGAAAATAAAGTAAAAATGATTTTTTTGAATGATTTAAATTTCTCTAGACCGGATGCTGGATTTAAAGCAA
 GAAAAGATGCACCTGGACATTTGCTTCAGATTATGAAAACATTTCTGTTGTTAACATTCCTCTATGGGGTGGAGTAG
 TCCAGAGAAATTTACTTCTGTTAAGCTTAGTACATTTCTTGCCTGCTTGGAAATAAAGATGTTTTAAATTTCA
 ATTTCCCGATGGCCAAACCATTTTTGGCATATATTGCTATTTCTTTCCCGCTTCTAAATTTAGAATAGTACCTC
 TGATTCATGATATTGATGAATTAAGAGGAGGAGGGGTAGTGATTCTGTGCGGCTTGTACCTGTGATATGGTCA
 TAAGTCACAATCCACAAATGACAAAGTACCTTAGTAAATATATGTCTCAGGATAAAAATCAAAGACATAAAAATAT
 TTTGATTACCTCGTCTCATCTGATGTGGAGCATCGAGATGTTACGGATAAGCAACGAGGGGTTCATATATGCTGGCA
 ACCTTTCTAGGCAATAATGTTCTTTTCATATATACTGAAGGATGCGATTTTACTCTCTTTGGTGTCAACTATGAAA
 ATAAAGATAATCCTAAATATCTTGGAAAGTTTTGATGCTCAATCTCGGAAAAGATTAACCTCCAGGCATGCAAT
 TTGGACTCATTTGGGATGGAGATTCTGTGAAACCTGTAGTGGTGCCTTTGGCGACTATTTAAAGTTTAAATAACC
 CTCATAAGACATCTCTTTATCTTTCAATGGAACCTCCAGTATTTATATGGGATAAAGCCGCCCTTGGCGATTTCA
 TTGTAGATAATAGAATAGGATATGCAGTGGGATCAATCAAAGAAATGCAAGAGATTGTTGACTCCATGACAATAG
 AAACCTATAAGCAAATAGTGAGAATACAAAATATTTCTCAGAAAATTCGAACAGGAAGTTACTTCAGGGATG
 TTCTTGAAGAGGTGATCGATGATCTTAAACTCGCTAAACGATATGGTCTCTGTGGTTTTATTCCGGCTTGTAGA
 GATGCTTATTGACTCGTGTATTTTACCAGCACTGTAGAATATTTCGATTTCCCTGCTATATTCCGAATGATGGT
 AGCATTAATTTTGGTGAATAATTTCAAGTGGAGTGGAGTCTCAGGCTGGATGCAATTTGGAGCTGGGATTTTT
 TTTTCCGATAATGTGCAAGTTAACGACTATGTTTCATATCGCCTCAATGAGAGCGTTACGATAGGTCCGGATACG
 CTTATTGCAAGTAAAGTATTTATTACCGATCATAATCACGGTTCCCTTAAAGCACTCTGATCCAATGAGTTCCCCA
 AATATACCTCCAGACATGCCACGTTGGAATCTTCAGTGTGTAATTTGGCCAGAGGGTTTGGTTGGTGGAGAAT
 GTGACGGTTTTGCCTGGAACAATTTTGGTAATGGAGTCGTAGTCGGCGCCAATTTCTGTTGTTAGAGGTTCTATT
 CCCGAAAATCTGTCTTGCCTGGGAGTACCAGCAAAAATCATAAAGAAATACAATCATGAGACCAATTTATGGGAA
 AAAGCATAGTCTGTTGTTTCTGCGGTCAATTTTACCACCTGGCGGTCCATTTACCATTTTGAAAAAATTTTGGCAG
 CAACTAATAATAAAGAAAATGTGAGTTTTATCGCATTAGTCCATTTCTGCTAAAGAGTTAAAAGAAAGTTATCCAT
 GGGTTAAATTCATTGAGTTTCTGAGGTTAAAGGGTCTGGCTAAAACGTTTGCACCTTTGAATATGTAGTTTGTA
 AAAAATTTCAAAGAGCTGAATGCTACGCATTTGGATTTGCTGCTGATGATATTACGGCCAATGTCTGCTACTAAA
 AAAGATATGTGATTTGTCATAACCTGCCCTTTTTTATAAAGGAATTTTATTCCGTGAAATTTCTTATGGAGCCTA
 GCTTTTTCTTATTTAAATGCTATACGGGCTGATATATAAATAAACATTAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATA
 AACAATTTGGATGAAAGAAAATTTATCAAGAAATATTTATAAATAAACATCATTGTCAGTCCGGCCAGAAATTA
 AATTATCTGATAAAGCCAACTTACTGATGATTTCTCAATTTAAGAATAAACCCTTCTGAGTTGACAAATTTTT
 ACCCTGCTGTTCCACGAGTATTTAAAATACGAGCTTATTATTAGTGCAGCAAGGAAATGAAAGAACAATCCA
 ATATTAATTTCTGCTTACTATCAGTGGTACAGAAAATGCGTATGCAAAATATATTATCAGTCTTGCAGAAGGAC
 TGGATAATGTTCAATTTCTCGGGTACTTGGATAAAGAAAAATCGATCATTGTTATAATATTTAGATATAGTTT
 GTTTTCCCTCTAGGTTAGAAACATGGGGATTGCCGTTGTCTGAGGCTAAAGAGCGAGGTAAGTGGGTATTAGCAT
 CAGATTTCCCATTTACTAGAGAACTCTTGGTAGTTATGAAAAGAAAGCTTTTTTTGATTCTAATAACGATGACA
 TGTTAGTTAAACTTATTTGACTTCAAAAAAGGTAACCTCAAAAAAGATATCTCTGATGCAAAATTTCAATTTATC
 GTAATGAAAATGATTTAGTTGGGTTTGTGAACTAGTTAATTTTATTACTGAAGAACATTTGAAATGGTATATATA
 ATAATCGTTTCCCACGGACATGAAGACTACATCAAAAAATTTACTCGAAAATCTTAATGCTGACGATGAGCACTAC
 AAGATTTATCGTACGCGACAACAAGACTCTCTATTATTGAAACAAATATGCCAGCATTATGCAGGCCGGACTAT
 ATTAGTGGAGGTGATACGGCTTTGGTCATAATAATAATATTGCGGTGGCGTATGTAAGGAAAAATATAGACCC
 GCAGATGATGATTACATTTGTTTTGAAATCCCAGATATCATCATGAAGCATGATGATTTGCTGACATATATTA
 TATGTCGAAAGTAAGCCTTATGCTTTTGTACTTATGCTGTTCCGAGATGAAGCGAAATCTTTACATGATTTAT
 TCCGTAAGAAAATTTCTGTGCTTTCTGATTTTATTGTGTCATTTATGTTAGGGATTAATAAAAACAAAAATTCCT
 AAAGAAAGTATCTATTCTGATACGGTTGTTGATTGGTGGCAGGATCATTTATGCTGGTACGTTTTTTCAGATTTT
 GTGCGTGTAAATGGCTTCGATCAAGGTTACTTTATGTACTGTGAAGATATTGACCTGTGCTTGGGGCTTAGCCTG
 GCTGGTGTGCAACTTCAATATGTTCCCGCTTTTTCATGCGATACATTTATGCTCATCATGACAATCGAAGTTTTTT
 TCAAAAGCCTTCAGATGGCACTTAAAAGTACTTTTAGATATTTAGCCAGAAAACGTATTTTATCAAATCGCAAC

TTTGATCGAATTTTCATCAGTTTTTACCCGTAAGAGCTCGGTACCCGGGCTAGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
 GAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACCTCGGAATAGGAACCTAAGGAGGATATTCATATCCGTCGACGGCG
 GCCGCCCTGCAGGCATGCAAGCTTGATCCATATGGATCGCTAGCTTAATTAATAAAGCCGTAAGCATATAAGCA
 TGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATCCAGGCCGCGAGCATTGAGCG
 CGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTATGGGACG
 CAACCTTGCCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGA
 AGTGATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAACTGGTTCTTACTATACGGTGAAAGAGTTTGTGCAATCTCTGGAAC
 GCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCTCAAACCATATCT
 CGATAAAGGAGACATCATCATGATGGTGGTAACACCTTCTTCCAGGACACTATTCGTCGTAATCGTGAGCTTTC
 AGCAGAGGGCTTTAACTTCATCGGTACGGGTGTTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGTGAAAGGTCCTTCTATTAT
 GCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATGGTAGCACCGATCCTGACCAAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGG
 TGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGCCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTGAATA
 CGGGCATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCACGAAGAACTGGC
 GCAGACCTTACCAGGTGAATAACGGTGAAGTGCAGCAGTACCTGATCGACATCACCAGGATATCTTACCACAA
 AAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGTAACAAGGTACGGGTAATGGAC
 CAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGCTGTGCTGATTACCGAGTCTGTGTTTGCAGTTATATCTCTTC
 TCTGAAAGATCAGCGTGTGGCCGATCTAAAGTTCTCTGTTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCCACAAGGCTGA
 GTTCATCGAAAAAGTTGCTCGTGCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCG
 TGCTGCGTCTGAAGAGTACAACCTGGGATCTGAACTACGGCGAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCAT
 CCGTGCGCAGTTCTTGCACAAAATCACCAGTGTATGCGCAAAATCCACAGATCGTAACCTGTTGCTGGCTCC
 GTACTTCAAGCAAATGGCCGATGACTACCAGCAGGGCGTGCCTGATGTCGTTGCTTATGCAGTACAGAACGGTAT
 TCCGGTTCGACCTTCTCCGAGCGGTTGCCATTACGACAGCTACCGTGTCTGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGAT
 CCAGGCACAGCGTGACTATTTGGTGCCGATACTTATAAGCGTATTGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATG
 GCTGGATTAA

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

ATGACGAATTTAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGCGGATACCC
 AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTAGTACATTTGTTGACGAGATTTGGCTGCAGGGATCAAA
 GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA
 CTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGCGTGACCATTATG
 AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCA
 TTTGTGCTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGTGCCATG
 ATTTGCAGCTTTC AACGAAACGGGCCGAGCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCC
 GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTTGTTGAATTTATCGAAAAACGGAT
 CAGCCGCAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTGCTGATGTTCTGCGGATATTTGGCCGGAACCTG
 GAACGTACTCAGCTGGTGCATGGGGACGTATTCTGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGCGGCAAAAACAATCC
 GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTCGCGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG
 TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGCGAAGTTCCGTAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA
 TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAA
 TCTTCTGCGGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA
 GGATTTTCTTGTTCAGAGCGGATTTGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCCGGTTTAGCCGAGTGGGTA
 ACGCTCGTACATCATAGGCATGCATGCAGTCTCTGGTAGCTGTAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC
 CTCTATTAATCAAACCTGAGAGCCGCTTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGTGAATA
 CTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTTGGTTGAGCTGTAGTTCGTCACATTATAAATAATACGCAGGATAGTGT
 GTTAATGTCGATAAATTAACGTACGCCGGAACCGGGAATCACTTGTGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATGTT
 TTTGAACATGCGGATATTTGCGATGCACCTGCAATGGCACGGATTTTGTCTCAGCATCAGCCGGATGCAGTGATG
 CACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATGTTGGT
 ACTTATGCTCTTTTGGAAAGCCGCTCGCAATTACTGGTCTGCTCTTGTATAGCGACAAGAAAAATAGCTTCCGTTTT
 CATCATATTTCTACTGACGAAGTCTATGGTGAATTTGCCTCATCCAGATGAAGTAAATAATACAGAAGAAATACCC
 TTATTTACTGAGACGACAGCTTACGCGCAAGCAGCCCTTATTCGCATCCAAAGCATCCAGCGATCATTTAGTC
 CGCGCGTGGAAACGTACATATGGTTTTACCGACAATTGTGACTAATTGCTCGAACAACCTATGGTCTTATCATTTT
 CCGGAAAAGCTTATCCACTGGTTATCTTAATGCACTGGAAGGTAAGGCATACCTATTTATGGCAAGGAGAT
 CAGATCCGCGACTGGTTGATGTTGAAGATCATGCGCGTGCCTTATATACCGTTCGTAACCGAAGGTAAAGCGGGT
 GAAATTTATAACATTTGGTGGCACAACGAAAAGAAAACATCGATGTAGTGTCTACTATTTGTGATTTGCTGGAT
 GAGATTTACCGAAAAGAGAAATCTTATCTGTGAGCAAACTACTTATGTTGCTGATCGTCCGGGACACGATCGCCG
 TATGCTATTTGATGCTGAGAAGATTGGTGCAGCATTTGGGATGGAAACCAAGGAAACGTTTGGAGCGGGGATTCGT
 AAAACGGTGGAAATGGTACCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAATGTGAAAAGTGGTGCCTATCAATCGTGATT

GAACAGAACTATGAGGGCCGCCAGTAATGAATATCCTCCTTTTGGCAAACAGGGCAGGTAGGTTGGGAAC TAC
AGCGTGCTCTGGCACCTTTGGGTAATTTGATTGCTTTTGTATGTTCACTCTACTGATTATTTGCCGGT GATTTTTAGTA
ATCCTGAAGGTGTAGCTGAAACCGTAAGAAGCATTCCGCCGGATATTTGTCAATGCAGCCGCTCACACCCG CAG
TAGACAAGCAGAAATCAGAACCAGGTTTGCACAATTAATTAACGCAACAAGTGTGCGAAAGCTTGC GAAAGCAG
CAAATGAAGTTGGAGCCTGGGTTATCCATTACTCGACTGATTACGTCTTCCCTGGAAATGGCGATATGCCATGG C
TGGAGACGGATGCAACCCGACCCTAAATGTTTACGGTGAAACCAAGTTAGCCGGAGAAAAAGCGTTACAGGAAT
ATTTGCCGAAGCATCTTATTTTCCGGACCAGCTGGGTCTATGCGAGGAAAAGGAAATAACTTCGCCAAAACGATGT
TACGTCTGGCAAAGAGCGTGAAGAATTAGCGGTTATTAACGATCAGTTTGGTGCGCCAACAGGTGCTGAACTGC
TGGCTGATTGTACAGCACATGCCATTCGTGTGCGACTGAATAAACCCGGATGTCGCGAGGCTTGTACCATTGGT TAG
CCAGTGGTACCACAACCTGGTACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGCATTCCCCTTG
CACTCAACAAGTCAACGAGTACCAACAACAGCCTATGCTACACCAGCTCGTCTGTCACATTAECTCGCCGCTTA
ATACAGAAAAATTTACAGCAGAATTTGCGCTTGTCTTGCTGACTGGCAGGTTGGCGTGAACGAATGCTCAATG
AATTATTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTGATGGTGGAGCAAGATGAATTAAGGA
ATGATGAAATGAAATGCGTAAAGGTATTATTTTAGCGGGTGGTCTGGTACACGTCTTTATCCTGTGACTATGG
CTGTCAGTAAACAGCTATTACCTATTATGATAAACCGATGATCTATTACCCGCTCTCTACACTGATGTTGGCGG
GTATTCGCGATATTTGATTATCAGTACACCTCAGGATACTCCTCGTTTTCAACAATTGCTGGGTGACGGTAGCC
AGTGGGGCCTGAATCTCAGTACAAAGTGAACCTAGCCAGATGGCCTCGCGCAGGCATTTATCATCGGTGAAG
AGTTTTATTGGTGGTGAATGATTGTGCTTTGGTTCTTGGTGATAATATCTTTTACGGTCACGATCTGCCGAA GCTAA
TGGAGGCCGCTGTTAAACAAAGAAAGTGGTGCAACGGTATTTGCCTATCACGTTAATGATCCAGAACGCTATGGTG
TCGTTGAGTTTGATAAAAACGGTACGGCAATCAGTCTGGAAGAAAACCGTTAGAACCAGAGTAATTACGCCG
TTACAGGTCTGTACTTTTATGATAACGACGTGGTTCAGATGGCGAAAACCTTGAAGCCGTCTGCACGTGGTGAGT
TAGAAATACAGATATTAACCGTATTTATCTTGAGCAGGGACGTCTGTCTGTGCGGATGATGGGGCGTGGCTACG
CGTGGCTGGACACGGGGACTCATCAGAGTCTGATAGAAGCAAGTAATTTTATTGCGACAATTTGAAGAGCGCCAGG
GATTTGAAGTTTTCTGTCTGAAGAGATTGCATTTCTGTAAGGTTTTATTGATGTTGAGCAAGTAAGAAAAAT TAG
CTGTACCCTAATAAAGAATAATTATGGGCGATCTTTTATAAAAATGACGAAGGATTCAAATTAATGAATGTGAT
TAGAACTGAAATTTGAAGATGTGCTAATTTCTGGAGCCAAGAGTATTTGGTGTGATAGAGGTTTCTTTTATGAGAG
CTTTAATCAATCAGCATTGAACATAATTTAGGCTATCCGGTCAGCTTTGTTCAAGACAATCACTCACGTTTCATC
AAAAATGTACTCAGAGCCCTTCACTTTCAACGCGCGGAGTACGCACAAGATAAACTTGTACGCTGCACCTCATGG
AGCAGTTTTTGTGTTGCTGTTGATATTCGACCCAATTCGGTATCCTTTGGTAAATGGGTTGGTGTCTGCTTTC
AGCTGATAATAAGCAGCAGTTGTGGATACAAAAGGGTTTTGCTCATGGCTTTTTGGTCTGTCTGATATCGCTGA
ATTTCAATATAAACTACAACTATTATCATCCTGAAAGCGATTGTGGAATATGTTGGAATGATGAACGCATTGC
AATTTGATTGGCCCAACATCAGGGTTAATCCTTTCCGCAAAAAGATGAAAGGCTCTTTACGTTAGATGAGCTTAT
CAGATTAATAATTAATGTCATGAGGCCGGCCTTAAGGAGGACTAGTCCCGGCGCGCCATGAGTTAATCAAAAACA
GTTTTTGAACCTTTGCGGGTATGTACTTCCAGCTATTGTGACACTACCAGCTTTGGGTATTATGGGGCGAAAAT
TAGGCCCAGAATTAATTTGGTGTATTCATTTGGCATTAGCTGTTGTGGGTTATGCAAGCATTPTTTGATGCAGGCC
TTACTCGCGCAGTGATACGAGAAGTCGAATTTGAAAAGATAATGAAGAAAATAAGTTGAAAATTAATTTCTTCAG
CGACAGTTGTAATTAATTTAGTGTGGCCGCTCACTCTTATTAATTTTTTTTAGTGGTCATATCGCATTGC
TACTGAACATTAGTGAGACTTTTTTTCATAATGTAAGTGTCTCGCTAAAATTTCTCGCAGCATCCATACCATTAT
TTTTGATTACTCAAATATGGTTGTCAAATTTAGAAGGTGAAGAAAGATTTGGTTTACTTAATATCTACAAATCAA
TTACGGGAGTGATATTAGCAATCTCACCGCATTATTTATACTTATTAACCCCTTTTGATGTATGCGATAATAG
GCTTAGTTCTAGCAAGGTTTTTATGTTTTATTTTGGCTTTTATAATTTGTACGATAAAGTGCTTAAAGCTAAAC
TAACAATCGATATACCAACAATTAAGAGATTGTTTATGTTCCGGTGGTTGGATTACAGTAAGTAATATCATCAGCC
CTGTGCTATCATATTTGATAGGTTTATTTGTTTTCAAATCAACTTGGGGCTGCTAATGTTGCTTTTTTATACTGCAC
CATCAGAAATTAATTTCTGGCTTAGTATAATCCAGGTGCGTTTTCAAGAGCCTTATTTCCAAGATTAGCTAATG
CAAATAATTCGCTGAAAGATATAAAAACGAAAAGATTAATTAACAATTTCACTTTTAATAATCATCACCCCTATT
TTTTGATTGGCGTGTATTTTTCAGAGAAGATAATGGTTTTATGGATGGGGGCATCAATTTTTTGGTGAGCCTGGTT
TGGTATTATCAATATACTGATTGGCTTTATTTTTAATGGATTGGCACAAGTACCATTTGCCAGTATTCAATCCC
GAGGTCATGCTAAGATAACTGCATTTGTTTCATCTCTAGAGTTGTTTCTTATTTATTACTTTTTATTTTACCTCA
TAAAAGCACATGGGTTGTTGGCGCGGATTTGCGTGGTCAGTGAGGATGATAGTAGATTATATAGCATTAAAGTC
TTTTGGACGGTAAGTATATTAATAAAAATAAAATTCAAAATGCAAGTTAATAAECTCATGGCTTTATTTGGGTAGGTG
ACAATTTATAATGATATATATATACTTTAACTTTCTTCTAGTTATAGCCATAATGTTTTCTCTTCTCGGCAC
AAAAAGTAGGATCACATCTCCATTACCTTTGCATTTTTTACCATGGTTACTAACTTTAATTTGTCCGGGATAAGTAA
TTACGATCAATTTTACGAGTTAATGAAAGAAGCTTTTACTCTTTGTTGATTTGGTTTACAGTTATTTTTATATT
TTATTTTATAGGGGAACTGGTAAATTATAAACGTGAAAATATAAATGTTTTATTATGGTCTTTTACATATTAATA
TGAATGTAAAAAATATTGGATCATTGTATCCCAATTTTATTATATACCATTTTTCGAAATATATATGGTTGGTAT
GGGGGGAGCAGATGGATTCTTTCTCAATTTACGTCTTGCAAATACATTTGGAGGGCTATACGGGTAAAAAATTTAT
CTTAATGCCTGCTGATATCCTCTAATGATGGCTATGTTTCGCAATTTGTTGCTAACAAAAACTTCCAAATTTAAA
TAAATACTCCATTTATTTCTGGATGTTTTGATTTGATTTGGCACAATGGGAAAATTTTCAATATTAACGCCAAT
ATTGACATATTTAATTTATTTATGACTTCAAACATAGATTTAAAGTAAAAAAAACAATAAAGTTTACATTTGTTGAT
AATTATATTAGCTTTAACTTTGCATTTTACACGTATGGCTGAGAATGACCACTCAACATTTTTTATCTATTTTAGG

GCTCTATATTTATTCCACCAATAATTGCTTTAGGCCAGTTGAATGAAGTAAATAGTAGTCATTTTGGTGAGTATAC
GTTTATAGATTCATATATGCTATAACTAATAAAATTTGGCCTTATTAAGAATTGCCAGTAAATACTATTCTTGACTA
TTCATACGTTCCCTGTACCAACAAATGTATATACTGCACCTCAACCATTTTACCAGGATTTTGGTTATACTGGCAT
CATATTTGGAGCAGTATATACGGACTAATATATGTGAGTTTATACACGGCCGGTGTTCGTGGAAATAATACACA
GGCATTACTGATTTACGCATTGTTTTAGTTAGCAGTTGCAACGGCTTTCTCGCTGAAACGCTAGTAACGAATTT
AGCTGGAATGTGATGTTAGTATTATGTACCATCTTACTATGGCGATTTACAGTAATATGCAAAACAGTACAGTA
ACCATTCTAATGGCCACCTACAATGGCGAGGCCCTTCATCAAAAATCAGATTTTGTCACTACAACAACAACATTT
TCTAACTGGCGGTTATTTATTCCAGGATGATGGGTCTACAGACAATACTATATCTATAATAAAAAACTTCCAAAA
TCTGACTCCAGAATTCGGCTAGTTGATGATAATTTGAAAGGTCAAGGTGCAGGAAAAAATTTTTATCGCTGATA
AAGTACAGCGAGACAGATTATACAATTTATTGTGACCAAGATGATATTTGGTTAGAAAACAAAATATTTGAATTA
GTAAGATATGCAAATGAAATTAATTAATGAATGTATCAGATGCGCCCTCGCTAAGTTTATGCTAATGGCTATAT
ATGGATGGTGAGGGTACAATCGATTTTTCTGGGATATCTAACAATCATGCTGATCAATTAAGGATTTTTCTTTTT
TTTTAATGGTGGATACCAAGGATGTTCTATTATGTTCAATCGTCAATGACCAAATTTCTCTGAATTATCGAGGA
TTTGTATATCTACATGACGATATCACAACTTAGCTGCATACGCTCTTGGTAAAGTTTATTTCTCCCGAAATAC
CTTATGTTATATAGACAGCACACGAATGCGGTAACCTGGTATCAAAACATTCGCAATGGATTGACTTCTAAATTT
AAATCACCAGTAAACTATCTTTTATCACGAAAACATTTATCAGGTAAAAAAATCTTTTTTTGAATGTAACAGCTCT
ATCTTATCAGAGACGAATAAAAAAGTTTTTTTTGGATTTTATTTTCAATTTTGTGAATCAATAATAAATTTACAGAT
TTTTTTAAGTTATGGCGAGGTGGGTTAGATTAATAACAGTAGAACTAAATTAATTAATAAATTTAAATACGG
AGAAAATTTAGCGAATGATTTCAATACTTACACCTACTTTAATCGGCAACATACTTTTATCAAGGCTATTTCAATT
CTCTTATATTACAACTGATAAAGATTTTGTGAGTGGATAATAATTGATGATGGTAGTATAGATGCAACAGCGGTAC
TTGTAGAAGATTTTAGAAAAAATGTGATTTTACTTTGATTTATTGCTATCAGGAAAATAATGGTAAGCCCATGG
CTTTAAACGCTGGTGTAAAGCTTGTAGAGGCGATTATATCTTTATTGTTGACAGTGTGATGCACTAATCTCCG
ATGCCATAAAATTAATTAAGAATCAATACATGATGCTTATCTGAGAAGGAAAGTTTCCAGCGAGTGGTTTTTA
GAAAAGCATATATAAAAGGGGGGATTTTGGTAATGATTTAAATAATTTCTCAGAACATATATACTAATTTAAATG
CGACTGAGATTAGCAATTTAATAAATGGTGTGATGTTGCATATTGTTTTAAAAAAGAAAGTTTGGTAAAAAATCCAT
TCCCCCGTATAGAAGATGAAAAATTTGTTCCAGAATTTATATTTGGAAATAAAATAACTGACAAGGCGAAGATTC
GATTTAACATAAGCAAAGTTATATATCTTTGTGAGTATCTTGATGATGGTCTTTCTAAAAATTTCCATAACCAGC
TTAAAAAATACCCAAAGGGGTTTTAAGATTTATTACAAAGATCAAAGAAAACGAGAGAAAACCTTATATAAAAAA
CAAAGATGCTAATTAGATATTTGCAATGTTGTTATTATGAGAAAATAAAATGAAAATACTATTTGTCAATACAGG
TTTTAGGCCTTGGAGGTGCTGAGAAGCAGGTTTGTCTTTTAGCTGATAAATTAAGTTTAAAGCGGCACCATGTAA
GATTAATTTCACTTTGGACATATGCTTAATAATAAAGTCTTTCCCTAGCGAAAATAATGTTAATGTCAATTAATG
TATGTCAAAAAACATTTCTGGAGTTATAAAAGGTTGTGTCAGAATTAGAGATGTTATAGCTAATTTCAAACCAGA
CATTGTACACAGTCATATGTTTCATGCAAACATTATCACTAGATTGTCTGTAATTGGAATCAAACAGACCTGG
TATTATATCAACTGCACATAATAAAAAATGAAGGTGGGTATTTGAGAATGCTCACATATAGAATAACCGATTGTTT
AAGTATTGTTGTACAAATGTTAGCAAGAAGCAGTGGATGAGTTTTTACGGATAAAAGCCTTTAATCCCGCTAA
AGCAATTAATATGATAATGGGATAGATACCAATAAATTTAAATTTGATTTATTGGCAAGGAGGGAAATTCGAGA
CGGTATTAATAAAAAAATGATGATAATTTACTTTGCTGCAGGTGTTAACGTTAGCTAAAGATTATCTCTAA
TTTTATTGAATGCAATGACTCTGCTTCCGTAACACTTTAAACTTATTATATTGGTGTGATGAAATGCGTGACGA
AATTAATATGCTTATAAAAAAATTTGCAATTTATCTAATAGGGTGTCTTTGTTGGGAGTTAAAAAATAATTTGCTCC
CTATTTTTCTGCATGTGATATTTTTGTTCTCTCTTCTCGTTGGGAAGGATTTGGATTAGTCTGGCAGAAGCTAT
GTCATGTGAGCGAATTTGTTGGCACGGATTCCAGGGGAGTAAGAGAAGTTATTGGTGACGATGATTTTTCTGT
ACCCATATCTGATTTCAACACAACCTTGCAAGCAAATTTGAAAAATTTGCTTTGAGCCAGATACGTGATCACATTTGG
TTTTCCGAATCGTGAGCGTATTTTAAAAAATTTCTCAATAGATACTATTATATGCAGTGGCAAGAACTCTATGG
AACTATAATTTGCTCAAACATGAAAGGTAGATTTATATTTGGAACGTGCTTTTTGTTTGAATTTAATTTCAATCT
CAATTTGAGATTTTTGTATTTCAAATAACCATCATAGCTAACGATGATTTGGTATTTATTTAAGATGCTTTCTAT
AAATATATTGACGTTTTTAATGCGCCGAAACGATTTGGGCTGGGAACAGAGAAGTAAACTGTTTTGAGAATGAAG
AGTTTTTGTAGATGTTTATGGATATTAATAATTTGATCCAGTGAATTAATTTATAATAAATCAAGATTTAATGT
TAATAAATGATAATCTTTCTGACACTCATATTAATTTAGAGTGGTACGTTTGGTAAACGGTAAACTATTATATG
ACAGCTAGAACAACATAAGTTTTGCACTTACAATTACTCCCACTCTTAAGTGGCGTTCAAAGGGTAACATTAAC
GAAATTAGTGCGTTATATACTGATTTATGATTTATACACTAGTTTGGCTCAAAAAAGGTCCACTAACAAAAGCATTG
CTGGAATATGATGTCGATTTGTCATTGTATCCCCGAACCTTACGAGAGAAAATACCCTAAAGAAATGATTTTAAAGCA
TTGTTCAAGCTTTATAAGTTTATAAAAAAAGAAAAATTTGACATTTGTGCATACACATTTCTTCAAAAAACAGGTATT
TTGGGGCGAGTTGCTGCCAAATTAGCACGTGTTGGAAAGGTGATCCACACTGTACATGGTTTTTTCTTTTCCAGCC
GCATCTAGTAAAAAAGTTATTACCTTTATTTTTTTCATGGAATGGATAGCAAAGTTCTTTACGGATAAGTTAATC
GTCTTGAATGTAGATGATGAATATATAGCAATAACAATTAATAATCAAGCGGGATAAAGTTTTTTTTAATTTCT
AATGGAGTAGACACTGATAAGTTTTCTCTTTAGAAAATAAAATTTATAGTAGCACCTTGAATCTAGTAATGGTT
GGTAGATTATCCAAGCAAAAAGATCCTGAGACATTTATGCTTGTGTTGAAAAACTGCTGAATGAAAATGTTAAT
GTTAAGCTGACACTTTTAGGAGATGGTGAACATAAAAGAACAGTTAGAAAAGCAGGTTCAAACGGCAAGATGGACGT
ATAATTTTTCATGGATGGTCAAGATAACATTTGTTAATTTTTAAAAGTTAATGATCTTTTTATATTACCTTCTCTT
TGGGAGGATGCCATTAGCAATTTTAGAAGCATTGAGCTGTGGACTTCCATGTATAGTCACTAATATTCCAGGT

AATAATAGCTTAATAGAAGATGGCTATAATGGTTGTTTGTGTTGAAATTAGAGATTGTCAGTTATTATCTCAAAAA
ATCATGTCAATGTTGGTAAAGCCAGAAGCTGATTGCACAGCAATCTACCAATGCACGATCATTTATCTGAAAAAT
TATGGATTAGTTAAAAGAAATAATAAGGTGACAGCTATATGATAATTAAGAGCTCGGTACCCGGGCTAGGGT
GTAGGCTGGAGCTGCTTGAAGTTCCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACCTAAGGAGGATAT
TCATATCCGTCGACGGCGCCGCCCTGCAGGCATGCAAGCTTGATCCATATGGATCGCTAGCTTAATTAATAAAA
GCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTCCA
GGCCGCGAGCATTGACGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCCG
TATGGCAGTATGGGACGCAACCTTGCCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTCAACCGTTC
CCGTGAGAAGACGGAAGAAGTATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAACTGGTTCCTTACTATACGGTGAAAGAGTT
TGTGCAATCTCTGAAACCGCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGA
TTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATTTGATGGTGGTAACACCTTCTCCAGGACACTATTCG
TCGTAATCGTGAGCTTTTACAGAGGGCTTTAACTTCACTCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCT
GAAAGGTCCTTCTATTATGCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTTGGTAGCACCGATCCTGACCAAAATCGC
CGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGGCGATGGCGCAGGTCACATGTGAAGATGGT
TCACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCTGAACCT
CACCAGCAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGAAATACGGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGT
CAAAGATATCTTCAACAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAA
AGGTACGGGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGCTGTGCTGATTACCGAGTCTGTGTT
TGCACGTTATATCTCTTCTGAAAGATCAGCGTGTGCGCATCTAAAGTTCTCTGCTGGTCCGCAAGCACAGCC
AGCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCTGCTGTCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCCA
GGGCTTCTCTCAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGAAGAGTACAACCTGGGATCTGAAGTACGGCGAAATCGCGAAGATTTT
CCGTGCTGGCTGCATCCTCGTCGCAGTTCTTGCAAAAAATCACCGATGCTTATGCGGAAATCCACAGATCGC
TAACCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAATGGCGATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGATGCTGTTGCTTA
TGCAGTACAGAACGGTATTCGGTTCCGACCTTCTCCGACGCGGTGCTTATTACGACAGCTACCGTGTGCTGT
TCTGCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTACTATTTTGGTGGCATACTTATAAGCGTATTGATAAAGAAGG
TGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

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

ATGACGAATTTAAAGCAGTTATTCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGCGGATACCC
AAAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTAGTACATTTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAA
GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGGGTGCAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA
CTCCTTGGAGCAGCGCTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG
AACGTGCGTCAAGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCA
TTTGTGCTGTTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGTGCTGCTG
ATTTGACGTTTCAACGAAACCGGGCCGAGCCAGTGTGCGCAAAACGTTATGCCGGTGACCTCTGAATACCTCC
GTCAATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCCTGAGGGTAAAGTCAAGCCGATTTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGAT
CAGCCGAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTTAGTGTGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAAGT
GAACGTAATCAGCCTGGTGCATGGGGACGTTATCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAACAATCC
GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTGTGTGAAG
TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTTATGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAA
TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAAATTCGACGCAAAAGTAAATTTGTTGCGAA
TCTTCTGCGGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA
GGATTTTCTTGTTCAGAGCGGATTTGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA
ACGCTCGTACATCATAGGCATGCATGCAGTGTCTGGTAGCTGTAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC
CTCTATTAATCAAACCTGAGAGCCGCTTATTTACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGCTAGCAGT
GAAGATACTTGTACTGGTGGCGCAGGATTTATTGGTCTGCTGTTGTTGCTCACATAATAAATAATACGCAAGA
TAGTGTGTTAATGTGATAAATAAACAATACGCGGAAACCTGGAATCACTTGCAGATGTTTCTGATTCTGAACG
CTATTTCTTGAACATGCGGATATTTGTGATGCAGCTGCAATGGCACGGATTTTTGCTCAGCATCAGCCGGATGC
AGTGATGCACCTGGCAGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATAT
TGTGGGTACTTATGTCTTTTGAAGCGGCTCGGAATATTGGTCTGGTCTGGATGATGAAAAGAAAAAACTT
CCGTTTTTCATCATATTTCTACTGATGAGGTGATGGTGACTTACCCCATCCGGATGAAGTAATAGCAATGAAC
GTTGCCGCTATTTACGGAACGACAGCATACGCGCAAAGTGTCCATATCTGCTTCTAAAGCTTCCAGCGATCA
TTTGGTTCGCGCATGGAACGTAATTTATGGTTTACCGACCATTTGTGACTAATTGCTCGAACAACTATGGTCTT
TCATTTCCCGGAAAAGCTTATTCCTGTTATTCTTAATTTCACTGGAAAGGTAAGGCATTAACCTATTTATGGCAA
AGGAGATCAGATCCGCGACTGGTTGTATGTAGAGGATCATGCTCGAGCGTTATATACCGTCTGTAACCGAAGGTAA
AGCGGGCGAACTTATAACATTTGGTGGACACAACGAAAAGAAAAACATCGACGTAGTGTCTACTATTTGTGATTT
GTTGGATGAGATAGTCCCGAAAGAGAAATCTTACCGGAGCAAACTACTTATGTTACCGATCGTCCGGGACACGA

TCGCCGTTATGCGATTGATGCTGAGAAGATTGGTCGCGAATTGGGATGGAAACCACAGGAAACGTTTGGAGAGTGG
GATTCGTAACACGGTGGAAATGGTACCTGTCCAATACAAAATGGGTGATAATGTGAAAAGTGGTGCCTATCAATC
GTGGATTGAACAGAACTATGAGGGCCCGCAGTAATGAATATCCTCCTTTTGGCAAACAGGGCAGGTAGGTGG
GAACTACAGCTGCTCTGGCACCTCTGGTAATTTGATTGCTCTTGATGTTCACTCCACTGATTAAGTGGTGGT
TTTAGTAATCCTGAAGGTGTAGCTGAAACCGTAAGAAGCATTGCGCCTGATATTTATTGTCAACGCAGCCGCTCAC
ACCGCAGTAGACAAAAGCAGAATCAGAACCAGTGTTCACAATTACTGAACGCGACGAGTGTGCAAGCGATCGCG
AAAGCAGCCAATGAAGTCGCGCCTGGGTATTCACTACTCTACTGACTACGTATTTCCGGGGACCGGTGAAATA
CCATGGCAGGAGGAGGATGCAACCGCACCCGCTAAATGTTTACGGTGAACCAAGTTAGCGGGAGAAAAAGCATT
CAAGAGCATTGTGCGAAGCACCTTATTTCCGGACCAGCTGGGTCTATGCAGGTAAGGAAATAACTTCGCCAAA
ACAATGTTGCGTCTGGCAAAGAGCGTGAAGAATTAGCCGTATTAATGATCAGTTTGGTGGCCAACTGGCGCA
GAGTTACTGGCTGATTGTACGGCACATGCTATTGCTGTGGCACTGAATAAACCGGAAGTCGCAGGCTTGACCAT
CTGGTAGCTAGTGGTACCACAACGTGGCAGGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGCATT
CCCTTGCACCTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAACAACAGCCTATCCTACACCAGCTCGTCTCCACATAACTCT
CGCCTTAATACAGAAAAATTCAGCAGAACTTTGCGCTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTTGGCGTGAAACGAATG
CTTAACGAATTTATTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTAATGGTAGCAAGATTATT
AAAAGGAATGATGAAATGAAAACGCGTAAAGGTATTATTTTGGCGGGTGGTTCTGGTACTCGCTTTATCCTGTG
ACGATGGCCGTGAGTAAACAGCTGTTACCAGATTATGATAAACCGATGATCTATTACCCGCTCTCTACACTGATG
TTAGCGGGTATTCGCGATATTCTGATTATCAGTACACCACAGGATACTCCTCGTTTTCAACAACCTGCTGGGTGAC
GGGAGCCAGTGGGGCCTGAATCTTCAAGTCAAAAGTGCACCGAGTCCGGATGGTCTTGGCGAGGCGTTTATTATC
GGTGAAGAGTTTATTGGTGGTGGTATTGTGCTTTGGTACTTGGTGATAATATCTTCTACGGCCACGACCTGGCC
AAGTTAATGGACGTAGCTGTTAACAAGAAAGTGGTGCACCGTATTTGCCTATCACGTTAATGATCCTGAACGT
TATGGTGTGCTGGAGTTTGATAATAACGGTACTGCAATTAGCCTGGAAGAAAAACCGCTGGAACCAAAAAGTAA
TATGCGGTTACTGGGCTTTATTTCTATGACAATGACGTTTGGAAATGGCGAAAAACCTTAAGCCTTCTGCCCGA
GGTGAACCTGGAATTAACCGATTAACCGTATTTATATGGAACAAGGACGTTTGTCTGTGCTATGATGGGGCGT
GGCTATGCATGGCTGGATACAGGGACGCATCAAAGTCTTATTGAAGCAAGCAACTTCATTGCCACCATTGAAGAG
CGCCAGGGACTAAAGGTTTCTGTCCGGAAGAAATGCTTATCGTAAAGGGTTTTATTGATGCTGAGCAGGTA
GTATTAGCCGAACCGTTGAAGAAAAATGCTTATGGTCAAGTATCTGCTCAAATGATTAAGGTTTATTAATAAGAT
GAACGTAATTAACAACTGAAATTCCTGATGTGCTGATTTTTGAACCAAAAAGTTTTTGGGGATGAACGTGGCTTCTT
TTTTGAGAGTTTTAATCAGAGGATTTTTGAAGAAGCAGTAGGTCGTAAGGTTGAGTTTGTTCAGGATAACCATT
TAAGTCCAGTAAAGGTTTACGTGGTCTTCAATTATCAGTTAGAACCCTTATGCTCAAGGAAAACCTGGTGGCGTG
TGTTGTTGGCGAGGTTTTGATGTTGGGTTGATATTCGTAATCGTCACTACATTTGGGAAATGGGTTGGGGT
GAATTTGTCTGCTGAGAATAAGCGTCAGTTGTTGGATTCTGAGGGATTTGCACATGGTTTTTTGGTGTGATGTA
TTTAGCAGAAGTTTTATATAAAAACGAATCAATATTATGCTCCATCACATGAAAAAATATATATGGAATGAC
CTTGCTTAATATAAATGGCCGAGCACAGCACTGATCACTCTGTCTGATAAGGATGCAAAATGGGGAAAGATTTGA
ACTAAGTGAGTTTTGAAATGTCTCTCTTAAAACATAGTATATGGAATGTTGCGGGCTACTTTATACCAACATTA
TTGCAATTCGCCCTTTGGATTAATTGCGAGGAAAATGGTGTAGAACTATTTGGTTTTGTATACGTTAGCAATGA
TTTTTATAGGGTATGCAAGTATATTTGATGCTGGTTAAACAAGAGCTGTTGTGCGTGAAATAGCATTACTAAAA
ACAGAGTGGCAGGATGTAATACGATAATAGTAACTTATTATCGCTGTGATATTTTAGGGTTTTATCGGAGCGG
GGGAGTGTCTTCTGCTTAAAGCCGATATTGAACTCTTAAATATCTCACCAATATATACGCCGATTGATGTA
AGTCTCTAGTATTATATCATCTCTGATACCTGTATTTCTAGTCACGCAATACTATTAGCAGAGCTTGAGGGTC
GGGAATTTTTGGGATTCTAAATATACAAAAAGTGTAGGGAATTTCTTAATTGCAGGGTTACCTGCATTATTTG
TTTTAATTAATCAAACGCTTTTTCTGCAATATTGGTGTAGCGATTGCAAGAGTTATATGCTTGTGGTTAAGCT
ACATTATGAGCAGGAAAGAATAACTATCGATATCTCATTTTTTTCAATAACTGTTTTAAAGCCGTTATTTAGAT
ATGGCGGGTGGTAACATAAGTAACATAATATCTCTATATTAGCGAGTATGGATAGATTTATTTGATCCCATA
TCCAGGGAGCATCAAAAATATCATTCTATACAGTCCCTAATGAGCTGGTAACTAGGCTTGGAAATAGTTCCAGGCT
CTCTTGGGAAAGCTGTTTTTCCAAAATTAAGTCATGCAAGGAATTTTACAGCGTCATATGCAGAGCAAAAAAAG
CTTATATATTAATGACTGTCATTGTAATGCCTTTGGTTTTATTTGTATATATTACGCAAAGTTTTATTTAACAT
TGTGGATGGGGCTGAGTATGCAGGGATTTCCGGTCGAAATATTACGGATTATGCTTATAGGGTATATTTTAACT
GTTATTCACAAATCTCTTTTGCACATACAGGCCTTTGGAAAAGCAAAATACACTGCATACATCCATATGATGG
AATTTATTCCTTATTGATAATGTTATATAAATTTCAAAGGAATATGGGGTTATTGGTGTGCGTGGTTATGGGA
CAATTCAGTAATAATGATTTTTTTGATGCTTTTATATATGAGTTATCGTTGTAATAATCTTATGAAAAAGGGT
AGCCTGATGATATATATTGGTATTAATTTGGAATGGGGCTATAGATACCATTAAATGTGTTAAAAGTTTTAATG
GATTTAAATGTAGCGATTATAAAATTTATCATTGTTGATAACTGTTCTATGGATAACTCATATGATACTATAAAA
GAAAATCTTAATTCATTATATATTGCTGATAAAAGTATCATTGAGGTGAAGTATGAGGATAGAAATAAATATAAA
ACCTTAGAAAACGATAAAATCATATTAATAACAATCTCCGCAAATAATGGGTACGCAAGTGGTAATAATATTGGC
ATAGAGTTTCGCTCTTAATCAGGAGAATATGAAATACGCTCTGGGTTCTGAATAATGATACTGAAGTGGATAAAGAG
GCTTTAACTCATTTAATTAGTAAATGTGATTGAGATAAAAGTATAGGGATTTGCGGTTCTCGTTTTAGTCTATTTT
GCCGACAGAGAGATGCAGCAAGGACTAGGTGGGGTGCATAACAAATGGTTATGCACTACAAAAAATATGAAATG
GGAAGATTAGTTTCCAAAAATATGATGATGAAGTCATTAGTAATGATATAGATTATATAATTGGCGCATCGATG
TTTTTCTCTAGAGAATGTTTGGAAACAGTTGGATTGATGAATGAAGAATTTTTTTTATACTATGAAGAGTTAGAT

ATTTGCTCAGAGCAAAGCAAAGAACTTTAAATTAGGTATTTGCTCAGAAAAGTTTGGTTTATCATAAAATAGGT
 GCAAGTACTGATGGGGGAAAGAGCATGATGGCTGATCTTTGCTCAATAAAAAATAGGCTGGTCATTACAGAAAAGG
 TTTTATCCCAATATTTATGGACGGTATGGTTGTCACTTTTTGTTGTAGCATTAAACCGTGTAGAAAGAGGTGAG
 TTTAATAAGATGAAAAGATGTTTGAATGTTATGTTTAACTTCAAACGAAACAAAGGTAGCAAATGCCATTAGAAT
 ATGCCTTAATCATGGTGTAAATAAATCTATAGTTTGTATGTTATTAAGGGTATTTAATGAAAGTGGCTTTTT
 TATCTGCTTATGATCCACTATCTACATCCAGTTGGTCTGGCACACCTTATTATATGCTAAAGGCATTATCGAAGA
 GAAATATTTCCATTGAAATATTAGGACCGGTAAATAGCTATATGATATACATGTTAAAAGTATATAAATTAATAT
 TAAGGTGTTTCGAAAAGAATATGATTATAGTCATTCGAAAGTTGCTTTCCAGGTATTACGGTAGAATATTCGGTA
 GGAATTAAAAAAATGATGGTTTGGATTTTATTATCGCACCTGCAGGTTCTCCACAAATGCTTTTTTAAAAA
 CAACCATACCAATAATATATCTATCGGATACAACATATGATCAATTA AAAAGCTATTATCCGAATTTAAATAAAA
 AAACAATTATAAATGATGAGGATGCAAGTTTAAATCGAACGCAAGGCTATTGAAAAAGCAACAGTAGTATCTTTCC
 CATCTAAATGGGCAATGGATTTTTGCAGGAATTATTACAGATTAGATTTTGATAAATTAGTTGAAATACCATGGG
 GGGCTAATTTATTTGATGATATTCCTTTGCTAATAAAAAATATAATTCAAAGAATAGTTATACTTGTCTTTTCT
 TGGGAGTTGATTGGGAAAGAAAAGGTGGGAAAACAGCCTTGAAAGCAATGAATATGTAAGGCAGTTATATGGGA
 TCGATGTTAGACTAAAAATTTGTGGATGTACTCCGAATCAAAGATTTTACCTACTTGGGTTGAATTAATTGATA
 AAGTAGATAAAAAAATACGTTGACGAATATCAGAAATTCATCGATGTGTTATCTAACGCTGATATACTTCTTTTAC
 CAACCATGCTGAATGTTATGGAATGGTATTTTGTGAAGCTGCTGCTTTTGGATTGCCGTGTGTCGCTACAGATA
 CAGGTGGAGTCAGTTCTATAGTTATCAACGAAAGGACGGGATATTAATTAAGACCCGTTAGACTATAAGCACT
 TTGGAAATGCAATTCATAAAATAATTAGTTCCGTAGAGACTTATCAAACACTACTCCCAAAACGCAAGAATTAGAT
 ATAATAATATATTGCATTGGGACAATTGGGCTAAAAAGATAATTGAGATTATGATGAGCATAAGAATAGAAGAA
 TCAAAATAGCACAAAAAGAATTATATGTTTATTTATACTTTTTCTTGTTTTCCCTGATTTTTTGTTTTATACATTA
 GGGGTTGATAATTTTAGCATTTCAACGATAATCTCAATTACATTGCTTTTTGTTTTTTAAGAGCTAAAAATATT
 TGCAAAGATAATTTCTAATAATAGTAGCGTTATTCAATTTGTTGTGTTTTAACTGTTTGTGTTAAGTCTAATTT
 AATATTGAACAGGCTTTAAACATTTAAAGTTGTACTTTCAATATATAGCATCTTAATAATGGCATACTCTCTCT
 TGTATGACACAGACGTTGTGGTTATGTTCTGAAGAAACTTAAAGAGATCCGTCTTTTATTTGTTGCGCATTTCTT
 TGCCTTATTGGCATTATAAGTATTTCTTTACAGAAGACTGAGATTATACATGATAAAAGTATGATTCTTTTTCTT
 GAACCATCAGCATTGTCATTGGTTTTTATACCTATCTTTTCAATTTGTTTATACTATACAGAGGGGGGGGCTA
 CTATTGCTCTATATATATCTTTGGGTATTGCGTTAGGTATCCAGAATTTAAACAATGTTGGTAGGCATTGTGATT
 AGTGTTTTGTGATGAAAAAATAACTATAAGGCAAATATTGTTATACTTTTGGGGGCATGGATTTTTTCCATG
 ATATTAAAGTATTAGACATTTCTTACTATACATCGCGCTTATTGTTTTAAAAACTACGAACCTATCAGTGCCTT
 GTATATCTTTTCAAGGATTTGAAAGAGCTTTCTTGAATTTTATACAAGTTATGGTCTTGGTTTTGTTTTCAACAA
 ATGGGAGTGAATGGGAGATAGGAATATATCAACAAATTTTAGCTGAACCTGATGCCCTATGTTAAATATATAC
 GATGGCTCATTTATTTCTTCTAAGTTAATATCTGAGTTTGGGTTATTGGTGCATTAATGTGATTTTTCTATTTT
 TTTTATTTTTCCCGATTTTATCTGCGTTTCAAAAAAGTAAGAGATATTACCAGCAGTATATTTTAGCATATAGC
 TTCTACATGTGTTTCTTCATCCCTCTTTTATACGTGGTGTGGTTATATAAACCCTATGTGTTTATGTTATTT
 TCATCAATATTTTTGTGCAAATATCAGCTAAAAATATCTTGATGAAATCTAATGTCCAGATAGCTATATAATAG
 TAGATTATATTATCATTTATCAGCTAAATATACATATTAAATAGCATATATGATAACTAGGACATAAATAATGTGCAT
 TAAAAAAAACCTAAGTTAATTAACGATATGGCCTTTATGGTGGTCTTAGGCTTCTTAAAGATATATCTTAAAC
 AAAATTTTTATTTTGTCAAATGTTAGGATTATTAGATTTCCATGTTATATTAGAAAAGATGGAAGTGTAGTTT
 TGGAAAAGGTTTTACATCAGGTGTAGGATTACGAGTTGATGCATTTATGGATGCCGTAGTTTCCATTGGAGAAAA
 TGTTCAAATTAATGACTATGTTACATCGCGGCTATTAATAATGTCAATATTGGTAGAGATACATTAATAGCAAG
 TAAAGTATTTATTAGTGATCATAATCATGGTATTTTTTCTAAATCCGATATCCATAGTTCCACCACTATTATTC
 TTCGTCTAGGCCCTTGAATCTGCACCTGTGTATATTGGAGAGCGTGTGTGGATTGGCGAAAATGTTGACAATATT
 ACCAGGTGCGTGTATAGGTAATGGTGTAGTTATTGGCGCAACAGTGTGTTGTTGTTGTTGAGATTCTTAATAATGT
 GATCATTTGCTGGTGTCCAGCTAAAATTTGTTAAAAAATATAACTATGAGCGTATGCAATGGGAAAGAATATAGTT
 GTAATATCGGCTGTTAATTTTACAACCGAGGCCCCCTTACCCTACTAAAAATGTGCTTACAGCAACTAAAGAT
 AGAGCCGAATGTAATTTATTGCACCTGGTTCATAGCTCTGCTGAACCTAATGGAATTTTCCGTGGGTTGAATTT
 ATAGAGTATCCAGAAGTCAAGTCTTCTGTTGGGTTAAAAGATTATATTTTCCGAATATATAACTTGAATAGATTATCT
 AAGGTGATTAAAGGCACTCATTGGGTATGCTTACATGATATTACAGCAAATGTTAGTGTACCCTATAGATTTGTT
 TATTGCCACAATCTCAGCCGTTCTATAAATATTTAAGCTATCGAGATATTATAGGAGAACCTAAATTTTTATCTT
 TTTTATCTTTTTTATGGGCTTTTTATACAATATCAATATAAAAAAGAACACAGCAGTTTTTGTTCAGCAGCAGTGG
 CTAAAAAAGAATTCGAAAAAATAAAGTTAAAGAAATGTTGTTGTTAGTTCGCCCTGAAGATATTTGCCCTTTT
 GAAAGTGTGTTTTGGTAAGAAATAATAAATAAAGGATGTGAGGATATTTTACCCAGCAGTGCCCCGTATATTT
 AAAAATTTGAAGTTATCATACGTGCTGCACAAATATTACAAGATAAAAAATATTCAATTTTTATCTTACTTTTGAT
 GGTACTGAAAATAAGTATGCAAAAAGAATATATAAATTAGCTTCCGAACGAAAAATGTACATTTCTCGGTTAC
 CTAAATGCAACCGAGATGGTTAACTTTTATCAAGATTCAGATATTTTGTTCATCGAACTAGAAACGTGG
 GGATTACCATTATCAGAAGCTAAAAACATACAAAAATGGATATTTGCGGCAGACTTACCTTATGCTCATGAAGTT
 TTATATAACTATTCAAAAACAGATATTTTCCATTTGACGATGAGAAAATACTTGTTCGCTACATATTAGAGTAC
 ACAAGTAAAAATATGCATGAAGATATAAAAAATAGTAGGGTGAATTTTAAATAATGATGCATTGACTGGTTTTGAA
 CAGTTTATTGAATATATCTCAAGGGAACTGACGTGTTTATATTATAATCGTTTACATGGCCATGATGACTA

TATAGAAAATCTTTTATTAATTTAAAGTTGCCCTCTGGAAGATTTAAAATAATAGTTTCGTGATAACAAAAGTTC
 AATGGTTTTAAAAAACAATGCGAAAAAATTCGTAACCTATTTGCATGGAGGGCAATATGGATTTGGACATAA
 TAATAACATAGCAGTGTATATATAATTAATAACTTCATGATTATGAATAATGATTATTTCTCTTTCTTAACCC
 CGATGTATTCATAACCAGTGAAGTTTGATTAATTATGTTGATTATATAAATAGTAATGATTATAAGTTTAGCAC
 ATTATGTCTTTATCGAGATTTTACTAAAAGCAAACATGATTATTCAATACGGAGTTTTCCAACCTTATATGATTT
 TCTTTGTTCTTTTATTGGGGTGAATAAAAGTAAATTAAGAAGGAAAATATACTTTCTGATACTGTAGTTGA
 TTGGTGTGCTGGCTCATTTATGCTTATTCATGCTTTAAGTTTCTTAAATGTGAATGGTTTTGATCAAAAATATTT
 TATGTATTGTGAAGATATTGACCTTTGTATGCGTTTAAAATTAAGTGGAGTAGATCTTTACTATACTCCCCATTT
 TGATGCTATTCATTATGCGCAGCATGAAAATAGAAGATATTTACTAAAGCATTTTCGATGGCATATAAGGAGTAT
 TACGCGCTACATATTACGGAAACCAATTCCTTCTATAAAAACTATAGAAAAATACATCCGAACTGGTAAAGTG
 ATTAAGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACCTCGGAATAGGAA
 CTAAGGAGGATATTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACT
 TTGTATACTTATTTGCGAACATTCAGGCCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATG
 TCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGTGGGACGCAACCTTGGCTCAACATCGAAAGCCGTGGT
 TATACCGTCTCTATTTCAACCGTTCCTGAGAGAAGACGGAAAGTGTATGCCGAAAATCCAGGCAAGAACTG
 GTTCTTACTATAACGGTGAAGAGTTTGTGCAATCTCTGAAACGCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCA
 GGTGCAGGCACGGATGCTGCTATGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATGATGGTGGT
 AACACCTTCTCCAGGACTATTCGTGTAATCGTAGCTTTTTCAGCAGAGGGCTTAACTCATCGGTACCGGT
 GTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAGAACCTATGAATTG
 GTAGCACCGATCCTGACCAAAATCGCCGCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTTGGTGCCGAT
 GGGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTTTCAACAACGGTATTTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTTGCTGAAGCCTAI
 TCTCTGCTTAAAGTGGCCTGAACCTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGATAACGGTGAA
 CTGAGCAGTTACCTGATCGACATCACCAAAAGATATCTTCAACAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGAT
 GTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAAGTACCGGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCG
 CTGTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTTGCACGTTATATCTTCTTCTGAAAAGATCAGCGTGTGGCCGATCTAAA
 GTTCTCTGTTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGCCAGGCAACAGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTGCTGCGCTGTAT
 CTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGTGCTGCTGCTGAAGAGTACAACCTGGGATCTG
 AACTACGGCGAAAATCGCGAAGATTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTTCTGCAGAAAATCACCGAT
 GCTTATGCCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAAATGGCCGATGACTACCAG
 CAGGCGCTGCGTGTATGCTGTTGCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCGGTTCCGACCTTCTCCGCGAGCGGTGGC
 TATTACGACAGTACCCTGCTGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTACTATTTTGGTGCGCAT
 ACTTATAAGCGTATTGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTA

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

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGGCATACCC
 AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAA
 GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA
 CTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCTGACCATTATG
 AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTTGGTGACAACCCA
 TTTGTGCTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGTGCCATG
 ATTTGCACGTTTCAACGAACCGGGCCGAGCCAGGTGCTGGCAAAACGATGCGGGGTGACCTCTCTGAATACTCC
 GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAAGCCGATGTTGAATTTATCGAAAAACCGGAT
 CAGCCGACAGCGTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGAACTG
 GAACGTACTCAGCTGGTGCATGGGACGATTCAGCTGACTGATGCTATTTGCCGAGCTGGCGAAAAACAATCC
 GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG
 TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAA
 TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATATAACGGCAGTGAATAATTCGCAGCAAAAGTAAATTTGTTGCCGA
 TCTTCTGCGGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA
 GGATTTTTCTTGTTTCCAGAGCGGATTTGGTAAGACAATTAGCGTTTTGAATTTTTCGGGTTTTAGCGCGAGTGGGTA
 ACGCTCGTCACATCATAGGCATGCATGCAGTGTCTGGTAGCTGTAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC
 CTCTATTAATCAAACCTGAGAGCCGCTATTTTACAGCATGCTCTGAAGTAAATATGGAATAAATTAAGCTAGCAGT
 GAAGATACTTGTACTGGTGGCGCAGGATTTATTGGTCTGCTGTTGTTGCTCACATAATAAATAATACGCAAGA
 TAGTGTGTTAATGTGCATAAATTAACATACGCCGAAACCTGGAATCGCTCGCTGAAATTTCTGATTTCTGAACG
 TTATTCATTTGAGCATGCAGATATCTGCGATGCCGAAGCGATGGCTCGTATTTTTCGCACAGCACCAGCCACAGC
 GGTGATGCACCTGGCAGCAGAGCCAGCTTGACCGCTCAATAACTGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATAT
 TGTGGGTACTTATGTTCTTTTAGAAGCGGCGCAATTTATTTGGTCTGGTGGATGATGAAAAGAAAAAATCTT
 CCGCTTTCATCATATTTTCTACTGATGAGGTGTATGGTACTTACCCCATCCGGATGAAGTAAATAGCAATGAAAC

GTTGCCGCTATTTACGGAAATGACAGCATACGCGCCAAGTAGTCCATATTCTGCTTCTAAAGCTTCCAGCGATCA
 TTTGGTTCGCGCATGGAAACGTACTTATGGTTTACCGACCATTGTGACTAATGCTCGAACAACCTATGGTCCCTTA
 TCATTTCCCGGAAAAGCTTATCCACTGGTTATTCTTAATGCACTGGAAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAA
 AGGAGATCAGATCCGCGACTGGTTGTATGTAGAGGATCATGCTCGAGCGTTATATACCGTCGTAACCGAAGGTAA
 AGCGGGCGAACTTATAACATTTGGTGGACACAACGAAAAGAAAACATCGACGTAGTGTTCACATTTGTGATTT
 GTTGGATGAGATAGTCCCGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAAATTACCTATGTTGCTGATCGCCAGGGCATGA
 TCGCCGTTATGCAATTGATGCCGATAAAAATTAGCCGCGAATTGGGCTGGAAACCACAGGAAACGTTTGAGAGCGG
 GATTTCGTAACCTGTGGAATGGTATCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAATGTGAAAAGTGGTGCCTATCAATC
 GTGGATTGAACAGAACTATGGGGGCCGCCACTAATGAATATCCTCCTTTTTGGCAAAACAGGGCAGGTTGGTTGG
 GAACTACAGCGTGTCTGGCACCTCTGGGTAATTTGATTGCTCTTGATGTTCACTCCACTGATTACTGTGGTGTAT
 TTTAGTAACCTGAAGGTGTGGCTGAAACCGTTAGAAGCATTGCGCCTGATATATTGTCAACGCGACCGCTCAC
 ACCGCAGTAGACAAAAGCAGAATCAGAACCGGAGTTTGCACAATTACTGAACGCGACGAGTGTGGAAGCGATCGCG
 AAAGCAGCCAAATGAAGTCGGCGCTTGGGTATTTCGCTACTCTACTGACTACGTATTTCCGGGACCGGTGAAATA
 CCATGGCAGGAGGAGGATGCAACCGCACCGCTAAATGTTTACGGTGAACCCAAGTTAGCAGGAGAAAAAGCATT
 CAAGAGCATTGTGCGAAGCACCTTATTTCCGGACCAGCTGGGTCTATGCAGGTAAAGGAAATAACTTCGCCAAA
 ACGATGTTGGCTCTGGCAAAAGAGCGTGAAGAATTAGCCGTTATTAATGATCAGTTTGGTGCGCCAACTGGCGCA
 GAGTTGCTGGCTGATTGTACGGCACATGCCATTGCTGTGGCACTGAATAAACCGGAAGTCGCAGGTTTGTACCAT
 CTGGTAGCCAGTGGTACCACAACCTGGCACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAAGCAGGCATT
 CCCCTTGCACTCAACAAGCTCAACGCACTACCAACACAGCTATCCTACACCAGCTCGTGTCCACATAACTCT
 CGCCTTAATACAGAAAAATTTACGACAGAACTTTGCGCTGTCTTGCCCTGACTGGCAGGTTGGTGTGAAACGCATG
 CTCAACGAAATTTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTGATGGTGGAAACAGATGAATT
 AAAAGGAATGATGGAATGAATACGCGTAAAGGTATTTTACGGGGTGGTCTGGTACACGCTCTTTATCCTGTG
 ACTATGGCTGTGATTAACAGCTGTACCATTATGATAAACCGATGATCTATTACCCGCTCTCTACACTGATG
 TTGGCGGGTATTCGCGATATTTGATTATCAGCACGCCACAGGATACTCCTCGTTTTCAACAACCTGCTGGGTGAT
 GGGAGCCAGTGGGGCTAAATCTTCACTACAAAGTGCAACCGAGTCCGGATGGTCTTGGCGAGGCATTTATCATC
 GGTGAAGAGTTTATCGGTGGTGTGATGATTGTGCTTTGGTACTTGGTGATAATATCTTCTACGGTCACGACCTGCCT
 AAGTTAATGGATGCCGCTGTTAACAAGAAAGTGGTGAACCGGATTTGCCTATCAGCTTAATGATCCTGAACGC
 TATGGTGTTCGTTGAGTTTGATAAAAACGGTACTGCAATCAGCCTGGAAGAAAACCGTTACAACCAAAAAGTAAT
 TATGCGGTAAACGGGCTTTATTTCTATGATAACTACGTTGTGGAATGGCGAAAAATCTTAAGCCTTCTGCCCGC
 GGTGAACCTGGAAATTACCGATATTAACCGTATCTATATGGAACAGGGGCATTTATCTGTTGCCATGATGGGACGT
 GGATATGCCTGGCTGGACACGGGGACACATCAAAGTCTTATTGAAGCAAGCAACTTCATTGCCACCATTGAAGAG
 CGCCAGGGCTTGAAAGTTTCCCTGCCCGGAAGAAATGCTTACCCTAAAGGGTTTATTGATGCTGACGAGGTGAAA
 GTATTAGCTAAACCGCTGAAAAAAATGCTTATGGTCAGTATCTGCTAAAAATGATTAAGGTTATTAATAAAAT
 GAATGTTATTAACAGAAATCCAGATGTACTGATTTTTGAACCGAAAGTTTTGGTGTGAGCGTGGTTCTT
 TATGGAAAGCTTTAATCAGAAAGTTTTCGAAGAGGCTGTAGGGCGGAAGGTTGAATTTGTTCAAGGATAATC
 TAAATCGTGTAAAGGTGTACTTAGAGGTTTACACTTTACGCTTCCCTCCCTTGAGCAGGCAAAATAGTAAGGTG
 TATAGTTGGCGAGGTATTTGATGTTGCAGTAGACATTAGACCTAATTCTGAAACATTTGGTTCATGGGTTGGAGT
 AACTCTTTCGTGAGAAAATAAAGGCAGCTATGGATTCCAGAAGGATTCGCCCATGGTTTTTTAACTTTAAGTGA
 TATTGCAGAGTTTGTATAAAAACCAACTATTATCTTTAAATCATGAAAGGGGAGTCATTTGGAACGATGA
 GGAAATTAACATTTGCCCTGGCCCTCTCAATCAGAGAAGATTTCTGTACAGAAAGATATTAATTTACCATCATTTAG
 ATTTGTTCAAATGTTTAGCAAGTAGTGTATCTTTACACTGCACATAGTCATCATTTTTTTATGCTTTAAGTAAAT
 TATATTTGCACATCTATAACACAAAGCGCAATAATATTTGCACCTGATGAAGGTTTGTGGTTATTTATCTTTCTAG
 CGCTTTTTTATGACTAAAATAGTTGTGGTTTTCTACAGCTCCAATATTTCCCGACAAATAATGGGTACAAAAGTTCT
 GTATTAGGAAGAATTGATGAGTTATTAATGAGGATAATGAGGTCGTTTTGATTGAAATAAACCTTGAAAATGTT
 ACGGAAAAGAAAAGATGAATTAATACCAACAAGATTTAATAATATTCAAAGATATGAAGTAAAAAAATATCTAGA
 TCATTTATTGCCGAGTTACAAATATTTTATGATATCAGAACTCGGTATGAACAATTTATTTCTTCTGCTGACATT
 AGAGATAACATAAAAAGATAATTGATTTAGAAAACCTTCTATATTATTGCTGAGTCTATATGGCGGTTGCCAA
 GCATTGCCATTGAAATTAGTGCAGAAATACACTGTGTTATTATGATGTGGCAACTGATTTCTTTAAAGAAATG
 TTTGTATCTCATAATGAGGTTGTACGAAAAATTTGTTTTTAAATGATTACCTAAAGTTGAAAATTTACTGAAGAA
 AATATTATCAAACGTTTGGAGTTGAGCAATTTATCTTTCTGACAGAAGAAGATAAATGTTGGTATAAAAACAAGA
 TACAATATTGATGAGGGTTGTTGTTCCCTTAGCGAGCAATCATCTTTATGTAGAAAAGATTAAGAGAACTATCAAT
 TTCCAAACCCCTTCTGCTTATTTCCCGGTAGCATTGAATTTTACAAAATTTTTACGGCTTAAATTTGGTTTATA
 AAAAATATATATCCTGGATTAATAGGAAAATAAGAATAGTTGTAACAGGAAAGGCATCAGATAAAAAAATAAAG
 ATGTTAACTGTGGAGAGGAAATACCTTTACGGGAGAGCTTGACTTTTCCACATATAATAAATAGCTCAACA
 TGCTTGTGTGTTATTGCACCGATTACAACGGGCACTGGAATTAATAAATAAATAATAGAGCTGTACAAAAGGT
 ATTCCTGTACTTACAACAAAATTTGCTTCAAAGGAATATGTTCCGATTTATGTTTTTATTGCGAGGAGGATACT
 GACACAACTTTGTCAATTTAATTAACAGTTTTCTTGAACAGCATTAAAGAGTCCAAGAATGAATTTATTGCTTT
 TTTGAGTCTTGCCTTTGGTTAATATTGGCTTTGGCCATAATAAAGTGGAGATTTAACGCATACTTAA
 TGTTTTTTCTCGTGGTCTAATGGTATTAATATCAGGGCTGCGTATGAATGATAGTATTATATCGAATACAGGA
 AAATGTATAATGAAGTGCCTATTTTATGTACTTTAGTCTCGCATCTATAAGAGATATACATGGGGAGGTAGGCT

ATCTATTCTTATCATCAATCTTTAAAACCTTTATGCTTGCCATTTCAATTATTTCTTTTTTTTATTGCTTTTTTAT
 CACTCCTGCTTACATATTTTTTCATTACAGAAAATAAGTTTAATACCGTACTATCGTTAGTTTTTTATTAAAGCC
 ATGCTTTTTATAGTTAGAGATTTGATTCAAATTAGGGCAGGATTAGCTGTTAGCATATCATTATATTTCAATAATTA
 AATTTAAAGGAAATAAAGTATAATACAGGAGTTTTATTTGCTTCTTTGATTCATTCTGGGGCGCTTATTATTG
 CTTTTTGTATCCTTTTTTCAAAAAAAAATACATAACATTAATAATGATGTTGTTTTTATTTTTTGTCAATTA
 TTTTTTCTTATTTGAATGGGCTTAATTTATCGATACAACCTCTTATCTCAATATAGTTTGGCTTCCAACCTGCAATTT
 CGAATTATGTTGGTTGGGAAGAATATGATTATCGGGTGAGTATATTTACTAATCCGGTTTTTTATTAAGGTGTTT
 TTTAATTGTCTAATGCACAAATATGACTTTTCAGATATTAATAATGAGAAAATATAGTGTCTTATAACTTAT
 ATGTTTTAGGTGATATAGCTATGGTTGCATTGAGTGGGATGGCTATTTCTTTTCAGGCCGTCTTTTCATCCTTTCTGA
 CACTAGGTGAAAGCATTTTAATTTGTATATGCTCTGTTCTACAAAAGAAATACACCTCTGGCGTTTCTAATTTTTT
 CTTTTTTAACAATTTGTGCAATTAGGATATGATCTATTTTCTAATGTGCATCCTGAGCTTACTCTGATTATAT
 TTGGGTGAATCTAAGTGAAAAATAATAAATAGGCATATTACTCTAATAATACAAAATCTTGGACCTGTGAATG
 TAGTACGAGGATTTGATAAAGAAAAATAAAAAATATGCTTTTACTGTTTTTTGTTTAAACAATAGCGTAGATAAAA
 ATATATATGATGAGTTATGCTGTTTAGGAGCCAAGGTTATATTAATACCAGATGGTACTTGGTTTCAGCAAAATTT
 TATTTGTGAGAAAGTTTTTAAAGGAACATCCACATAATATCTTACATTCACATGGGATCACGGCCGATATGTTTT
 CTTACTTTCTGAATGGCGTGAAAAATATCTACTATTCACAATAGACTAGATGAGGATTATATCCCATTTTTGGCG
 CGGTTAAAGGGAATGCTATATATTTATCTTCATCGTTTTTATATTACGAAGATTTAATCATATCGTTGCTTGCTCAG
 CAGCGGTCCAATCAAACTGAAACAATCGAAAGTAAAACTAAAATAACCACCATCCAGAATGGGATTGATATAA
 CTAGGTTTTAAGACACTTGAGTCTGATAAAAAAATATTTGAGGGAAAAACACGGATTTGATAGTGA AAAAGAA
 TATTTATATATTTGTGGCTCGTTATCATTAAAGGAAAAATTTGCTTACCTCTTGGAAACACTTAGCCATCGAAAGAA
 ATGATATATTTTTAATTTCTAGGTGATGGTGAACCTTTTAGATATTTGTAAGGATAAATATTTCTAAAGATTTACGGT
 ATATATTTATGGGAAAGTTGAATGCCCTCTTGAATATTTCAATTATCAGATATTTTTGTTTTCCGCTCTTTTAT
 CGGAAGGGCTCCCTTGGCACTATTAGAAGCTGCCCTTACTGGGTGCTATTTATATGTTAGCGATATAGAGCCCC
 ATAGAGAAATTCATCTCTATTAGGAGAGGAAAATATTTCTATGTTTTAAAAATTAAGGATGGATCATATAAATTATT
 TGCAACCTAAAATAAAAAAGCTGACTATAACGCTCTTTCTGACGATAAACTTTACAATATATCCGATAAAAAAA
 TGTCAAATCTTTATGACAAACTTTTTGTTTTCTTTATAGAGCAGAGGCACATAATAATGATTTATGTTTTCGGTA
 ATTTCTCATGGTCATTTCAAACTCTTAAGGAATTAGGACAGTATCAAAATTAATAAATCACAGCAGAATTA
 GTTATCATCAAAGATAATTTAGGAGAGAGCGAGCTTTTGGATTTTTGTTCAGGAAAAACAATAACTTATTTAAGG
 TCTAAAGAGAAAAAGGATTTGGAGAGAATAATAATGAAGTTTTTCTCTATATCCTCCTTAATTTACTAAGGAA
 GATTTTTTTTGTGTTTATGAATCCTGATATATATATTGAGTGTCTGATCTATTAGATGTCTGATGAGTGTGGT
 TCAGCGAATGTTAATCTAGCAACGATAAATTTATACAGGGATTTTGATAAAAAACATATGATAACTCAGTAAGG
 AAATTTCCCTCGGCAATGATTTTTTTATGTCTTTTTATTTAAGAAAAATGACTGTGTAGTAAATAAGAACAAA
 ATAACGAAACCAACATATGTTGATTGGGCTGCAGGTTCTTTCTAATATTTAATGCCTCTTTTTATTTCAAACTC
 AACGGATTTCAACGAAAAGTATTTTTATGTATTGCGAAGATTTGATATATGTTGGCGAGCTAAAAACAATACTCAAT
 ACTTCAGTTTTATACTATCCATGCTATGCAGCAATTCATTTGGCACAATTTAACAATCGTAGGATTTTTTAGTAGA
 CATTTTCATTTGGCATATAAAAAGTATTTATCCTTTTTTTTATTTATATAAAAAATGGTATGCTGCGTTCTAGTAAGTTG
 CTTAATGCTAATATTTCTTTTAAAGAGGTGAGAATGATACCTGTTATTTTTGGCTGGTGGTTCCGGGAGTCGCTTGT
 GGCCACTTTTCAGGAGAAAAGTTCCCAAGCAGTTTTTAAAGTTGACTGGCAGTTTGACAATGTTGCAGTCAACAT
 TGTACCGTCTTAATAATTTAATGCTGATGATTCAATAGTTATATGCAACGAAGAGCATAGATTTATTTGTTGCAG
 AAACATTAAGAGAGTTAGGCAAACTTTCAAATAACATTTATTTGAAACCAAGGTGTAATAACAGCCCCTGCTA
 TAACTCTGCAGATTAGCAGCAAAAAGAAAATTCGCTGATGAAGATCCATTGATTTCTTATTTTAGCTGCAGATC
 ACAACATCCAAGACGAACATGTTTTCTGTGAGGCAATTAATAAGGCGTCATCTTTAGCTAGTTTATGGAAAACTAG
 TGACTTTTGGTATCGTTCCATTCAAACCTGAAACTGGGTATGGCTATATTCGTCGCGGTGATGAAGTGCCTGTAG
 ATGAGCAGCATGCGGTGGCCTTTGAAGTGGCGCAGTTTGTGAAAAACCGAATCTGGAAACCGCGCAGGCCTATG
 TGGCAAGCGGCAATATTACTGGAACAGCGGTATGTTCTGTTCCGTGCCGGACGCTATCTCGAAGAACTGAAAA
 AGTATCGTCCGGATATTCTCGATGCCTGTGAAAAAGCGATGAGCGCCGTGATCCGGATCTCGATTTTTATTTCGTG
 TGGATGAAGAGGCGTTTCTCGCTTGTCCGGAAGAGTCCGGTGGATTACGCGGTCATGGAATGCACGGCAGATGCCG
 TTGTGTTGCCGATGGATCGGGCTGGAGCGATGTCGGTTCTGCTTCTTATTGAGGATCAGCGCCACACCCG
 CCGAGGGCAACGTTTTGCCACGGCGATGTGATTAATCACAAAACCTGAAAACAGCTATGTTACGCGCAATCTGGCC
 TGGTACCACCGTCCGGGTGAAAGATTTGGTGGTAGTGACAGCAAAAGATGCAGTGTGATTTGCCGACCGTAATG
 CGGTGCAGGATGTGAAGAAAGTGGTCGAGCAGATCAAAGCTGATGGTCCGCATGAGCATCGGGTGCATCGCGAAG
 TGTATCGTCCGTGGGGCAAATATGACTCTATCGACGCGGGCGACCGCTACCAGGTGAAACGCATCACCGTGAAAC
 CGGGCGAAGGTTTGTCCGTACAGATGCATTATCATCGCGCGGAACACTGGGTGGTTGTTCGCGGGGACCGCAAAG
 TCACTATCAACGGTGATATCAAACCTGCTTGGTGAACAGAGTCCATTTATATTTCCGCTGGGGGCGATGCACTGCC
 TGGAAAACCCGGGAAAATAGATTTAGAATTAATTTGAAGTTCCGCTCTGGTGCATATCTTGAAGAAGATGATGTTA
 TTAGATGTTTATGATCGCTATGGACGAAAGTAATATATAATAATATTTTTCAGAAATAGAAAATGATAATTAAGTT
 TTCTGCTGGATAAAACAATAGATAGTATGGGTTGGAAAAATAGAGTCTTTAACTTGTTTTTAAAGCTTACGACATT
 CGCGGGAAATTAGGTGAAGAAGTGAATGAAGATATCGCCTGGCGCATTTGGTTCGCGCTATGGCGAATTTCTCAA
 CCGAAAACCATTTGTGTTAGGCGGTGATGTCCGTCTCACCAGCGAAACCTTAAAACCTGGCGCTGGCAAAGGTTTTA
 CAGGATGCGGGCGTGCATGTGCTGGATATTGGCATGTCCGGCACGAAGAGATTTATTTCCGCCAGTTCCATCTC

GGCGTGGATGGCGGCATTGAAGTTACCGCCAGCCATAATCCGATGGATTACAACGGCATGAAGCTGGTGCGCGAA
 GGGGCTCGCCCCGATCAGCGGTGATACCGGACTGCGCGACGTCCAGCGTCTGGCAGAAGCTAACGACTTTCCTCCC
 GTCGATGAAACCAAACCGCGTTCGCTATCAGCAAATCAATCTGCGTGACGCTTACGTTGATCACCTGTTCCGGTTAT
 ATCAATGTCAAAAACCTTACGCCGCTCAAGCTGGTGTCAACTCCGGGAATGGCGCAGCGGGTCCGGTGGTGGAC
 GCTATCGAAGCCCTTTAAAGCCCTCGGCGCACCGTGGAGTTAATCAAAGTGCATAACACGCCGGACGGCAAT
 TCCCCAACGGTATTCCTAACCCGTTGCTGCCGGAATGTCGCGACGACACCCGCAATGCGGTCATCAAACACGGC
 GCGGATATGGGCATTGCCCTTGATGGCGATTTTGACCGCTGTTTCTGTTTGACGAAAAAGGCGAGTTTATTGAG
 GGCTACTACATTGTCGGCCTGCTGGCAGAAGCGTTCCTCGAAAAAATCCGGCGCGAAGATCATCCACGATCCA
 CGTCTCTCCTGGAACACCATTGATGTGGTGACGGCCGCGGGCGGCACGCCGGTGTGTCGAAAAACAGGACACGCC
 TTTATTAAGAACGTATGCGCAAGGAAGACGCCATCTACGGTGGCGAAATGAGCGCTCACCATTACTTCCGCGAT
 TTCGCTTACTGTGACAGCGGCATGATCCCGTGGCTGCTGGTCCGCCAAGTGGTGTGCCTGAAAGGAAAAACGCTG
 GCGAAGTGGTGGCGGACCGGATGGCGCGGTTTCCGGCAAGCGGTGAGATCAACAGAAAACTGGCGCACCCCTGTT
 GAGGCGATTAACCGCGTGAACAGCATTTTAGCCGTGAGGTGCTGGCGGTGGATCGCACCGATGGCATCAGCATG
 ACCTTTGCCGACTGGCGCTTTAACCTGCGCTCTTCCAACACCGAACCAGTGGTGGCCTGAATGTGGAATCTCGC
 GGTGATGTTGAGTTATGGTAATCCATACTCAAGAAATATTATCAATTTTGACGTCATAAAGAATAAGCCCTGAC
 AAGTTAGGGCTTAATTAATATATATTTTTTTTTGAAATGGGGATTTGTGGTAAGATTTTTAATATGTTATTTAATG
 TGGTTGAATTAATGTTGACTGGAAAAATAAATGAGAACGAAAAAGCATTACACAACCTTAAAAGTTGATTTATT
 AATTACTTTTTTATGGTTTTGCTAGGGTTTTATATCTGAACTGTTTTTGTTCAAAAATGGGAAGTGAATTTAC
 TGGAGTGATGTTACTATTACACAGTTGACAGCATATCTCAATTTGGCAGAATTAGGTATTGGAATTGACGCTGC
 CAGCGTATTATATAAACCGCTCAGCGAGAATGAATACAATAAAAAAATACTTACATAATATCTTTGCTCTCAGTCAT
 ATACAATATATATTTGTGTTTGTGTTTATTCTTGGCGTGTGTTATAGGTATCTGTATTTATTACTTTATTGATTC
 TGTAAAGGTTGTAATGGCGTTTTTTTTATATTGGGCTTTGTTTCGTTTTTAATACATCGTTGACATATAGTTATGC
 TAAATACTCCACATTATTAACCTGCTAATCAGCGGTACTCAGCAGTAAGAAAAATCAAGGTGGCGGAAAAGTTAT
 AATAATTGTATTTAGATATTAATTTTGTGCTTTACGCAAAGTTTCATACTTTATTTGTTAGTTGAGACTTTAGG
 TATTTTTTCTCAATATTTGATTTTTAAAAAATAAATGGGAACGGAAATCAATATCTCAGTAATGAGGTTTTACT
 TATTTGAAAGCGATAAACTTTTGATAAAAAAAGAATTTAAAAATAAGAATAAAAAATATGTTCTTCCATAAAATAGG
 TGCTGTGCTTGTCTTAATACAGACTACCTGCTTGTATCAAAGTTTCTGACATTAAGTTATGTGACAATTTTTGG
 CAGCTATATGATGGTATTTAGATAGTAAGTGTGTTTGTATGTCAGTTTTGTTAATGCTATTACTGCAGGAATGGG
 TAATTAATTAATAAAAAGTAATTTAGAAATTAAGGAAATACACGTCATTTTTATGTGATATTTATCGCCTT
 TGCAACATTCATATCACTAAATATGTTTTTCTTGTAAATGATTTTTATCGCAAAATGGATAGGTGTTAATTATAC
 ATTAAGTAACACCCTAGTTGCATTAATGATTGTTAACGTATTATTAGTGTGTCAGGGTACCTTCTGATATAT
 AAAAAACGCAAGTGGACATTTTGGTGATATTTATTATCCATTATTAGAAGGTGTGCTGAATATTAGCATCCAT
 CATTTTGGCTATCATATTTGGATTACCTGGCATTATTTATAGGGACAATAGTATCTAACCTTAATAGTAATAATGCT
 TGCGAAACCATTATATCTTACTCTAAGTTATTTAATCTTAGAAATCCGACGAGGGTTTTATTTGAATTTATTTCT
 TCGGCCTATGTTATATTCATTATGTGTGATTGGGGTGAGCTATTTATTGCGCGATGAAATATATTCATTTAAAGT
 AAGTACATGGTTGGATTTTATTAACAAGCTACTCTTAGTCTCTACTCCTAGCATATTGGTAATATGTGCTATTTT
 CTCTACGGATAGTGACTTTAGATTAATTTTTAGAAAAATTTATATATGTGATTTATGAAGAAATAAAAAATTCGAAA
 ATGTATTAATCGAAATATGCAACGAGCTTTATTTTTATAAATGATATGTGATCTTTTCGCGAATAGGAGTAAGG
 ATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAAGTTCCTATATCTTAGAGAATAGGAACCTCGGAATAGGAATAGGA
 GGATATTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAGGATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATA
 CTTATTTGCGAACATTCAGGCCGCGAGCATTACGCGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGC
 AACAGATCGGCCTAGTCCGTATGGCAGTATGGGACGCAACCTTGGCCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCG
 TCTCTATTTTCAACCGTTCCTGAGAAAGACGGAAGAAGTATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAACTGGTTCCCTT
 ACTATACGGTGAAGAGTTTGTGCAATCTCTGGAACGCCCTCGTCCGATCCTGTTAATGGTGAAGCAGGTGCAG
 GCACGGATGCTGCTATTGATCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATTGATGGTGGTAACACCT
 TCTTCCAGGACACTATTCTGTCGTAATCGTGAGCTTTTCCAGCAGAGGGCTTTAACTTCATCGGTACCGGTGTTTCTG
 GCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCGAAAAGAAGCCTATGAATTTGGTAGCAC
 CGATCCTGACCAAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTTGGTGGCGATGGCGCAG
 GTCATATGTGAAGATGGTTTACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTCTCTGC
 TTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCAGTGGAAATAACGGTGAACCTGAGCA
 GTTACCTGATCGACATCACCAAGATATCTTCAAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTGTGATGTGATCC
 TGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACCGGTAATGGACCAGCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGTGTCCG
 TGATTACCGAGTCTGTGTTTGCACGTTATATCTTCTCTGAAAAGATCAGCGTGTTCGCCCATCTAAAGTTCTCT
 CTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTGCTGCTGCGCTGTATCTGGGCA
 AAATCGTTTTCTTACGCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGTGCGTCTGAAGAGTACAACCTGGGATCTGAACCTACG
 GCGAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCTTGCAGAAAATCACCGATGCTTATG
 CCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAATTTGCCGATGACTACCAGCAGGCCG
 TGCGTGATGTGCTTGTATGCAGTACAGAACGGTATTCGGGTTCCGACCTTCTCCGACGGTGGCTATTACG
 ACAGCTACCGTGTGCTGTTCTGCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTACTATTTGGTGGCATACTTATA
 AGCGTATTGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения биоконъюгата полисахаридного антигена O_x E. coli, ковалентно связанного с белком-носителем, включающий:

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

а) нуклеотидную последовательность кластера генов *gfb* для полисахарида O_x-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_y; и

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

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

когда антиген O_x представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, PglB_y содержит аминокислотную мутацию N311V или аминокислотные мутации Y77H и N311V, а рекомбинантная клетка-хозяин дополнительно содержит последовательность, кодирующую 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_x представляет собой полисахаридный антиген O6A, PglB_y содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V;

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

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

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

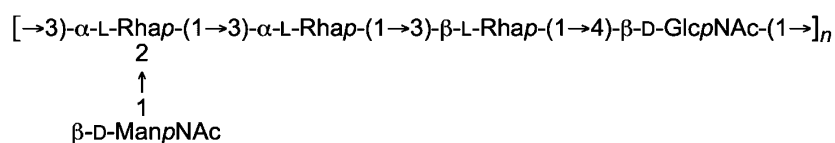
когда антиген O_x представляет собой полисахаридный антиген O18A, PglB_y не содержит аминокислотные мутации в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669; и

когда антиген O_x представляет собой полисахаридный антиген O75, PglB_y содержит аминокислотную мутацию N311V,

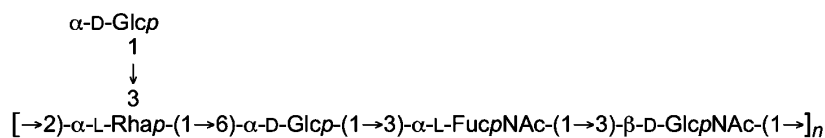
где в каждом случае аминокислотные мутации относятся к PglB_y дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и

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

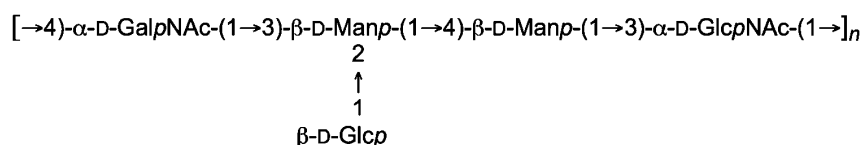
(O1A):



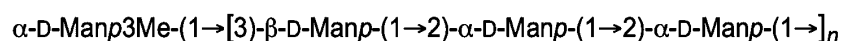
(O4-Glc+):



(O6A):



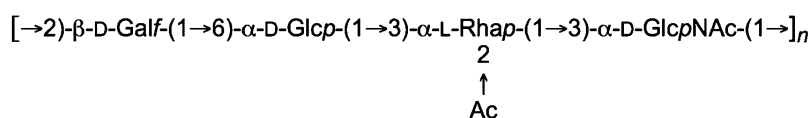
(O8):



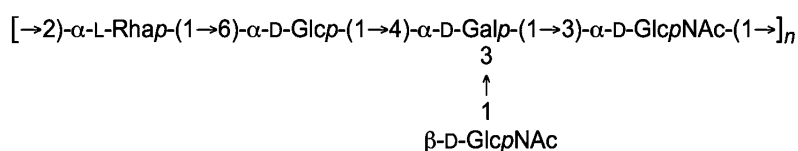
(O15):



(O16):

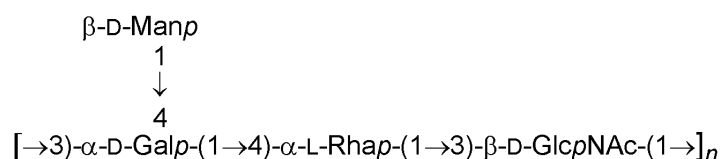


(O18A):



, 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_y 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-

тельности SEQ ID NO: 7 и 8 соответственно.

6. Способ получения биоконъюгата полисахаридного антигена O_x E. coli, ковалентно связанного с белком-носителем, включающий:

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

а) нуклеотидную последовательность кластера генов *gfb* для полисахарида O_x-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_y; и

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

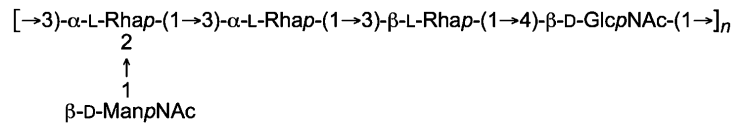
где PglB_y содержит аминокислотную мутацию N311V по сравнению с PglB дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6,

где антиген O_x представляет собой полисахаридный антиген O1A, гликозилированный полисахаридный антиген O4, полисахаридный антиген O6A, полисахаридный антиген O15, полисахаридный антиген O16 или полисахаридный антиген O75,

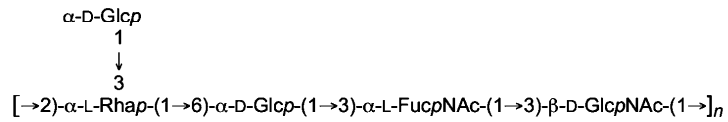
и когда антиген O_x представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, рекомбинантная клетка-хозяин дополнительно содержит последовательность, кодирующую гликозилтрансферазу GtrS, последовательность которой по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 4, и которая способна модифицировать 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, последовательность которых по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 7 и 8, соответственно, где транслоказа способна транслоцировать связанную с бактеренолом глюкозу, а гликозилтрансфераза способна гликозировать бактеренол, и

где полисахаридные антигены O1 A, гликозилированный O4, O6A, O15, O16 и O75 имеют структуры формул:

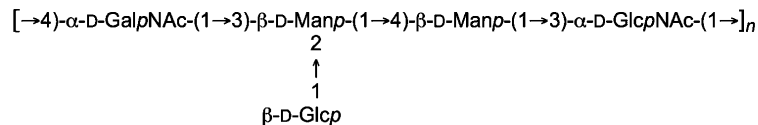
(O1A):



(O4-Glc+):



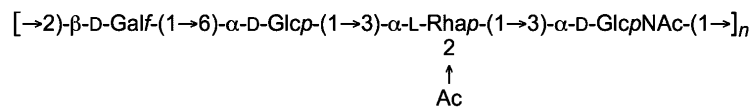
(O6A):



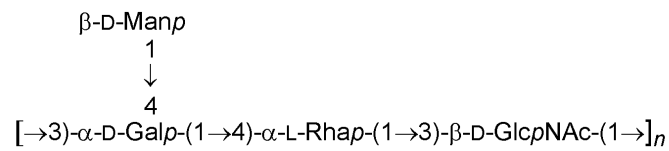
(O15):



(O16):



(O75):



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

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_x *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, которая содержит:

а) нуклеотидную последовательность кластера генов *gfb* для полисахарида O_x-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_y,

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

когда O_x-антиген представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, PglB_y содержит аминокислотную мутацию N311V или аминокислотные мутации Y77H и N311V, а рекомбинантная клетка-хозяин дополнительно содержит последовательность, кодирующую 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_x представляет собой полисахаридный антиген O6A, PglB_y содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V;

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

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

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

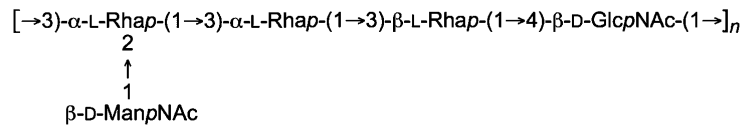
когда антиген O_x представляет собой полисахаридный антиген O18A, PglB_y не содержит аминокислотные мутации в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669; и

когда антиген O_x представляет собой полисахаридный антиген O75, PglB_y содержит аминокислотную мутацию N311V,

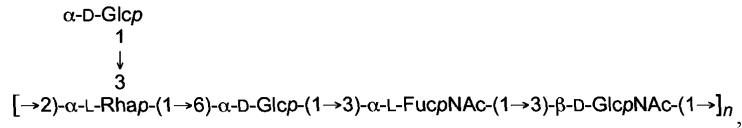
где в каждом случае аминокислотные мутации относятся к PglB_y дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и

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

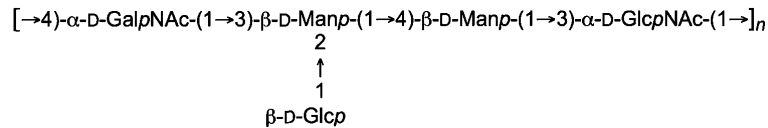
(O1A):



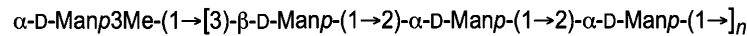
(O4-Glc+):



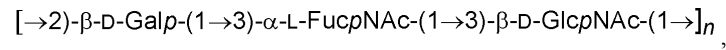
(O6A):



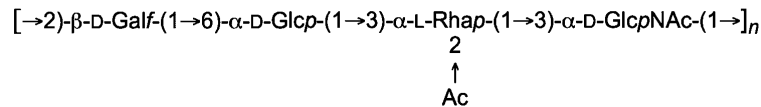
(O8):



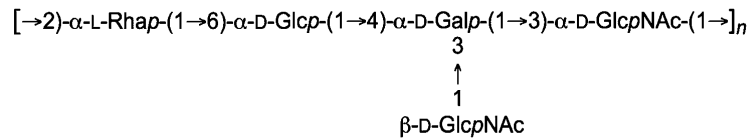
(O15):



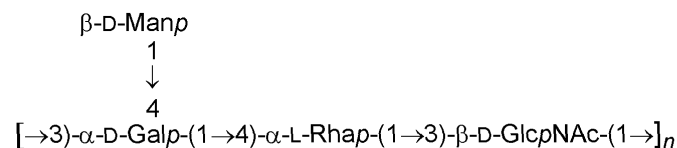
(O16):



(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_x представляет собой гликозилированный полисахаридный антиген O4, а PglB_y 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.

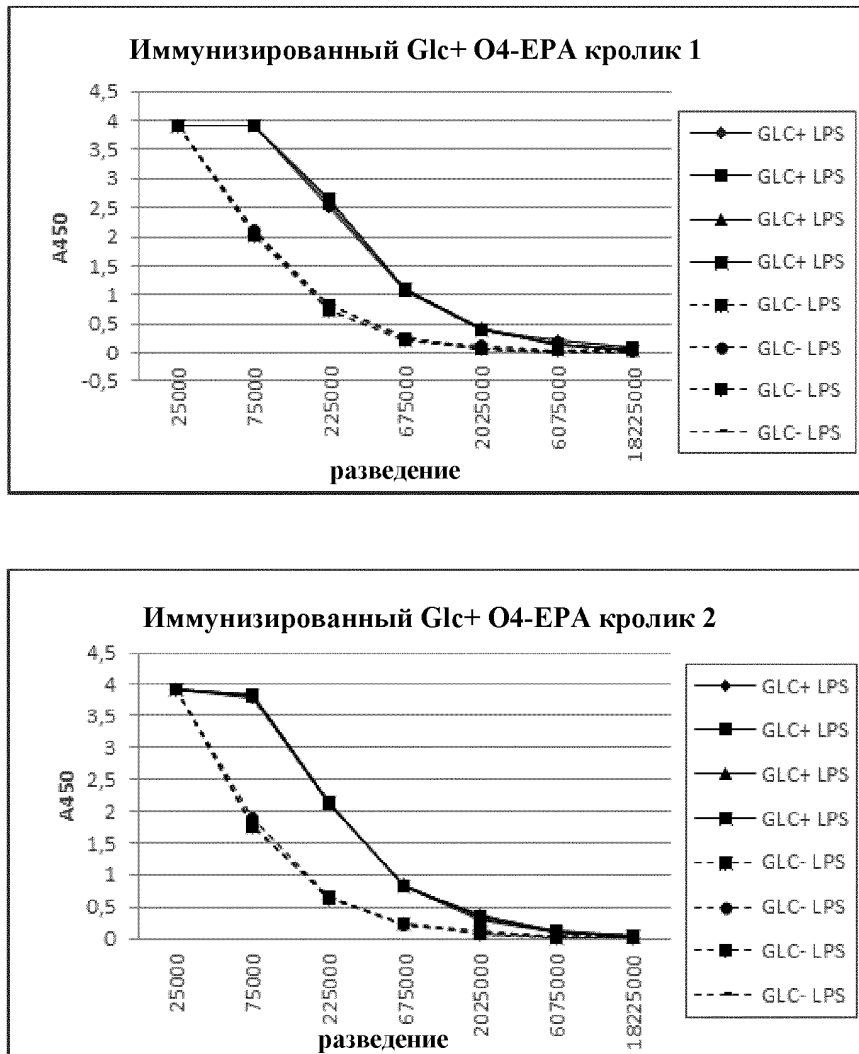
19. Рекombинантная прокариотическая клетка-хозяин по любому из пп.14-18, где белок-носитель выбран из группы, состоящей из обезвреженного экзотоксина A P. aeruginosa (EPA), флагеллина E. coli (Flc), CRM197, мальтозосвязывающего белка (MBP), дифтерийного анатоксина, столбнячного анаток-

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* (OMPC) и белка D из нетипируемого *Haemophilus influenzae*.

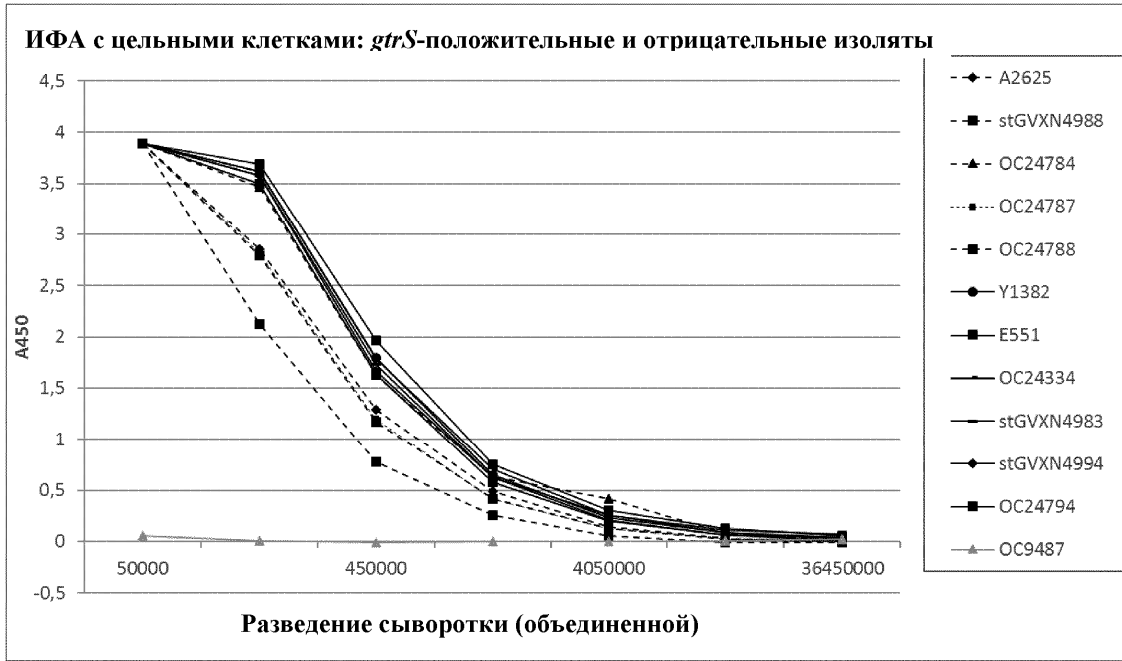
20. Рекombинантная прокариотическая клетка-хозяин по п.19, где белок-носитель представляет собой ЕРА, предпочтительно где белок-носитель ЕРА содержит 1-10 сайтов гликозилирования, предпочтительно где белок-носитель ЕРА содержит SEQ ID NO: 3.

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

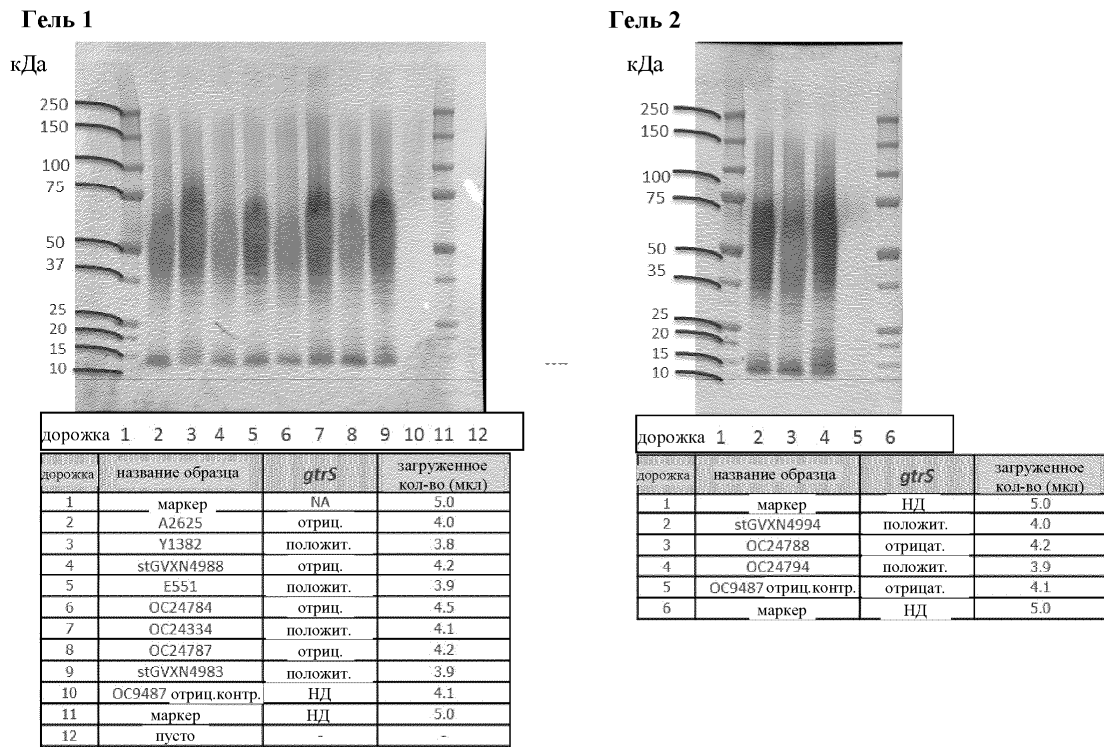
22. Рекombинантная прокариотическая клетка-хозяин по п.21, где клетка *E. coli* представляет собой штамм *E. coli* W3110.



Фиг. 1

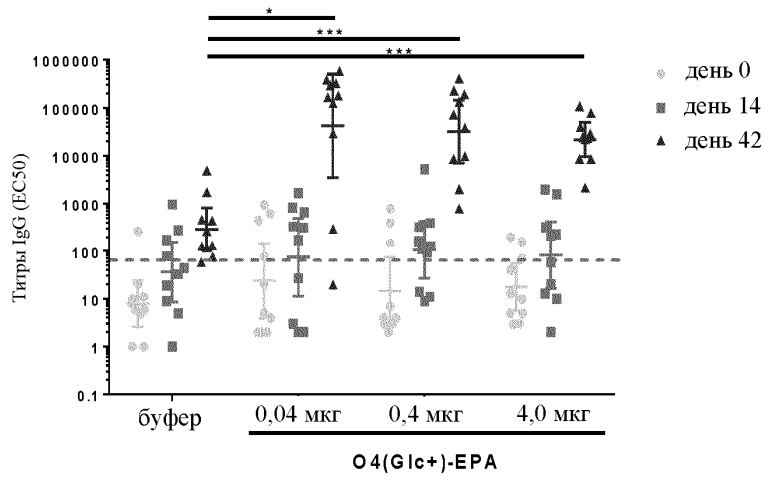


Фиг. 2

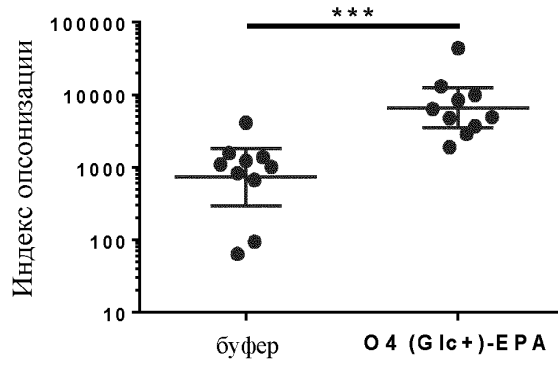


Фиг. 3

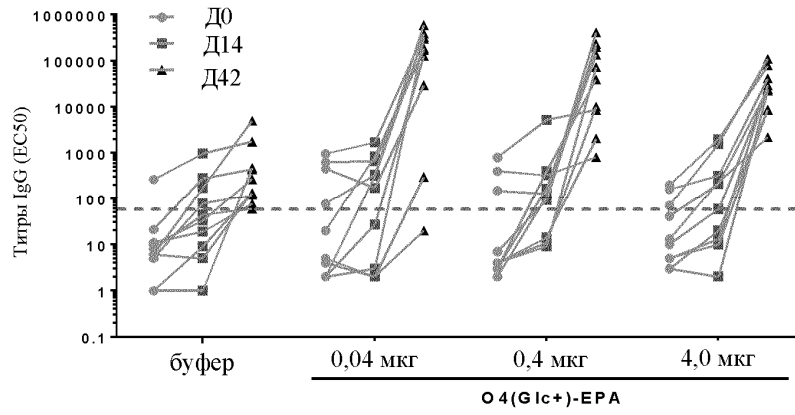
046636



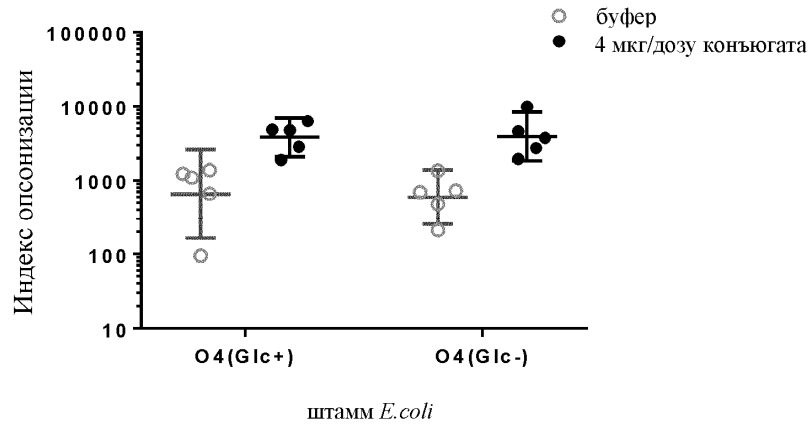
Фиг. 4А



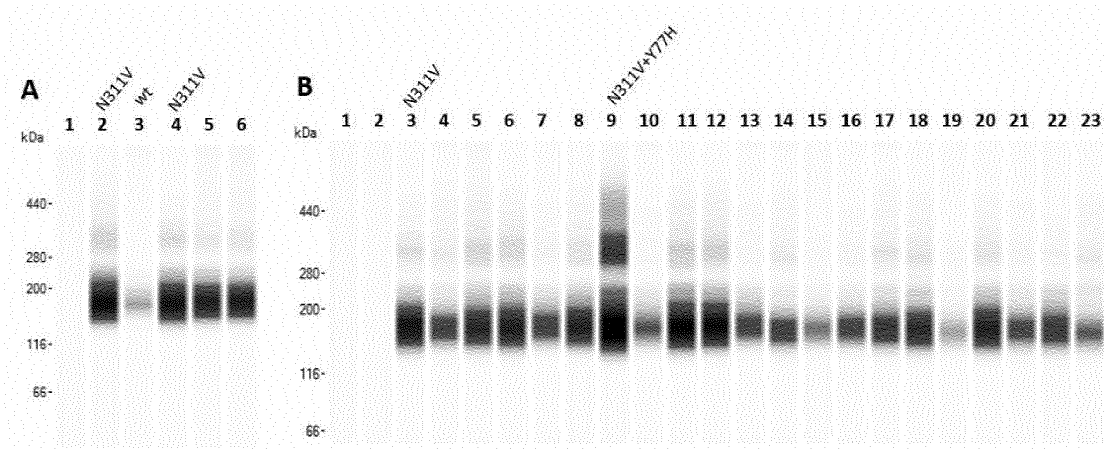
Фиг. 4В



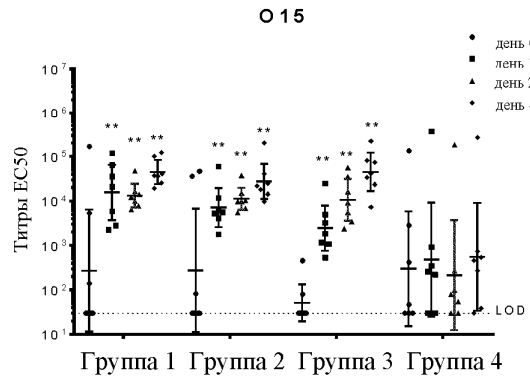
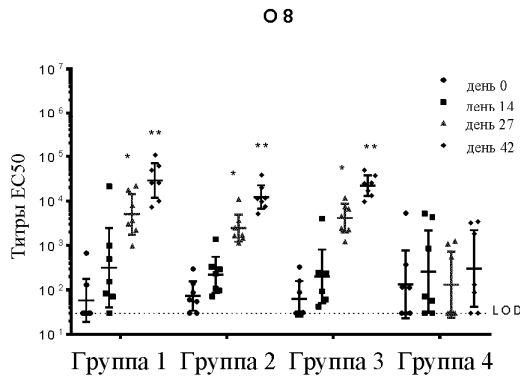
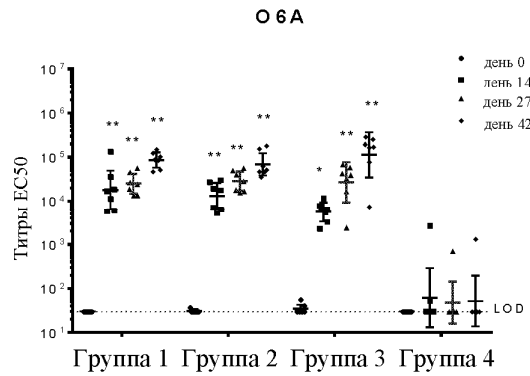
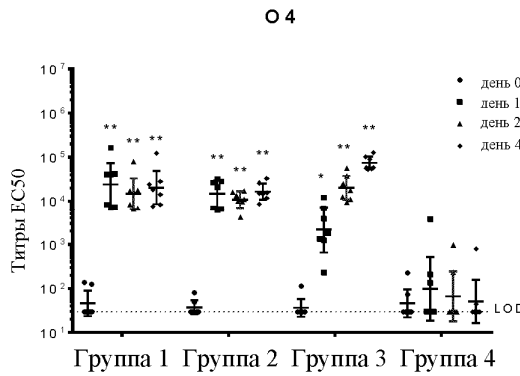
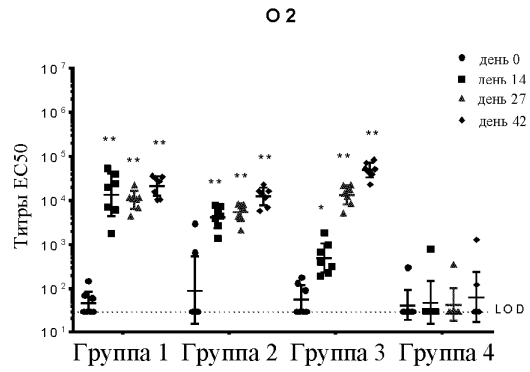
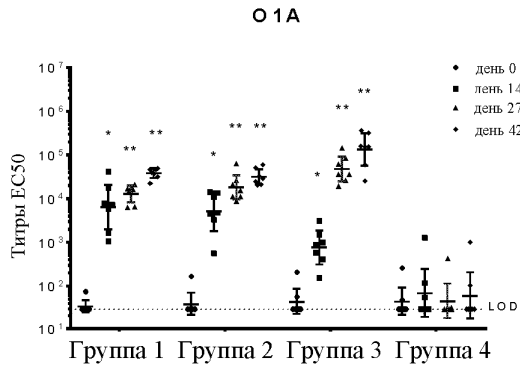
Фиг. 5

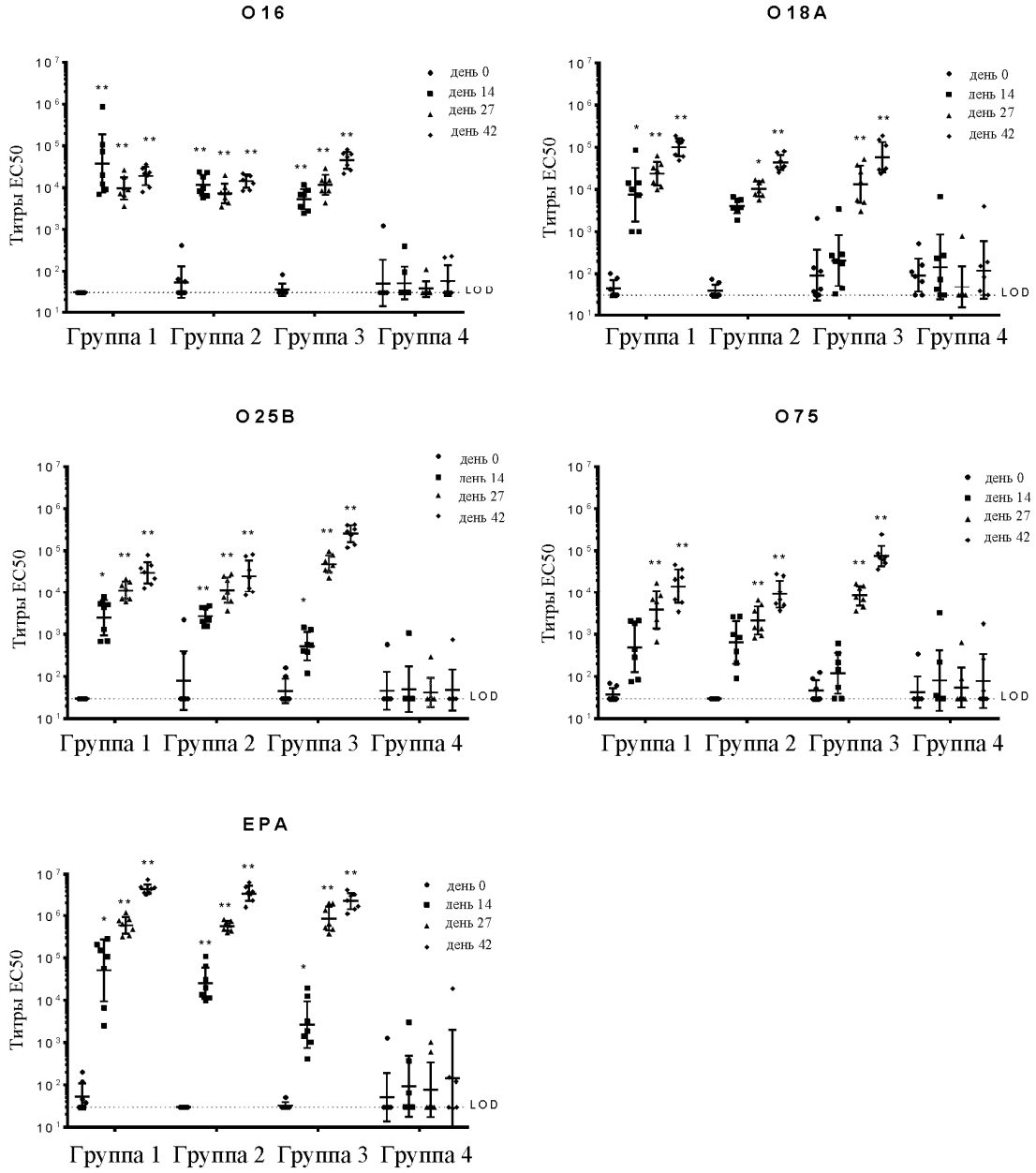


Фиг. 6

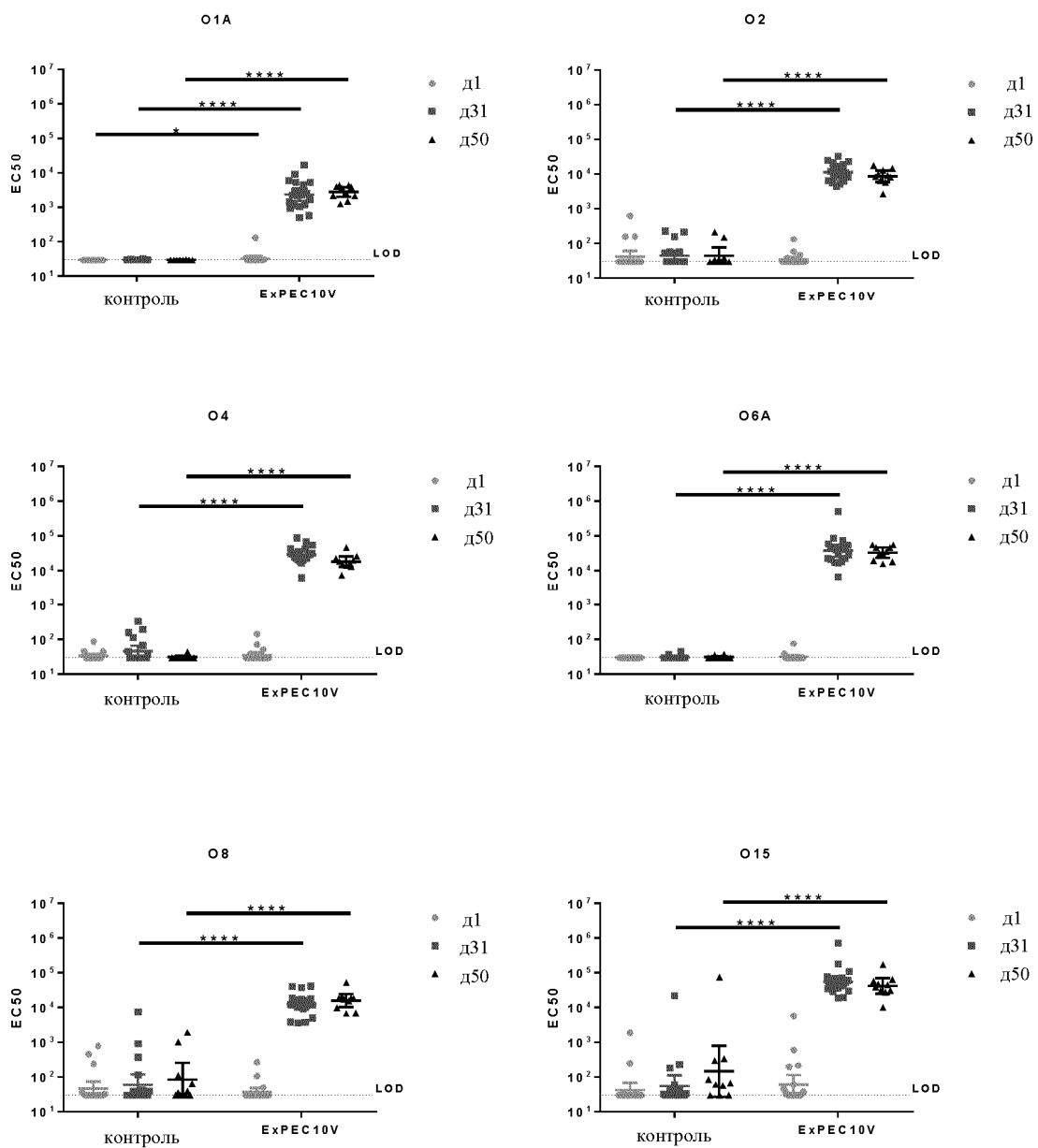


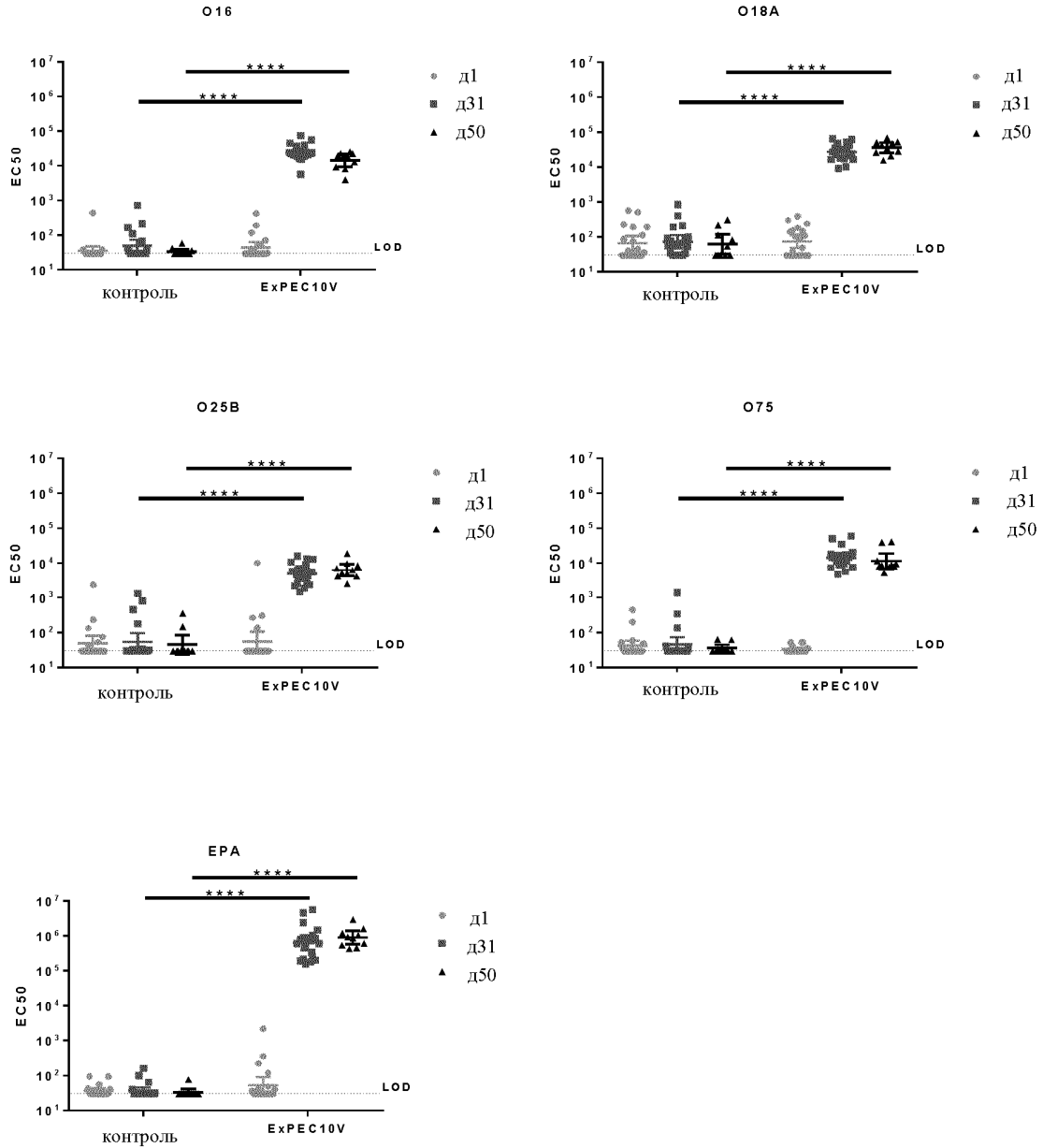
Фиг. 7



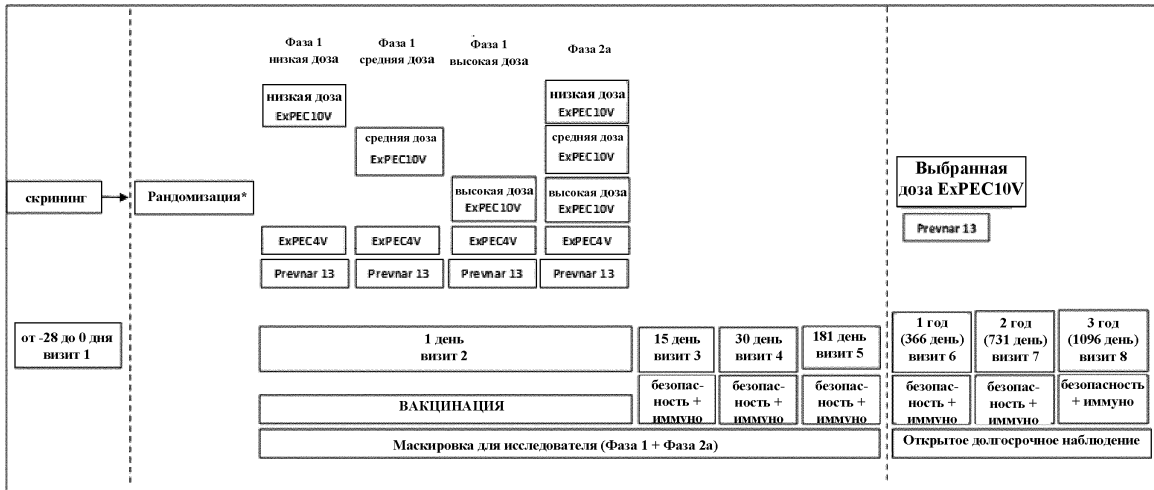


Фиг. 8

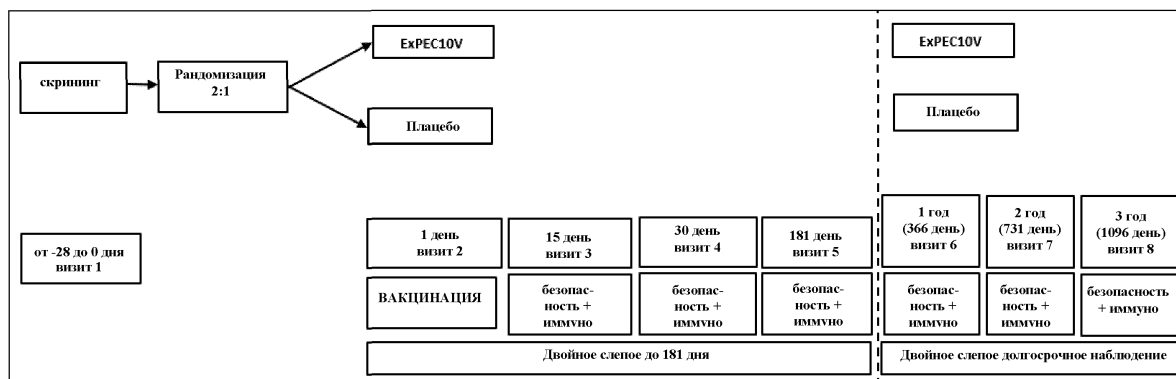




Фиг. 9



Фиг. 10А



Фиг. 10В

