(19) Евразийское патентное ведомство

(21) **202192392** (13) **A1**

# (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ


(43) Дата публикации заявки
**2022.02.09**

(22) Дата подачи заявки
**2020.03.18**

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


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


(31) **62/819,762**
(32) **2019.03.18**
(33) **US**
(86) **PCT/US2020/023415**
(87) **WO 2020/191088 2020.09.24**



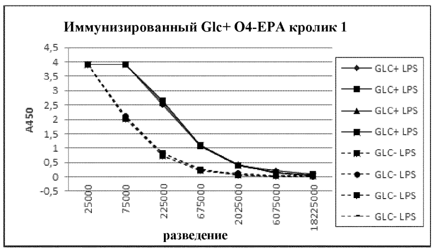
(71) Заявитель:
**ЯНССЕН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US); ГЛАКСОСМИТКЛАЙН БАЙОЛОДЖИКАЛС С.А. (BE)**

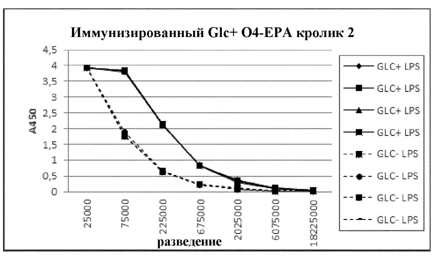
(72) Изобретатель:
**Гёртсен Ерун, Бюргаут Питер Ян, Верденбург Эвелине Марлен, Пулман Ян Тёнис, Фа Келлен Кристина, Ибарра Ион Патрисиа, Аббанат Даррен Роберт (NL), Кеммлер Стэфан Йохен, Коварик Михель Томас, Малли Мануэла, Гамбиллара Фонк Вероника, Браун Мартин Эдвард, Карранза Сандмейер Мария Паула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

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



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



202192392 A1
202192392 A1

PCT/US2020/023415 **МПК:** ***C12N 9/10*** (2006.01) ***C12P 21/00*** (2006.01)

# СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ БИОКОНЪЮГАТОВ ПОЛИСАХАРИДНЫХ О-АНТИГЕНОВ *E. COLI,* ИХ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

## ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

**[001]** 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

**[002]** Данная заявка 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, размером 199 кб. Перечень последовательностей, поданный через EFS-Web, является частью описания и включен в него во всей полноте путем ссылки.

## ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

**[003]** 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 О-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).

**[004]** 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 цефалоспоринам.

**[005]** О-антиген включает иммунодоминантный компонент липополисахарида клеточной стенки (ЛПС) грамотрицательных бактерий, включая *E. coli*. В настоящее время идентифицировано более 180 серологически уникальных О-антигенов *E. coli*, при этом подавляющее большинство изолятов ExPEC классифицируются по менее чем 20 серотипам О-антигенов. Полноразмерные О-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 *rfb* и *rfa,* соответственно. После полимеризации О-антигена остов полисахарида О-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 О-антиген, обычно находятся за пределами кластера *rfb* на хромосоме, и в некоторых случаях эти гены обнаруживаются внутри лизогенных бактериофагов.

**[006]** Изоляты ExPEC, принадлежащие к серогруппе O4, обычно выявлялись в современных мониторинговых исследованиях изолятов крови в США и ЕС. Структура полисахарида O4 была определена как -->2) 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, pp.241-250). Для штаммов O4:K3, O4:K6 и O4:K12 была определена отдельная форма структуры полисахарида O4, у которых указанная выше структура модифицирована добавлением 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.

**[007]** 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 исследовании 1 фазы (Cross et al., *J. Infect. Dis.* (1994) v.170, pp.834-40). Эта вакцина-кандидат никогда не была лицензирована для клинического применения. Недавно была разработана система биоконъюгирования в *E. coli,* в которой 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, pp. 7088-93). Эта система гликозилирования N-связанного белка способна переносить различные полисахариды на белок-носитель, что позволяет использовать простые способы для очистки конъюгата.

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

**[009]** Ввиду увеличения устойчивости изолятов ExPEC к антибиотикам и наличия дополнительных модификаций О-антигена среди преобладающих О-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 О-антиген, тем самым позволяя создавать рекомбинантные клетки-хозяева, способные синтезировать биоконъюгаты О-антигенов, включая биоконъюгаты, содержащие выбранные модификации О-антигена. Кроме того, в одном аспекте изобретения предложены клетки-хозяева и способы улучшенного получения биоконъюгатов определенных О-антигенов с применением вариантов олигосахарилтрансферазы (OST), основанные на преимуществах применения некоторых вариантов OST для биоконъюгатов некоторых О-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.

**[0010]** 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 *rfb* 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 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 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,

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 Таблице 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.

**[0011]** 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.

**[0012]** 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.

**[0013]** 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.

**[0014]** 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.

**[0015]** 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.

**[0016]** 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.

**[0017]** 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.

**[0018]** 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.

**[0019]** 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 *rfb* 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 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 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 гликзилировать 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 Таблице 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.

**[0020]** В некоторых воплощениях способ дополнительно включает выделение биоконъюгата из рекомбинантной клетки-хозяина.

**[0021]** 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*.

**[0022]** 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.

**[0023]** В некоторых воплощениях рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой клетку *E. coli*, например, штамм *E. coli* K-12, такой как штамм W3110.

**[0024]** В другом аспекте предложен биоконъюгат, полученный способом получения биоконъюгата полисахаридного антигена $O_x$, ковалентно связанного с белком-носителем, описанным в данном документе.

**[0025]** 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.

**[0026]** 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 Таблице 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 Таблице 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 Таблице 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.

**[0027]** 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 Таблице 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 Таблице 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.

**[0028]** 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).

**[0029]** 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 *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 $PglB_y$,

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 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 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 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 Таблице 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.

**[0030]** 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.

**[0031]** 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.

**[0032]** 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.

**[0033]** 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.

**[0034]** 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.

**[0035]** 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.

**[0036]** 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.

**[0037]** 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.

**[0038]** 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* (OMPC) и белка D из нетипируемого *Haemophilus influenzae.*

**[0039]** 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.

**[0040]** 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.

**[0041]** В некоторых воплощениях клеток-хозяев и способов получения биоконъюгата гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем по изобретению, генный кластер *rfb* для полисахаридного антигена O4 *E. coli* содержит последовательность, которая кодирует ферменты, которые создают полисахаридный антиген O4 *E. coli* (Формула (O4-Glc-) в Таблице 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 *rfb* содержит SEQ ID NO: 9.

**[0042]** В некоторых воплощениях клеток-хозяев и способов получения биоконъюгата гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем по изобретению, глюкозилтрансфераза, 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.

**[0043]** 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.

**[0044]** В некоторых воплощениях клеток-хозяев и способов получения биоконъюгата гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем по изобретению, гликозилтрансфераза способна гликозилировать бактопренол и имеет последовательность, которая по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, предпочтительно по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 8. В некоторых воплощениях гликозилтрансфераза содержит SEQ ID NO: 8.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

**[0045]** 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.

**[0046]** В графических материалах:

**[0047]** 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 имуноферментный анализ) в четырех повторностях;

**[0048]** 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;

**[0049]** 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;

**[0050]** На **ФИГ. 4A и 4B** показаны гуморальные ответы, индуцированные гликозилированными биоконъюгатами O4 (O4-Glc+)-EPA; на Фиг. **4A** показаны уровни антител в сыворотке, измеренные методом ELISA на 0, 14 и 42 дни после иммунизации; показаны индивидуальные титры (log10 EC50) и GMT (средний геометрический титр) ± 95% ДИ (доверительный интервал); серая пунктирная линия указывает порог, выше которого кривые разведения образцов описываются 4-параметрической логистической регрессионной моделью; на Фиг. **4B** показаны результаты опсонофагоцитарного анализа (OPK) 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 ≤0,0001;

**[0051]** На **ФИГ. 5** показан бустерный эффект гликозилированного биоконъюгата O4 (O4 Glc+) у крыс Спрег-Доули (Sprague Dawley), иммунизированных 3 различными дозами, как описано в примере 4; уровни антител в сыворотке измеряли с помощью ELISA на 0, 14 и 42 день после иммунизации; индивидуальные титры (log 10 EC50) показаны для каждого животного; линии между точками данных соединяют титры IgG для каждого животного во времени; серая пунктирная линия указывает порог, выше которого кривые разведения образцов описываются 4-параметрической логистической регрессионной моделью; статистический анализ проводили с помощью знакового рангового критерия Вилкоксона и поправки Бонферрони для множественных сравнений (день 14 против дня 0, P = 0,012 для 4,0 мкг/доза; день 42 против дня 0, P = 0,006 для всех доз; день 42 против дня 14, P = 0,006 для всех доз);

**[0052]** 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 (OPKA) с использованием штаммов O4(Glc+) и O4(Glc-) *E. coli*; показаны индивидуальные опсонические титры (OI) и GMT ± 95% ДИ;

**[0053]** На **ФИГ. 7** показаны электрофореграммы, по виду напоминающие блот, полученные при скрининге PglB при помощи капиллярного электрофореза с использованием моноклональных антител для детекции биоконъюгата O4-Glc+ в периплазматической фракции, позволяющие визуализировать продуцирование биоконъюгата O4-Glc+ для каждого тестируемого штамма. Моногликозилированный продукт примерно 180 кДа, дигликозилированный продукт примерно 320 кДа и тригликозилированный продукт примерно 450 кДа. А) Первый цикл скрининга PglB дикого типа на дорожке 3, N311V-PglB на дорожках 2 и 4, пустой контрольный штамм на дорожке 1 и другие варианты PglB на дорожках 5 и 6, 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.

**[0054]** 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, Таблица 11) и контрольная группа получала только физ. раствор (группа 4, 0,9% (масс./об.) раствор хлорида натрия). Уровни антител измеряли с помощью ELISA в день 0 (до вакцинации) и на 14, 27 и 42 дни (после вакцинации). Показаны индивидуальные титры (значения EC50) и средние геометрические титры (GMT) ± 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.

**[0055]** На **ФИГ. 9** показан гуморальный ответ, индуцированный ExPEC10V. Новозеландские белые кролики получали 3 внутримышечных иммунизации ExPEC10V (суммарно 105,6 мкг полисахарида) или 0,9% масс./об. раствор хлорида натрия (контроль). Титры IgG определяли при помощи ELISA в день 1 (до иммунизации, n = 20/группу), день 31 (после иммунизации, n = 20/группу) и день 50 (после иммунизации, n = 10/группу). На графиках показаны индивидуальные титры и среднее геометрическое значение ± 95% доверительный интервал для каждой группы. Различия в титрах IgG между групапми, 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.

**[0056]** 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

**[0057]** 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.

**[0058]** 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.

**[0059]** 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.

**[0060]** Если не указано иное, термин «по меньшей мере», предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в ряду.

**[0061]** 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.

**[0062]** 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».

**[0063]** «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.

**[0064]** 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».

**[0065]** 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 *rfb*. На сегодняшний день модифицирующий О-антиген фермент, ответственный за ответвление глюкозы в штаммах O4 *E. coli*, не идентифицирован. Клонирование генного кластера *rfb* 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 Таблице 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 Таблице 1.

**[0066]** В настоящем документе раскрывается ген, кодирующий фермент, модифицирующий О-антиген, ответственный за ответвление глюкозы полисахаридного антигена O4 *E. coli*. Также описаны клетки-хозяева, например, генно-модифицированные клетки-хозяева, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую ферменты, способные продуцировать биоконъюгаты, содержащие гликозилированный полисахаридный антиген O4, ковалентно связанный с белком-носителем *in vivo*. Такие клетки-хозяева можно использовать для создания биоконъюгатов, содержащих гликозилированный антиген O4, связанный с белком-носителем, которые можно примененять, 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 примененять 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.

**[0067]** Используемые в данном документе термины «О-антиген», «полисахаридный О-антиген», «сахаридный О-антиген» и «OPS» относятся к О-антигену грамотрицательных бактерий. Обычно О-антиген представляет собой полимер иммуногенных повторяющихся полисахаридных единиц. В конкретном воплощении термины «О-антиген», «полисахаридный О-антиген» и «OPS» относятся к О-антигену *Escherichia coli*. Различные серотипы *E. coli* экспрессируют разные О-антигены. В *E. coli* продукты генов, участвующие в биогенезе О-антигена, кодируются генным кластером *rfb.*

**[0068]** Используемые в данном документе термины «кластер *rfb*» и «генный кластер *rfb*» относятся к генному кластеру, кодирующему ферментный аппарат, способный синтезировать структуру, являющуюся остовом О-антигена. Термин кластер *rfb* может применяться к любому кластеру биосинтеза О-антигена и предпочтительно относится к кластеру генов из рода *Escherichia*, в частности, *E. coli.*

**[0069]** 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).

**[0070]** Структуры полисахаридных О-антигенов *E. coli*, упоминаемые в данной заявке, показаны ниже в Таблице 1. Показана одна повторяющаяся единица для каждого полисахаридного О-антигена *E. coli.*

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

| **Полисахаридные О-антигены *E. coli*** | **Структура повторяющейся единицы**[1] |
|---|---|
| Негликозилиро-ванный полисахаридный | [→2)-α-L-Rha*p*-(1→6)-α-D-Glc*p*-(1→3)-α-L-Fuc*p*NAc-(1→3)-β-D-Glc*p*NAc-(1→]$_n$ |

| | |
|---|---|
| антиген O4 (O4-Glc-) | |
| Гликозилированный полисахаридный антиген O4 (O4-Glc+) | α-D-Glc*p*<br>1<br>↓<br>3<br>[→2)-α-L-Rha*p*-(1→6)-α-D-Glc*p*-(1→3)-α-L-Fuc*p*NAc-(1→3)-β-D-Glc*p*NAc-(1→]$_n$ |
| Полисахаридный антиген O1A (O1A) | [→3)-α-L-Rha*p*-(1→3)-α-L-Rha*p*-(1→3)-β-L-Rha*p*-(1→4)-β-D-Glc*p*NAc-(1→]$_n$<br>2<br>↑<br>1<br>β-D-Man*p*NAc |
| Полисахаридный антиген O2 (O2) | [→3)-α-L-Rha*p*-(1→2)-α-L-Rha*p*-(1→3)-β-L-Rha*p*-(1→4)-β-D-Glc*p*NAc-(1→]$_n$<br>2<br>↑<br>1<br>α-D-Fuc*p*3NAc |
| Полисахаридный антиген O6A (O6) | [→4)-α-D-Gal*p*NAc-(1→3)-β-D-Man*p*-(1→4)-β-D-Man*p*-(1→3)-α-D-Glc*p*NAc-(1→]$_n$<br>2<br>↑<br>1<br>β-D-Glc*p* |
| Полисахаридный антиген O8 (O8) | α-D-Man*p*3Me-(1→[3)-β-D-Man*p*-(1→2)-α-D-Man*p*-(1→2)-α-D-Man*p*-(1→]$_n$ |
| Полисахаридный антиген O15 (O15) | [→2)-β-D-Gal*p*-(1→3)-α-L-Fuc*p*NAc-(1→3)-β-D-Glc*p*NAc-(1→]$_n$ |
| Полисахаридный антиген O16 (O16) | [→2)-β-D-Gal*f*-(1→6)-α-D-Glc*p*-(1→3)-α-L-Rha*p*-(1→3)-α-D-Glc*p*NAc-(1→]$_n$<br>2<br>↑<br>Ac |
| Полисахаридный антиген O18A (O18A) | [→2)-α-L-Rha*p*-(1→6)-α-D-Glc*p*-(1→4)-α-D-Gal*p*-(1→3)-α-D-Glc*p*NAc-(1→]$_n$<br>3<br>↑<br>1<br>β-D-Glc*p*NAc |

| | |
|---|---|
| Полисахаридный антиген O25B (O25B) | β-D-Glc*p*<br>1<br>↓<br>6<br>[→4)-α-D-Glc*p*-(1→3)-α-L-Rha*p*-(1→3)-β-D-Glc*p*NAc-(1→]$_n$<br>3 2<br>↑ ↑<br>1 Ac<br>α-L-Rha*p* |
| Полисахаридный антиген O75 (O75) | β-D-Man*p*<br>1<br>↓<br>4<br>[→3)-α-D-Gal*p*-(1→4)-α-L-Rha*p*-(1→3)-β-D-Glc*p*NAc-(1→]$_n$ |

1 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.

**[0071]** 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.

**[0072]** 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 О-антигена, который конкретно описан в данном документе, показана содержащей одну RU с переменной «n», обозначающей количество RU. В каждом полисахаридном О-антигене в составе биоконъюгата по изобретению n независимо равно целому числу от 1 до 100, такому как 1-50, 1-40, 1-30, 1-20, 1-10, предпочтительно по меньшей мере 3, более предпочтительно по меньшей мере 5, например, 3-50, предпочтительно 5-40 (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40), но в некоторых случаях может быть 1-2. В некоторых воплощениях n независимо представляет собой целое число от 7 до 25, например, приблизительно 10-20. Значения могут варьировать между отдельными полисахаридными О-антигенами в составе композиции и представлены здесь как средние значения, т.е. если биоконъюгат описан здесь как имеющий n, которое независимо равно целому числу 5-40, большая часть полисахаридных О-антигенов, содержащихся в композиции, имеет 5-40 повторяющихся единиц, но также могут содержаться некоторые полисахаридные О-антигены, имеющие менее 5 повторяющихся единиц или более 40 повторяющихся единиц.

**[0073]** 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.

**[0074]** Термин «биоконъюгат» относится к конъюгату между белком (например, белком-носителем) и сахарным или сахаридным антигеном (например, олиго- и полисахаридным), полученным в клетке-хозяине, предпочтительно бактериальной клетке-хозяине, например, клетке-хозяине *E.coli*, где аппарат клетки-хозяина связывает антиген с белком (например, связывает с N). Предпочтительно, термин «биоконъюгат» относится к конъюгату между белком (например, белком-носителем) и О-антигеном, предпочтительно О-антигеном *E.coli* (например, O1A, O2, гликозилированным O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B, O75 и т.д.), полученным в клетке-хозяине, где аппарат клетки-хозяина связывает антиген с белком (например, связывает с N). Поскольку биоконъюгаты получают в клетках-хозяевах благодаря аппарату клетки-хозяина, антиген и белок ковалентно связаны в составе биоконъюгата через гликозидную связь. Биоконъюгаты могут быть получены в рекомбинантных клетках-хозяевах, генетически модифицированных для экспрессии клеточного аппарата, необходимого для синтеза О-антигена и/или связывания О-антигена с целевым белком. Биоконъюгаты, которые описаны в данном документе, обладают преимуществами по сравнению с химически полученными гликоконъюгатами, в которых гликаны выделены из клеточной стенки бактерий и впоследствии химически связаны с белком-носителем, например, биоконъюгаты требуют меньшего количества химических веществ при производстве и являются более однородными с точки зрения получаемого конечного продукта и содержат меньше или совсем не содержат свободного (т.е. не связанного с белком-носителем) гликана. Таким образом, в типичных воплощениях биоконъюгаты предпочтительны по сравнению с гликоконъюгатами, полученными химическим путем.

**[0075]** Термин «приблизительно», когда он используется вместе с числом, относится к любому числу в пределах ±1, ±5 или ±10% от указанного числа.

**[0076]** Термин «процент (%) идентичности последовательностей» или «% идентичности» описывает количество соответствий («совпадений») идентичных аминокислот двух или более выровненных аминокислотных последовательностей по сравнению с количеством аминокислотных остатков, составляющих общую длину аминокислотных последовательностей. Другими словами, используя выравнивание, можно установить процент одинаковых аминокислотных остатков для двух или более последовательностей (например, 90%, 95%, 97% или 98% идентичности), когда последовательности сравниваются и выравниваются для максимального соответствия, определенного с использованием алгоритма сравнения последовательностей, известного в данной области техники, или при выравнивании вручную и визуальной проверке. Последовательности, которые сравнивают для определения идентичности последовательностей, могут, таким образом, отличаться заменой(ами), добавлением(ями) или делецией(ями) аминокислот. Программы, подходящие для выравнивания белковых последовательностей, известны специалистам в области техники. Процент идентичности белковых последовательностей можно определить, например, с использованием таких программ как CLUSTALW, Clustal Omega, FASTA или BLAST, например, используя алгоритм NCBI BLAST (Altschul SF, et al (1997), Nucleic Acids Res. 25:3389-3402).

**[0077]** 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.

**[0078]** 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.

**[0079]** Дополнительным полезным алгоритмом является «gapped BLAST», опубликованный Altschul et al, 1993, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402.

**[0080]** Термин «инвазивное заболевание, вызываемое внекишечными патогенными *Escherichia coli* (ExPEC) (IED)» определяется здесь как острое заболевание с системной бактериальной инфекцией, которое микробиологически подтверждается либо выделением и идентификацией *E. coli* из крови или других обычно стерильных участков тела, либо выделением и идентификацией *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.

**[0081]** **Биоконъюгаты гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli***

**[0082]** 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-рамнозой в повторяющейся единице L-Rha→D-Glc→L-FucNAc→D-GlcNAc. В конкретном воплощении гликозилированный полисахаридный антиген O4 *E. coli* содержит структуру формулы (O4-Glc+), как показано в Таблице 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.

**[0083]** Штаммы *E. coli* O4 независимо от статуса ответвления глюкозы, несут по существу идентичный кластер генов *rfb*, 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 *rfb*. 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.

**[0084]** 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.

**[0085]** В одном воплощении предложена нуклеиновая кислота гена *gtrS* из *E.coli* серотипа O4, кодирующая глюкозилтрансферазу GtrS, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. В другом воплощении нуклеиновая кислота *gtrS* кодирует белок GtrS из *E. coli* серотипа O4, который приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, предпочтительно на 98%, 99% или 100% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4. Белок GtrS, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, способен специфически гликозилировать полисахаридный антиген O4 *E. coli* для получения гликозилированного антигена O4, имеющего структуру формулы (O4-Glc+), как показано в Таблице 1. Специалист в области техники сможет создать мутированные формы белка GtrS SEQ ID NO: 4, идентичные по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO: 4, и протестировать такие последовательности на активность гликозилирования антигена O4 *E. coli* с учетом изложенного в данном документе изобретения. Рекомбинантные клетки-хозяева, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ген глюкозилтрансферазы *gtrS E.coli* серотипа O4, и применение рекомбинантных клеток-хозяев для получения полисахаридных антигенов O4, модифицированных глюкозой, и их биоконъюгатов описаны более подробно ниже.

**[0086]** Последовательности для белков, кодируемых *gtrA* и *gtrB*, которые функционируют как транслоказа глюкозы, связанной с бактопренолом (GtrA, перетаскивает глюкозу, связанную с бактопренолом, через внутреннюю мембрану в периплазму) и бактопренол глюкозилтрансферазы (GtrB, связывает глюкозу с бактопренолом), соответственно, могут содержать аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере примерно на 80% идентичны SEQ ID NO: 7 и 8 соответственно. В некоторых воплощениях последовательности нуклеиновых кислот, кодирующих белки GtrA и GtrB, которые по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны SEQ ID NO: 7 и 8, соответственно, и обладающие активностью транслоказы глюкозы, связанной с бактопренолом, и бактопренол глюкозилтрансферазы, соответственно, также присутствуют в клетках-хозяевах по изобретению, которые дополнительно содержат O4-специфический локус *rfb*, 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 Таблице 1).

**[0087]** 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* (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. Описано биоконъюгирование с различными белками-носителями, содержащими требуемую консенсусную последовательность гликозилирования, демонстрируя, что с помощью этой технологии можно гликозилировать широкий спектр белков (см., например, WO 06/119987, WO 2015/124769, WO 2015/158403, WO 2015/82571, WO 2017/216286 и WO 2017/67964, вместе демонстрирующие широкий спектр белков-носителей, которые успешно применялись в биоконъюгации).

**[0088]** 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.

**[0089]** 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.

**[0090]** 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).

**[0091]** 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.

**[0092]** В конкретных воплощениях белок-носитель представляет собой обезвреженный экзотоксин А *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 А 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.

**[0093]** 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. Используемыев данном документе термины «белок-носитель EPA-4» и «EPA-4» относятся к белку-носителю, представляющему собой обезвреженный экзотоксин А из *P. aeruginosa*, содержащему четыре сайта гликозилирования, каждый из которых содержит консенсусные последовательности гликозилирования, имеющие SEQ ID NO: 2. Предпочтительным примером белка-носителя является белок-носитель EPA, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

**[0094]** **Композиции**

**[0095]** 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.

**[0096]** 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.

**[0097]** 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 мМ, 137 мМ и 2,7 мМ, соответственно). В других воплощениях композиции по изобретению содержат биоконъюгаты по изобретению в буфере $KH_2PO_4/Na_2HPO_4$ с концентрацией приблизительно 10 мМ и pH приблизительно 7,0, содержащем приблизительно 5% (масс./об.) сорбита, приблизительно 10 мМ метионина и приблизительно 0,02% (масс./об.) полисорбата 80. В других воплощениях композиции по изобретению содержат биоконъюгаты по изобретению в буфере $KH_2PO_4/Na_2HPO_4$ с концентрацией приблизительно 10 мМ и pH приблизительно 7,0, содержащем приблизительно 8% (масс./об.) сахарозы, приблизительно 1 мМ ЭДТА и приблизительно 0,02% (масс./об.) полисорбата 80 (см., например, WO 2018/077853 о подходящих буферах для биоконъюгатов О-антигенов *E.coli*, ковалентно связанных с белком-носителем EPA).

**[0098]** В некоторых воплощениях описанные композиции представляют собой одновалентные составы и содержат один полисахаридный О-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 О-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.

**[0099]** 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.

**[00100]** 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.

**[00101]** В некоторых воплощениях дополнительный антиген представляет собой сахаридный или полисахаридный антиген, более предпочтительно полисахаридный О-антиген *E. coli*, такой как О-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 О-антигенов *E. coli* представляет собой гликоконъюгат, что означает, что полисахаридный О-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 О-антигенов *E. coli* представляет собой биоконъюгат, в котором полисахаридный О-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 О-антигенов *E. coli*, таких как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 дополнительных гликоконъюгатов или предпочтительно биоконъюгатов полисахаридных О-антигенов *E. coli*. В композиции, предложенные в данном документе, могут быть включены другие антигены, такие как пептидные, белковые или липидные антигены и т. д.

**[00102]** В некоторых воплощениях композиция (например, фармацевтическая и/или иммуногенная композиция) содержит биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli* и по меньшей мере один дополнительный полисахаридный антиген, выбранный из группы, состоящей из полисахаридного антигена O1A *E.coli*, полисахаридного антигена O2 *E.coli*, полисахаридного антигена O6A *E.coli*, полисахаридного антигена O8 *E.coli*, полисахаридного антигена O15 *E.coli*, полисахаридного антигена O16 *E.coli*, полисахаридного антигена O18 *E.coli*, полисахаридного антигена O25B *E.coli* и полисахаридного антигена O75 *E.coli*. Предпочтительно каждый из дополнительных полисахаридных О-антигенов ковалентно связан с белком-носителем и более предпочтительно является биоконъюгатом.

**[00103]** В одном воплощении полисахаридный антиген O1A (например, в выделенной форме или в составе гликоконъюгата или биоконъюгата) используется в предложенной композиции (например, в комбинации с гликозилированным полисахаридным О-антигеном O4 или его биоконъюгатом). В конкретном воплощении полисахаридный антиген O1A содержит структуру формулы (O1A), как показано в Таблице 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.

**[00104]** 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 Таблице 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Предпочтительно полисахаридный антиген O2 является частью биоконъюгата и ковалентно связан с белком-носителем, например, EPA.

**[00105]** В одном воплощении полисахаридный антиген O6A (например, в выделенной форме или в составе гликоконъюгата или биоконъюгата) используется в предложенной композиции (например, в комбинации с гликозилированным полисахаридным антигеном O4 или его биоконъюгатом). В конкретном воплощении полисахаридный антиген O6A содержит структуру формулы (O6A), как показано в Таблице 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Предпочтительно полисахаридный антиген O6A является частью биоконъюгата и ковалентно связан с белком-носителем, например, EPA.

**[00106]** В одном воплощении полисахаридный антиген O8 (например, в выделенной форме или в составе гликоконъюгата или биоконъюгата) используется в предложенной композиции (например, в комбинации с гликозилированным полисахаридным антигеном O4 или его биоконъюгатом). В конкретном воплощении полисахаридный антиген O8 содержит структуру формулы (O8), как показано в Таблице 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Предпочтительно полисахаридный антиген O8 является частью биоконъюгата и ковалентно связан с белком-носителем, например, EPA.

**[00107]** В одном воплощении полисахаридный антиген O15 (например, в выделенной форме или в составе гликоконъюгата или биоконъюгата) используется в предложенной композиции (например, в комбинации с гликозилированным полисахаридным антигеном O4 или его биоконъюгатом). В конкретном воплощении полисахаридный антиген O15 содержит структуру формулы (O15), как показано в Таблице 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Предпочтительно полисахаридный антиген O15 является частью биоконъюгата и ковалентно связан с белком-носителем, например, EPA.

**[00108]** В одном воплощении полисахаридный антиген O16 (например, в выделенной форме или в составе гликоконъюгата или биоконъюгата) используется в предложенной композиции (например, в комбинации с гликозилированным полисахаридным антигеном O4 или его биоконъюгатом). В конкретном воплощении полисахаридный антиген O16 содержит структуру формулы (O16), как показано в Таблице 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Предпочтительно полисахаридный антиген O16 является частью биоконъюгата и ковалентно связан с белком-носителем, например, EPA.

**[00109]** В одном воплощении полисахаридный антиген O18A (например, в выделенной форме или в составе гликоконъюгата или биоконъюгата) используется в предложенной композиции (например, в комбинации с гликозилированным полисахаридным антигеном O4 или его биоконъюгатом). В конкретном воплощении полисахаридный антиген O18A содержит структуру формулы (O18A), как показано в Таблице 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например от 5 до 40, например от 7 до 25, например от 10 до 20. Предпочтительно полисахаридный антиген O18A является частью биоконъюгата и ковалентно связан с белком-носителем, например, EPA.

**[00110]** В одном воплощении полисахаридный антиген O25B (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 O25B содержит структуру формулы (O25B), как показано в Таблице 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 O25B является частью биоконъюгата и ковалентно связан с белком-носителем, например, EPA.

**[00111]** В одном воплощении полисахаридный антиген O75 (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 O75 содержит структуру формулы (O75), как показано в Таблице 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 O75 является частью биоконъюгата и ковалентно связан с белком-носителем, например, EPA.

**[00112]** В другом воплощении композиция (например, фармацевтическая и/или иммуногенная композиция) содержит по меньшей мере полисахаридные антигены O1A, O2, гликозилированный O4, O6A и O25B *E. coli*, предпочтительно биоконъюгаты полисахаридных антигенов O1A, O2, гликозилированного O4, O6A и O25B, ковалентно связанных с белком-носителем (например, пятивалентная композиция).

**[00113]** В предпочтительнм воплощении композиция (например, фармацевтическая и/или иммуногенная композиция) содержит по меньшей мере полисахаридные антигены O1A, O2, гликозилированный O4, O6A, O8, O15, O16, O25B и O75 *E. coli*, предпочтительно биоконъюгаты полисахаридных антигенов O1A, O2, гликозилированного O4, O6A, O8, O15, O16, O25B и O75, ковалентно связанных с белком-носителем (например, 9-валентная композиция).

**[00114]** В другом предпочтительнм воплощении композиция (например, фармацевтическая и/или иммуногенная композиция) содержит по меньшей мере полисахаридные антигены O1A, O2, гликозилированный 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).

**[00115]** 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.

**[00116]** 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.

**[00117]** 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.

**[00118]** 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 Таблице 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.

**[00119]** 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 Таблице 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.

**[00120]** В некоторых воплощениях предложенная композиция содержит биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli* и по меньшей мере биоконъюгат полисахаридного антигена O25B *E.coli,* где биоконъюгат антигена O25B *E.coli* присутствует в композиции в концентрации, которая приблизительно в 1,5-6 раз, например в 2-4 раза выше, например в 1,5, 2, 3, 4, 5 или 6 раз выше, чем концентрация любого другого биоконъюгата, присутствующего в композиции.

**[00121]** 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) 1:1:1:1:1:1:1:2:1 или 2:1:1:2:1:1:1:4:1.

**[00122]** 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) 1:1:1:1:1:1:1:1:2:1 или 2:1:1:2:1:1:1:1:4:1.

**[00123]** 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.

**[00124]** 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 часа, 48 часов, 24 часа, 12 часов, 6 часов, 2 часа, 1 час, 10 минут), одновременно или после (например, через 72 часа, 48 часов, 24 часа, 12 часов, 6 часов, 2 часа, 1 час, 10 минут) 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.

**[00125]** 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, STING-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. Engl. J. Med. 336, 86-91 (1997)). Другим адъювантом является CpG (Bioworld Today, Nov. 15, 1998). Другими примерами адъювантов являются липосомы, содержащие иммуностимуляторы, такие как MPL и QS21, такие как AS01E и AS01B (например, US 2011/0206758). Другими примерами адъювантов являются CpG (Bioworld Today, 15 ноября 1998 г.) и имидазохинолины (такие как имиквимод и R848). См., например, Reed G, et al., 2013, *Nature Med*, 19: 1597-1608. В некоторых воплощениях адъювант содержит агонист толл-подобного рецептора 4 (TLR4). Агонисты TLR4 хорошо известны в данной области техники, см., например, Ireton GC and SG Reed, 2013, Expert Rev Vaccines 12: 793-807. В некоторых воплощениях адъювант содержит агонист TLR4, содержащий липид A или его аналог или производное, такие как MPL, 3D-MPL, RC529 (например, EP1385541), PET-липид A, GLA (адъювант гликопиранозил 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)-PHAD (3D(6A)-PHAD) (PHAD, 3D-PHAD и 3D(6A)PHAD являются синтетическими вариантами липида А, см., например, avantilipids.com/divisions/adjuvants, где также приведены структуры этих молекул), E6020 (номер CAS 287180-63-6), ONO4007, OM-174 и тому подобное.

**[00126]** В некоторых воплощениях композиции, описанные в данном документе не содержат адъювант и не вводятся в комбинации с адъювантом.

**[00127]** 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, внутрибрюшинного, ректального введения, внутривенного, интраназального, интратрахеального, внутримышечного, местного, трансдермального или интрадермального введения. В конкретном воплощении предложенная композиция (например, фармацевтическая и/или иммуногенная) составлена для внутримышечной инъекции.

**[00128]** **<u>Способы применения</u>**

**[00129]** 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).

**[00130]** 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 О-антигенами *E. coli* или их гликоконъюгатами или биоконъюгатами.

**[00131]** 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.

**[00132]** 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.

**[00133]** Антитела, индуцированные биоконъюгатами и композициями, описанными в данном документе, могут включать молекулы иммуноглобулина и иммунологически активные части молекул иммуноглобулина, то есть молекулы, которые содержат антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается с полисахаридным О-антигеном *E. coli*, например, гликозилированным полисахаридным антигеном O4.

**[00134]** 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 A 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.

**[00135]** 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.

**[00136]** 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.

**[00137]** 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.

**[00138]** 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).

**[00139]** 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.).

**[00140]** Способность биоконъюгатов и композиций, описанных в данном документе, вызывать иммунный ответ у субъекта можно оценивать с применением любого подхода, известного специалистам в области техники или описанного в данном документе. В некоторых воплощениях способность биоконъюгата вызывать иммунный ответ у субъекта можно оценивать посредством иммунизации субъекта (например, мыши, крысы, кролика или обезьяны) или ряда субъектов биоконъюгатом, описанным в данном документе, а также иммунизации дополнительного субъекта (например, мыши, крысы, кролика или обезьяны) или ряда субъектов контролем (PBS). Субъекта или ряд субъектов можно впоследствии инфицировать ExPEC и определять способность ExPEC вызывать заболевание (например, ИМП, бактериемию или другое заболевание) у субъекта или ряда субъектов. Специалистам в области техники понятно, что если субъект или ряд субъектов, иммунизированных контролем, страдают от заболевания после инфицирования ExPEC, а субъект или ряд субъектов, иммунизированных биоконъюгатом(ами) или его композицией, описанными в данном документе, страдают меньше или не страдают заболеванием, биоконъюгат способен вызывать у субъекта иммунный ответ. Способность биоконъюгата(ов) или его (их) композиции, описанных в данном документе, вызывать образование антисыворотки, перекрестно реагирующей с O-антигеном ExPEC, можно исследовать, например, при помощи иммунологического анализа, такого как ELISA (см., например, Van den Dobbelsteen et al, 2016, Vaccine 34: 4152-4160) или иммуноанализа на основе ECL (электрохемилюминесценции).

**[00141]** Например, способность биоконъюгатов, описанных в данном документе, вызывать иммунный ответ у субъекта можно оценивать с применением сывороточного бактерицидного теста (SBA) или опсонофагоцитарного теста (OPK или OPKA), 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 OPK для биоконъюгированных вакцин против *E. coli* приведен, например, Abbanat et al, 2017, Clin. Vaccine Immunol. 24: e00123-17. Анализ OPK можно проводить в моноплексном или мультиплексном формате, из которых обычно предпочтительнее мультиплексный формат (например, тестирование нескольких серотипов одновременно). Мультиплексный анализ OPK в данном документе иногда обозначают «MOPA».

**[00142]** 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 опсонофагоцитарной активностью.

**[00143]** 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.

**[00144]**

**[00145]** 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.

**[00146]** **<u>Клетки-хозяева</u>**

**[00147]** 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.

**[00148]** Для получения полисахаридных O-антигенов *E. coli*, описанных в данном документе (например, гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*) и биоконъюгатов, содержащих полисахаридные O-антигены *E. coli,* описанных в данном документе (например, биоконъюгата гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*) могут применяться любые клетки-хозяева, известные специалистам в данной области, включая архебактерии, прокариотические клетки-хозяева и эукариотические клетки-хозяева. В предпочтительном воплощени клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку-хозяина. Примеры прокариотических клеток-хозяев для применения в продукции полисахаридных O-антигенов *E. coli,* описанных в данном документе, и биоконъюгатов, содержащих описанные здесь полисахаридные O-антигены *E. coli*, включают виды *Escherichia*, виды *Shigella,* виды *Klebsiella,* виды *Xhantomonas,* виды *Salmonella,* виды *Yersinia,* виды *Lactococcus,* виды *Lactobacillus,* виды *Pseudomonas,* виды *Corynebacterium,* виды *Streptomyces,* виды *Streptococcus,* виды *Staphylococcus,* виды *Bacillus* и виды *Clostridium,* но не ограничиваются ими.

**[00149]** В конкретном воплощении клетка-хозяин, используемая для продуцирования полисахаридных O-антигенов *E. coli,* описанных в данном документе, и биоконъюгатов, содержащих описанные здесь полисахаридные O-антигены *E. coli,* является прокариотической клеткой-хозяином и предпочтительно представляет собой *E. coli.*

**[00150]** В некоторых воплощениях клетки-хозяева, используемые для получения полисахаридных O-антигенов *E. coli* и биоконъюгатов, описанных в настоящем документе, сконструированы таким образом, чтобы они содержали гетерологичные нуклеиновые кислоты, например, гетерологичные нуклеиновые кислоты, содержащие генные кластеры *rfb* желаемого серотипа O-антигена, гетерологичные нуклеиновые кислоты, которые кодируют один или несколько белков-носителей и/или гликозилтрансфераз. В конкретном воплощении в клетки-хозяева, описанные в данном документе, могут быть введены гетерологичные гены *rfb* 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.

**[00151]** 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.

**[00152]** В настоящем документе предложены клетки-хозяева (например, рекомбинантные клетки-хозяева) для продуцирования биоконъюгата гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, полисахаридного антигена O1A, полисахаридного антигена O2, полисахаридного антигена O6A, полисахаридного антигена O8, полисахаридного антигена O15, полисахаридного антигена O16, полисахаридного антигена O18A, полисахаридного антигена O25B или полисахаридного антигена O75. Предложенные клетки-хозяева 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 плазмидах или интегрирован в геном клетки-хозяина (см., например, опубликованные международные заявки на патент WO 2014/037585, WO 2014/057109, WO 2015/052344).

**[00153]** В одном воплощении предложена клетка-хозяин (например, рекомбинантная клетка-хозяин) способная продуцировать биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli*, ковалентно связанного с белком-носителем. Такая клетка-хозяин содержит, предпочтительно в результате инженерии клетки-предшественника, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ген *gtrS*, который, насколько известно авторам изобретения, впервые идентифицирован ими как кодирующий фермент, обеспечивающий ветвление полисахаридов, способный переносить глюкозу на антиген O4 *E. coli* (т.е. глюкозилтрансферазу, специфичную к полисахаридному антигену O4 *E. coli*), и, в частности, к L-Rha посредством α-1,3-гликозидной связи. Пример аминокислотной последовательности такого фермента, обеспечивающего ветвление, представлен в SEQ ID NO: 4. Другие примеры содержат аминокислотные последовательности, которые идентичны ей по меньшей мере на 80%. Приведенные в качестве иллюстрации примеры нуклеиновых кислот, кодирующих гены *gtrS*, специфичные к полисахаридному антигену O4 *E. coli*, включают SEQ ID NO: 5 или вырожденные по отношению к ней последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют SEQ ID NO: 4, или последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют функциональные специфичные к O4 ферменты GtrS, которые по меньшей мере на 80% идентичны SEQ ID NO: 4, но не ограничиваются ими.

**[00154]** В конкретном воплощении клетка-хозяин (например, рекомбинантная клетка-хозяин), способная продуцировать биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена O4 *E.coli*, ковалентно связанный с белком-носителем, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую глюкозилтрансферазу, идентичную по меньшей мере на 80% SEQ ID NO: 4, например, приблизительно на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 4. Принимая во внимание избыточность генетического кода, специалист в данной области может создать варианты нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотные последовательности глюкозилтрансфераз, например, используя последовательности с оптимизированными кодонами, при желании.

**[00155]** 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, связаную 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 транлоказ глюкозы, связанной с бактопренолом и бактопренол-глюкозилтрансфераз, например, используя последовательности с оптимизированными кодонами, при желании.

**[00156]** 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 *rfb* для полисахаридного антигена O4 *E. coli*. Пример генного кластера генов *rfb*, 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%.

**[00157]** 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 *rfb* 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 *rfb* и/или нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-носитель, или содержали некоторые или все соответствующие гены, такие как *gtrS*, кластер *rfb* 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.

**[00158]** 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 *rfb*. В некоторых воплощениях некоторые или все из вышеуказанных ферментов являются гетерологичными для клетки-хозяина.

**[00159]** В доугих 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 *rfb* 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 *rfb*, 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 *rfb* 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 *rfb*, и если применимо, желаемой кодирующей последовательностью *gtrS*, соответственно. В некоторых воплощениях клетка-хозяин представляет собой *E. coli* K-12 (в качестве неограничивающего примера, штаммом K-12 является штамм *E. coli* W3110), или штамм B *E. coli* (в качестве неограничивающего примера, штаммом B является штамм *E. coli* BL21), или любой другой четко определенный штамм *E. coli*, например, лабораторные штаммы или производственные штаммы, в отличие от первичных изолятов дикого типа. В предпочтительных воплощениях клетка-хозяин получена от *E. coli*, которая не экспрессирует антиген O4 или гликозилированный антиген O4, путем введения в такую E.coli локуса *rfb* O4 и гена *gtrS*, кодирующего глюкозилтрансферазу, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO: 4. Преимуществами использования хорошо охарактеризованных штаммов, таких как *E. coli* K-12 или *E. coli* B, в качестве предшественников для клеток-хозяев является возможность использовать аналогичный процесс производства для различных биоконъюгатов O-антигена, поскольку характеристики штамма-продуцента четко определены. Несмотря на то, что биоконъюгаты разных O-антигенов будут вести себя по-разному и процессы экспрессии могут быть оптимизированы для каждого производственного штамма, по крайней мере, основной процесс получения биоконъюгатов O-антигена с использованием таких четко определенных штаммов-предшественников будет более предсказуемым, чем когда в качестве предшественников для получения штаммов-хозяев используются неизвестные штаммы, такие как изоляты дикого типа. Таким образом, опыт получения ранее описанных биоконъюгатов O-антигена *E. coli*, таких как биоконъюгаты O1A, O2, O6A и O25B, как описано, например, в WO 2015/124769 и WO 2017/035181, может быть использован в качестве основы для разработки производства других биоконъюгатов O-антигена *E. coli*. В отличие от *gtrS*, гены *gtrA* и *gtrB* не являются серотип-специфичными, и в некоторых воплощениях они гомологичны клетке-хозяину (например, штамм *E.coli* K12 W3110 включает гены *gtrA* и *gtrB,* которые способны функционировать вместе со специфическим для серотипа O4 рекомбинантно введенным геном *gtrS*, кодирующим глюкозилтрансферазу SEQ ID NO: 4 или глюкозилтрансферазу, которая идентична ему по меньшей мере на 80%, заменяющим эндогенный ген *gtrS*). В других воплощениях один или оба гена *gtrA* и *gtrB* (кодирующие белки GtrA и GtrB, которые по меньшей мере примерно на 80% идентичны SEQ ID NO: 7 и 8, соответственно, и обладают активностью транслоказы бактопренол-связанной глюкозы и бактопренол-глюкозилтрансферазы соответственно, также рекомбинантно вводятся в клетку-хозяин, например, в случае, если клетка-хозяин не имеет эндогенных генов *gtrA* и/или *gtrB*.

**[00160]** В данном документе также предложены клетки-хозяева (например, рекомбинантные клетки-хозяева) способные продуцировать биоконъюгат полисахаридного антигена O1A, O2, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B или O75 *E.coli,* ковалентно связанного с белком-носителем. Такие клетки-хозяева (например, рекомбинантные клетки-хозяева) содержат нуклеотидную последовательность генного кластера *rfb*, специфичного для полисахаридного O-антигена. Генные кластеры *rfb* можно выделить из штаммов *E.coli* дикого типа и объединить с нуклеиновыми кислотами, кодирующими олигосахарилтрансферазу (например, PglB) и белок-носитель (например, EPA) в одной клетке-хозяине, чтобы получить рекомбинантную клетку-хозяина, которая продуцирует представляющий интерес O-антиген *E. coli* или его биоконъюгат. Например, такие клетки-хозяева могут быть сконструированы с использованием рекомбинантных подходов, чтобы они содержали одну или несколько плазмид, содержащих генный кластер *rfb*, 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 *rfb*, 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.

**[00161]** Получение биоконъюгатов для антигенов O1A, O2, O6A и O25B подробно описано в WO 2015/124769 и WO 2017/035181. Примеры генных кластеров для каждого

О-антигена *E. coli* (локусы *rfb*) описаны Iguchi A, et al, DNA Research, 2014, 1-7 (doi: 10.1093/dnares/dsu043) и DebRoy C, et al, PLoS One. 2016, 11(1):e0147434 (doi: 10.1371/journal.pone.0147434; исправления в: Plos One. 2016, 11(4):e0154551, doi: 10.1371/journal.pone.0154551). Последовательности нуклеиновых кислот для кластеров *rfb* и аминокислотные последовательности для белков, кодируемых в них, также можно найти в общедоступных базах данных, таких как GenBank. Примеры последовательности кластеров *rfb*, которые можно использовать в штаммах-продуцентах для биоконъюгатов с полисахаридными антигенами серотипов, раскрытых в данном документе, также представлены в SEQ ID NO: 9 и 11-19. Таким образом, для каждого из желаемых биоконъюгатов, упомянутых выше, соответствующий кластер *rfb* может быть введен в клетку-хозяина, чтобы получить клетки-хозяева содержащие специфический кластер *rfb* 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 *rfb* гетерологичны клетке-хозяину, например, введены в клетку-предшественницу клетки-хозяина и предпочтительно интегрированы в ее геном. Предпочтительно исходный генный кластер *rfb*, если таковой присутствовал в клетке-предшественнике, заменен в клетке-хозяине кластером генов *rfb* 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.

**[00162]** 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.

**[00163]** 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.

**[00164]** В некоторых воплощениях в качестве альтернативы олигосахарилтрансферазе с *N*-гликозилтрансферазной активностью, такой как О-гликозилтрансфераза, в качестве неограничивающего примера можно использовать, например, PglL в сочетании с ее собственной, иной консенсусной последовательностью гликозилирования в белке-носителе, как, например, описано в WO 2016/82597. Таким образом, согласно изобретению, в качестве олигосахарилтрансферазы также можно использовать другие гликозилтрансферазы, такие как О-гликозилтрансферазы.

**[00165]** В некоторых предпочтительных воплощениях олигосахарилтрансфераза представляет собой олигосахарилтрансферазу из *Campylobacter*. Например, в одном воплощении олигосахарилтрансфераза представляет собой олигосахарилтрансферазу из *Campylobacter jejuni* (т.е., *pglB*; см. например, Wacker et al., 2002, *Science* 298:1790-1793; см. также, например, NCBI Gene ID: 3231775, номер доступа Uniprot O86154). В другом воплощении олигосахарилтрансфераза представляет собой олигосахарилтрансферазу из *Campylobacter lari* (см., например, NCBI Gene ID: 7410986).

**[00166]** 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 преложены способы получения биоконъюгатов специфических О-антигенов *E. coli* с использованием в качестве олигосахарилтрансферазы специфических вариантов PglB. Дополнительные варианты PglB, которые по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичны SEQ ID NO: 6 и все еще обладают олигосахарилтрансферазной активностью, предпочтительно имея в комбинации одну или несколько конкретных аминокислот в указанных положениях, изложенных в данном документе (например, 77Y, 80S, 287Q, 289K, 311N, 482K, 483D, 669A; или 311V; или 311V, 482R, 483H, 669V; или 77H, 80R, 287P, 289R, 311V; или 77H, 311V; и т. д.) также можно использовать для производства биоконъюгатов.

**[00167]** 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.

**[00168]** 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.

**[00169]** 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.

**[00170]** 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.

**[00171]** 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.

**[00172]** 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 техникис учетом данного изобретения, включая обезвреженный экзотоксин А *P. aeruginosa* (EPA), флагеллин *E. coli* (FliC), CRM197, мальтозосвязывающий белок (MBP), дифтерийный анатоксин, столбнячный анатоксин, обезвреженный гемолизин А *S. aureus*, агглютинирующий фактор А, агглютинирующий фактор В, термолабильный энтеротоксин *E. coli*, обезвреженные варианты термолабильного энтеротоксина *E. coli*, субъединицу В холерного токсина (CTB), холерный токсин, обезвреженные варианты холерного токсина, белок Sat *E. coli*, домен-«пассажир» белка Sat *E. coli*, пневмолизин *Streptococcus pneumoniae*, гемоцианин *Megathura crenulata* (KLH), PcrV *P. aeruginosa*, белок внешней мембраны *Neisseria meningitidis* (OMPC) и белок D из нетипируемого *Haemophilus influenzae*, но не ограничиваясь перечисленным.

**[00173]** В предпочтительных воплощениях клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую обезвреженный экзотоксин А *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.

**[00174]** В некоторых воплощениях белки-носители, используемые при создании биоконъюгатов клетками-хозяевами, описанными в настоящем документе, содержат «метку», то есть последовательность аминокислот, которая позволяет выделять и/или идентифицировать белок-носитель. Например, добавление метки к белку-носителю может быть полезно для очистки этого белка и, следовательно, очистки конъюгированных вакцин, содержащих меченый белок-носитель. Примеры меток, которые могут быть использованы в данном документе, включают, без ограничения, гистидиновые (HIS) метки (например, гексагистидиновые метки или 6XHis-Tag), метки FLAG-TAG и HA (гемагглютининовые). В некоторых воплощениях используемые здесь метки являются удаляемыми, например, удаляются химическими агентами или ферментативными способами, когда они больше не нужны, например, после очистки белка. В других воплощениях белок-носитель не содержит метку.

**[00175]** 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 carotovorans* (PelB), FlgI, NikA или эндоксиланазы (XynA) *Bacillus sp.*, термолабильного энтеротоксина LTIIb *E. coli*, эндоксиланазы 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.

**[00176]** 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.

**[00177]** Примеры генов или генных кластеров, которые могут быть подвергнуты делеции в клетках-хозяевах (и, в некоторых случаях, заменены другими желательными последовательностями нуклеиновых кислот), включают гены или генные кластеры клеток-хозяев, участвующих в биосинтезе гликолипидов, такие как *waaL* (см., например, Feldman et al. al., 2005, *PNAS USA* 102: 3016-3021), кластер биосинтеза ядра липида A (*waa*), кластер галактозы (*gal*), кластер арабинозы (*ara*), кластер колановой кислоты (wc), кластер капсульного полисахарида, гены биосинтеза ундекапренола-p (например, *uppS*, *uppP*), гены рециркуляции und-P, метаболические ферменты, участвующие в биосинтезе сахаров, активированных нуклеотидами, общий кластер антигенов энтеробактерий (*eca*) и кластеры модификации О-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 О-антигена, кроме желаемого полисахаридного О-антигена, например, гликозилированного полисахаридного антигена О4.

**[00178]** 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 О-антиген-лигазы, кодирующему связанный с мембраной фермент с активным сайтом, расположенным в периплазме. Кодируемый фермент переносит О-антиген, связанный с ундекапренилфосфатом (UPP), в ядро липида А, образуя липополисахарид. Делеция или разрушение эндогенного гена *waaL* (например, у штаммов Δ*waaL*) нарушает перенос О-антигена на липид А и вместо этого может усиливать перенос О-антигена на другую биомолекулу, такую как белок-носитель.

**[00179]** 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 *rfb*.

**[00180]** В одном воплощении используемая клетка-хозяин представляет собой *E. coli*, которая продуцирует биоконъюгат гликозилированного полисахаридного антигена О4, при этом в геноме клетки-хозяина осуществлена делеция или функциональная инактивация гена *waaL* и вставка гена *gtrS*, специфичного для полисахаридного антигена О4 *E. coli*. В некоторых воплощениях для штаммов-продуцентов биоконъюгатов гликозилированного О-антигена О4 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 О4. 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 О-антигена.

**[00181]** В данном документе также предложены способы создания рекомбинантных клеток-хозяев. Рекомбинантные клетки-хозяева, полученные способами, описанными в данном документе, могут применяться для получения биоконъюгатов О-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.

**[00182]** 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 *rfb* 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 *rfb* для полисахаридного антигена O4 *E. coli* замещает эндогенный кластер генов *rfb* 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 гликозилтрансферазу (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.

**[00183]** В конкретном воплощении глюкозилтрансфераза (gtrS, специфичная для добавления глюкозной ветви к антигену O4) имеет SEQ ID NO: 4.

**[00184]** 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.

**[00185]** 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.

**[00186]** 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, DH5α, DH10 и т.д.), B штаммы (например, BL-21, REL606 и т.д.), C 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, Ecoliwiki.net.

**[00187]** **<u>Способы получения конъюгатов и биоконъюгатов</u>**

**[00188]** 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.

**[00189]** 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.

**[00190]** В некоторых воплощениях клетки-хозяева, описанные в данном документе, могут применяться для получения биоконъюгатов, содержащих полисахаридный O-антиген *E. coli,* ковалентно связанный с белком-носителем. Способы получения таких биоконъюгатов известны в области техники. См., например, WO 2003/074687 и WO 2006/119987. Такие способы включают культивирование любой рекомбинантной клетки-хозяина, описанной в данном документе, в условиях для продуцирования биоконъюгата. Биоконъюгаты могут быть выделены, отделены и/или очищены из рекомбинантных клеток-хозяев с использованием любого способа, известного в данной области с учетом настоящего раскрытия. Например, биоконъюгаты могут быть очищены любым способом очистки белка, известным в области техники, например, посредством хроматографии (например, ионообменной, анионообменной, аффинной и колоночной хроматографии с разделением по размерам), центрифугирования, по различиям в растворимости или любым другим стандартным способом очистки белков. См., например, способы, описанные в WO 2009/104074. Кроме того, для облегчения очистки биоконъюгаты могут быть слиты с последовательностями гетерологичных полипептидов. Фактические условия, используемые для очистки конкретного биоконъюгата, будут частично зависеть от таких факторов, как суммарный заряд, гидрофобность и/или гидрофильность биоконъюгата, и будут очевидны специалистам в области техники. Получение биоконъюгатов для O1A, O2, O6A и O25B, а также содержащих их вакцинных композиций, например, было описано в WO 2015/124769 и WO 2017/035181.

**[00191]** Также представлены биоконъюгаты, полученные описанными здесь способами, то есть с использованием рекомбинантных клеток-хозяев, описанных в данном документе.

**[00192]** В некоторых воплощениях способ получения биоконъюгата полисахаридного O-антигена *E. coli*, ковалентно связанного с белком-носителем, включает: (1) получение рекомбинантной клетки-хозяина, содержащей (а) нуклеотидную последовательность генного кластера *rfb* для полисахаридного O-антигена; (б) нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-носитель, предпочтительно EPA, содержащий по меньшей мере один сайт гликозилирования, содержащий консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 1, предпочтительно SEQ ID NO: 2, и более предпочтительно содержащий четыре сайта гликозилирования, каждый из которых содержит консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 2; и (в) нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу, например, олигосахарилтрансферазу PglB или ее вариант.

**[00193]** В некоторых воплощениях полисахаридные O-антигены *E. coli*, полученные с использованием рекомбинантных клеток-хозяев, описанных в данном документе, ковалентно связаны с белком-носителем при определенном массовом соотношении полисахарида к белку (масс./масс.). Это массовое соотношение количества полисахаридного O-антигена, ковалентно связанного с белком-носителем, называется «соотношением гликан/белок», или «соотношением полисахарид/белок», или «соотношением PS/белок». В некоторых воплощениях полисахаридный O-антиген ковалентно связан с белком-носителем при соотношении полисахарида и белка (масс./масс.) 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.

**[00194]** 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 Таблицы 1 и GlcNAc для других гликанов из Таблицы 1), после чего структурная информация о повторяющейся единице может использоваться для расчета общего количества гликанов (например, повторяющаяся единица O1 A 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).

**[00195]** В некоторых воплощениях биоконъюгат полисахаридного антигена O25B *E. coli*, ковалентно связанный с белком-носителем, полученным с использованием рекомбинантной клетки-хозяина в соответствии с клетками и способами, описанными в настоящем документе, имеет определенную степень ацетилирования в положении 2 сахара L-Rh. Степень О-ацетилирования полисахаридного антигена O25B в биоконъюгате составляет предпочтительно, по меньшей мере 30%, предпочтительно по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100%.

**[00196]** Аналогично, степень О-ацетилирования полисахаридного антигена O16 *E. coli* в биоконъюгате составляет предпочтительно, по меньшей мере 30%, предпочтительно по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100%.

**[00197]** В конкретных воплощениях способ получения биоконъюгата полисахаридного О-антигена включает получение рекомбинантной клетки-хозяина, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую конкретный фермент олигосахарилтрансферазу, в частности олигосахарилтрансферазу PglB или ее вариант, в зависимости от биоконъюгата полисахаридного О-антигена, который требуется получить. Конкретный вариант фермента олигосахарилтрансферазы может влиять на выход биоконъюгата, продуцируемого клеткой-хозяином. Обычно более высокий выход является предпочтительным, поскольку выход будет влиять на затраты на получение конкретного биоконъюгата, что особенно важно для поливалентных композиций, содержащих несколько различных биоконъюгатов. В некоторых воплощениях способ дополнительно включает выделение биоконъюгата из рекомбинантной клетки-хозяина.

**[00198]** В одном конкретном воплощении, когда О-антиген представляет собой полисахаридный антиген O1A, O6A или O15, олигосахарилтрансфераза PglB содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V, где аминокислотные мутации относятся к PglB дикого типа, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

**[00199]** В другом конкретном воплощении, когда О-антиген представляет собой полисахаридный антиген O4, олигосахарилтрансфераза PglB содержит аминокислотную мутацию N311V или аминокислотные мутации Y77H и N311V, где аминокислотные мутации относятся к PglB дикого типа, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

**[00200]** В другом конкретном воплощении, когда О-антиген представляет собой полисахаридный антиген O16, олигосахарилтрансфераза PglB содержит аминокислотные мутации Y77H, S80R, Q287P, K289R и N311V, где аминокислотные мутации относятся к PglB дикого типа, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

**[00201]** В другом конкретном воплощении, когда О-антиген представляет собой полисахаридный антиген O75, олигосахарилтрансфераза PglB содержит аминокислотную мутацию N311V, где аминокислотные мутации относятся к PglB дикого типа, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

**[00202]** В другом конкретном воплощении, когда О-антиген представляет собой полисахаридный антиген O8, O18A, O25B или O2, олигосахарилтрансфераза PglB содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, где SEQ ID NO: 6 не содержит аминокислотные мутации в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669. В некоторых воплощениях олигосахарилтрансфераза PglB содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

**[00203]** 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*.

**[00204]** 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 кетка-хозяин содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-носитель EPA-4, содержащий SEQ ID NO: 3.

**[00205]** В некоторых воплощениях рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой клетку *E. coli*, например, штамм *E. coli* K-12, такой как штамм W3110.

**[00206]** Также предложены биоконъюгаты полисахаридных О-антигенов, полученные с применением рекомбинантных клеток-хозяев, кодирующих ферменты олигосахарилтрансферазы из пар О-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.

**[00207]** В некоторых воплощениях биоконъюгаты полисахаридных О-антигенов, продуцируемые рекомбинантными клетками-хозяевами, кодирующими ферменты олигосахарилтрансферазы из пар О-антиген/олигосахарилтрансфераза PglB, указанных выше, предпочтительно имеют одну или несколько предпочтительных характеристик, описанных в данном документе, например, соотношение гликан/белок и/или количество или соотношение мультигликозилированного белка-носителя.

ВОПЛОЩЕНИЯ

**[00208]** 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 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 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 Таблице 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.

**[00209]** 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.

**[00210]** 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.

**[00211]** 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.

**[00212]** 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.

**[00213]** 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.

**[00214]** 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.

**[00215]** 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.

**[00216]** 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.

**[00217]** 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.

**[00218]** 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: (a) 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) 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 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, 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 гликзилировать 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 Таблице 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.

**[00219]** Воплощение 12 представляет собой способ по воплощению 11, дополнительно включающий выделение биоконъюгата из рекомбинантной клетки-хозяина.

**[00220]** 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*.

**[00221]** Воплощение 14 представляет собой способ по воплощению 13, где белок-носитель представляет собой обезвреженный экзотоксин A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA).

**[00222]** Воплощение 15 представляет собой способ по воплощению 14, где белок-носитель EPA содержит 1-10, предпочтительно 2-4, более предпочтительно 4 сайта гликозилирования.

**[00223]** Воплощение 16 представляет собой способ по воплощению 15, где каждый сайт гликозилирования содержит консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 2.

**[00224]** Воплощение 17 представляет собой способ по воплощению 16, где белок-носитель EPA содержит SEQ ID NO: 3.

**[00225]** 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.

**[00226]** Воплощение 19 представляет собой биоконъюгат, полученный способом по любому из воплощений 1-18.

**[00227]** Воплощение 20 представляет собой композицию, содержащую биоконъюгат по воплощению 19.

**[00228]** 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.

**[00229]** 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 Таблице 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.

**[00230]** 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 Таблице 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.

**[00231]** 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 Таблице 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.

**[00232]** 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 Таблице 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.

**[00233]** 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 Таблице 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.

**[00234]** Воплощение 27 представляет собой композицию по любому из воплощений 20-26, где композиция представляет собой иммуногенную композицию.

**[00235]** 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.

**[00236]** 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).

**[00237]** 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 *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 $PglB_y$, 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 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 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 Таблице 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.

**[00238]** 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.

**[00239]** 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.

**[00240]** 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.

**[00241]** 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.

**[00242]** 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.

**[00243]** 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.

**[00244]** 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.

**[00245]** 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.

**[00246]** 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.

**[00247]** 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* (OMPC) и белка D из нетипируемого *Haemophilus influenzae.*

**[00248]** Воплощение 41 представляет собой рекомбинантную клетку-хозяина по любому из воплощений 30-40, где белок-носитель представляет собой обезвреженный экзотоксин A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA).

**[00249]** 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.

**[00250]** Воплощение 43 представляет собой рекомбинантную клетку-хозяина по воплощению 42, где каждый сайт гликозилирования содержит консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 2.

**[00251]** Воплощение 44 представляет собой рекомбинантную клетку-хозяина по воплощению 43, где белок-носитель EPA содержит SEQ ID NO: 3.

**[00252]** 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.

**[00253]** Воплощение 46 представляет собой биоконъюгат по воплощению 19, который представляет собой биоконъюгат гликозилированного полисахарида O4 антигена *E.coli,* ковалентно связанного с белком-носителем.

**[00254]** Воплощение 47 представляет собой биоконъюгат по воплощению 46, где белок-носитель представляет собой белок-носитель EPA, содержащий SEQ ID NO: 3.

**[00255]** Воплощение 48 представляет собой биоконъюгат по воплощению 46 или 47, где гликозилированный полисахаридный антиген O4 имеет структуры Формулы (O4-Glc+), показанные в Таблице 1, а n представляет собой целое число от 5 до 40.

**[00256]** Воплощение 49 представляет собой композицию, содержащую биоконъюгат по любому из воплощений 46-48.

**[00257]** 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.

**[00258]** 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 Таблице 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.

**[00259]** Воплощение 52 представляет собой композицию по воплощению 51, содержащую конъюгаты *E.coli* серотипов: O1A, O2, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75.

**[00260]** Воплощение 53 представляет собой композицию по воплощению 52, где каждый конъюгат представляет собой биоконъюгат.

## ОПИСАНИЕ ПРИМЕРОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[00261]** 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*

**[00262]** 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. Таблицу 2.

**[00263]** Изоляты из образцов крови человека проанализировали для определения патогенов в них и их паттернов устойчивости к антибиотикам. Изоляты *E. coli* были получали 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 О-антигена (DebRoy et al. (2011) Animal health research reviews/Conference of Research Workers in Animal Diseases 12, 169-185). Изоляты, не типируемые методом агглютинации, дополнительно анализировали путем полногеномного секвенирования с последующим генотипированием О-антигена на основе последовательностей генов *wzy* и *wzx*, специфичных для серотипов О-антигена.

**[00264]** **Таблица 2.** Распределение наиболее распространенных О-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 О-серотипирования посредством агглютинации и О-генотипирование изолятов, не типируемых агглютинацией. Субъекты были госпитализированы в следующих странах: США, Канада, Аргентина, Бразилия, Великобритания, Германия, Испания, Италия, Нидерланды, Франция, Япония, Таиланд, Южная Корея и Австралия.

| **О-Серотип** | **Распространение n (%)** |
|---|---|
| O25 | 737 (22,9%) |
| O2 | 268 (8,3%) |
| O6 | 261 (8,1%) |
| O1 | 255 (7,9%) |
| O75 | 145 (4,5%) |
| O15 | 110 (3,4%) |
| O8 | 104 (3,2%) |
| O16 | 103 (3,2%) |
| O4 | 96 (3,0%) |
| O18 | 91 (2,8%) |

**[00265]** Стратификация по географическому местоположению ассоциированной с бактериемией *E. coli* в мировом масштабе показала преобладание 10 основных О-серотипов независимо от местоположения, что позволяет предположить, что они являются преобладающими в мире О-серотипами, связанными с вызывающей бактериемию *E. coli*.

**[00266]** В мировом масштабе распространенность 10 основных О-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%.

**[00267]** По совокупности данных эпидемиологического анализа, преобладающие 10 О-серотипов могут охватывать 60-80% бактериальных инфекций, ассоциированных с *E. coli,* с учетом охвата части нетипируемых штаммов.

**[00268]** Поливалентная вакцина, охватывающая значительную часть серотипов *E. coli,* вызывающих бактериемию, была бы очень полезной. Таким образом, О-серотипы из Таблицы 2 могут быть хорошими кандидатами для поливалентной вакцины на основе О-антигена. Такую вакцину можно с успехом изготовить с использованием технологии биоконъюгации.

**[00269]** Одним из серотипов среди 10 основных (Таблица 2) является О4. Таким образом, было бы полезно получить биоконъюгатную вакцину, которая включает полисахаридный О-антиген *E.coli* серотипа О4, связанный с белком-носителем.

**<u>Пример 2.</u> Характеризация современных клинических изолятов О4 по генам, кодирующим ферменты, модифицирующие О-антиген**

**[00270]** Описаны два варианта полисахаридного антигена О4 *E. coli* (см., например, Jann B, et al., 1993, Carbohydr. Res. 248: 241-250), один из которых имеет неразветвленную структуру (структура показана в Таблице 1 как (O4-Glc-)), а другой вариант замещен дополнительной боковой ветвью глюкозы (структура показана в Таблице 1 как (O4-Glc+)). Доля этих двух вариантов, встречающихся среди современных клинических изолятах, была неизвестна. Хотя оба варианта реагируют с антисывороткой О4, 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 *rfb* О4.

**[00271]** Набор из 32 подтвержденных методом агглютинации клинических изолятов *E. coli* О4, исходно выделенных в период 2011-2012 гг. от субъектов в Соединенных Штатах и Европейском Союзе, проанализировали методом полногеномного секвенирования. Выделенные последовательности генного кластера *rfb* 32 отсеквенированных изолятов О4 выравнивали с последовательностями эталонного штамма и сравнивали на уровне нуклеотидов. За исключением некоторых встречающихся в природе однонуклеотидных полиморфизмов, все охарактеризованные изоляты имели кластер *rfb*, 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 *rfb*. 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 *rfb* *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*.

**[00272]** Затем данные полногеномного секвенирования анализировали на наличие генов вне кластера генов *rfb*, которые могут кодировать ферменты, модифицирующие O-антиген. Гомологи *gtrAB* у *Shigella flexneri* впервые были идентифицированы у *E. coli* O4. Открытая рамка считывания по ходу транскрипции от *gtrAB* в *E. coli* была предположительно идентифицирована как специфичный для *E. coli* O4 ген *gtrS*, который может кодировать предполагаемый обеспечивающий ветвление фермент GtrS, специфический для *E. coli* O4, ответственный за добавление глюкозной ветви к антигену O4 *E. coli*.

**[00273]** 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.

**[00274]** Было обнаружено, что из охарактеризованных изолятов *E. coli* O4 примерно 80% несут идентифицированный здесь ген *gtrS* (26 из 32). Распространенность последовательности *gtrS*, специфичной для *E. coli* O4, также определяли с помощью ПЦР с использованием специфичных для последовательности праймеров, в независимом наборе из 20 подтвержденных методом агглютинации клинических изолятов *E. coli* O4, выделенных в период 2014-2016 гг. от субъектов в Соединенных Штатах и Европейском Союзе. Этот анализ показал, что 17 из 20 изолятов несли последовательность *gtrS* O4, что соответствует распространенности 85%.

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

**[00275]** Чтобы проверить, могут ли быть получены биоконъюгаты, содержащие полисахаридный антиген O4, модифицированный ответвляющейся глюкозой, сконструировали штаммы *E. coli* с предполагаемым ферментом, обеспечивающим ветвление, продуцирующие биоконъюгат антигена O4 и EPA. Для этого эндогенный ген *gtrS* O16 заменяли предполагаемым геном *gtrS* O4 (SEQ ID NO: 5, см. Пример 2), а кластер *rfb* O16 в штамме *E. coli* W3110 Δ*wzzE-wecG* Δ*waaL* Δ*wbbI-J-K* заменяли кластером *rfb* O4 путем гомологичной рекомбинации. В альтернативном варианте в некоторых штаммах кластер *rfb* O4 кодировался плазмидой.

**[00276]** Затем в эти штаммы вводили плазмиды, кодирующие белок-носитель обезвреженный экзотоксин А *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) (вариант, имеющий 2 или 4 консенсусных сайта гликозилирования, обозначаемый как «EPA-2» и «EPA-4», соответственно), и олигосахарилтрансферазу PglB. Биоконъюгаты O4-EPA, модифицированные Glc, получали путем культивирования штаммов-продуцентов *E. coli* в биореакторах и индукции экспрессии PglB и EPA с помощью IPTG (изопропил-β-D-тиогалактопиранозидом) и арабинозы, соответственно. Биоконъюгаты O4-EPA выделяли из периплазматического экстракта биомассы.

**[00277]** 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 1D, записанном при 313K, наблюдался интенсивный сигнал HOD и малоинтенсивные острые сигналы от пентасахаридных повторяющихся единиц (RU) O4 с пятью аномерными, двумя NAc и двумя H6 сигналами (Rha и FucNAc).

**[00278]** 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 $CH_2$. В эксперименте HSQC наблюдались кросс-пики для пентасахаридной RU O4 [5 аномерных, кольцевых, две N-ацетильных и две метильных (Rha и FucNAc)] группы, а также аминокислот EPA в характерных областях. Каждую из пар протон/углерод для O4 оказалось возможным найти на основании отнесений сигналов протонов и данных литературы.

**[00279]** 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 Таблице 1).

## <u>Пример 4.</u> Иммуногенность биоконъюгата O4 с ответвлением Glc у кроликов

**[00280]** Биоконъюгаты O4, модифицированного Glc (т.е. имеющие гликаны со структурой формулы (O4-Glc+), как показано в Таблице 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.

**[00281]** 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, содержали высокие титры IgG, специфически распознающих исследуемые изоляты O4 (Фиг. 2). В соответствии с ELISA на LPS, все протестированные изоляты O4 распознавались антисыворотками. У *gtrS*-положительных изолятов в целом наблюдалось более интенсивное связывание, чем у *gtrS*-отрицательных изолятов (Фиг. 2). В частности, следующие изоляты были *gtrS*-положительными: Y1382, E551, OC24334, stGVXN4983, stGVXN4994 и OC24794, а следующие изоляты были *gtrS*-отрицательными: A2625, stGVXN4988, OC24784, OC24787 и OC24788. Антисыворотки не связывались со штаммом *E. coli* OC9487 неродственного O-серотипа (ATCC 35383), служившим отрицательным контролем.

**[00282]** 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).

**[00283]** 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).

**[00284]** 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 Таблице 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**

**[00285]** 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.

**[00286]** 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. 4А). Антитела, индуцированные (O4-Glc+)-конъюгатом, были функциональными, то есть способны опосредовать уничтожение штамма (O4-Glc+) *E. coli* (Фиг. 4B).

**[00287]** 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).

**[00288]** 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 (OPKA) с использованием штаммов *E. coli* O4(Glu+) и O4(Glu-). Антитела, индуцированные биоконъюгатом (O4-Glc+)-EPA, были функциональными, т.е. способными 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 Таблице 1, т.е. O4 без ответвления Glc) (Фиг. 6). 6).

**[00289]** В заключение, антитела, индуцированные биоконъюгатом O4-Glc+-EPA, обладают перекрестной реактивностью и способны опосредовать гибель штаммов *E. coli* O4 с ответвлением глюкозы и без него.

## <u>Пример 6</u> Штаммы-продуценты биоконъюгатов O-антигена *E. coli* и полученные продукты биоконъюгатов

**[00290]** Помимо биоконъюгатов (O4-Glc+)-EPA, полученных, как описано выше, были получены девять (9) других биоконъюгатов. В частности, дополнительно полученные биоконъюгаты включали биоконъюгат *E. coli* O1A-EPA, биоконъюгат O2-EPA, биоконъюгат O6A-EPA, биоконъюгат O8-EPA, биоконъюгат O15-EPA, биоконъюгат O16-EPA, биоконъюгат O18A-EPA, биоконъюгат O25B-EPA и биоконъюгат O75-EPA. Химические структуры гликанов этих конъюгатов можно увидеть в соответствующих формулах в Таблице 1. Композиция, содержащая 10 биоконъюгатов, в данном документе обозначается «ExPEC10V». Композиция, содержащая биоконъюгаты O1A-EPA, O2-EPA, O6A-EPA и O25B-EPA, в данном документе обозначается «ExPEC4V» (и ранее была описана, например, в WO 2015/124769 и WO 2017/035181).

**[00291]** <u>Родительский штамм *Escherichia coli* W3110</u>

**[00292]** Непатогенный штамм *E. coli* K12 W3110 использовали в качестве родительского штамма для создания всех десяти штаммов-продуцентов. Штамм *E. coli* K12 W3110 был получен из музея культур *E. coli* (Yale University, New Haven (CT), USA, номер продукта CGSC#4474). Соответствующий генотип был описан ранее (*E. coli* W3110, F-, lambda-, IN(rrnD-rrnE)1, rph-1), а его геномная последовательность была опубликована ранее (Hayashi K, et al., 2006, Mol. Syst. Biol. 2006.0007 (doi:10.1038/msb4100049). Штамм *E. coli* W3110 был генетически модифицирован для обеспечения продукции каждого из биоконъюгатов O-антигена *E. coli* (Таблица 3).

**[00293]** <u>Штаммы-продуценты биоконъюгатов</u>

**[00294]** Композиции «ExPEC4V» и «ExPEC10V» содержат биоконъюгаты O2-EPA и O25B-EPA из одних и тех же продуцирующих штаммов. Композиция «ExPEC4V» содержит биоконъюгат O1A-EPA из продуцирующих штаммов stGVXN4411 или stLMTB10217, тогда как композиция «ExPEC10V» содержит биоконъюгат O1A-EPA из продуцирующего штамма stLMTB10217. Композиция «ExPEC4V» содержит биоконъюгат O6A-EPA из продуцирующего штамма stGVXN4112, тогда как композиция «ExPEC10V» содержит биоконъюгат O6A-EPA из продуцирующего штамма stLMTB10923. Кроме того, композиция «ExPEC10V» содержит биоконъюгаты O4-EPA (т.е. (O4-Glc+)-EPA), O8-EPA, O15-EPA, O16-EPA, O18A-EPA и O75-EPA из продуцирующих штаммов, которые не используются для «ExPEC4V». Различные продуцирующие штаммы могут варьироваться в плазмидах для экспрессии белка-носителя EPA и/или олигосахарилтрансферазы PglB, как указано ниже. Обзор нескольких продуцирующих штаммов приведен в Таблице 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 *rfb* | *waaL* | *gtrABS* | *pglB* | *epa* |
| O1A (ExPEC4V) | stGVXN4411 | Δ*rfb*::O1A *rfb* upecGVXN_032 | Δ*waaL* | - | pGVXN970 | pGVXN1076 |
| O1A (ExPEC4V; ExPEC10V) | stLMTB10217 | Δ*rfb*::O1A *rfb* upecGVXN_032 | Δ*waaL* | - | pGVXN1221 | pGVXN1076 |
| O2 | stGVXN4906 | Δ*rfb*::O2 *rfb* upecGVXN_116 | Δ*waaL* | - | pGVXN971 | pGVXN1076 |
| O4 | BVEC-L-00684 | Δ*rfb*::O4 *rfb* CCUG11450 | Δ*waaL* | Δ*gtrS*::*gtrS* O4 | pGVXN1217 | pGVXN1076 |
| O6A (ExPEC4V) | stGVXN4112 | Δ*rfb*::O6A *rfb* CCUG11309 | Δ*waaL* | - | pGVXN114 | pGVXN659 |
| O6A (ExPEC10V) | stLMTB10923 | Δ*rfb*::O6A *rfb* CCUG11309 | Δ*waaL* | - | pGVXN1221 | pGVXN1076 |
| O8 | stLMTB11734 | Δ*rfb*::O8 *rfb* E2420 | Δ*waaL* | Δ*gtrABS* | pGVXN970 | pGVXN1076 |
| O15 | stLMTB11738 | Δ*rfb*::O15 *rfb* OC24891 | Δ*waaL* | Δ*gtrABS* | pGVXN1221 | pGVXN1076 |
| O16 | stLMTB11739 | Δ*rfb*::O16 *rfb* OC24208 | Δ*waaL* | Δ*gtrABS* | pGVXN2381 | pGVXN1076 |
| O18A | BVEC-L-00559 | Δ*rfb*::O18A *rfb* OC24255 | Δ*waaL* | Δ*gtrABS* | pGVXN970 | pGVXN1076 |
| O25B | stGVXN4459 | Δ*rfb*::O25B *rfb* upecGVXN_138 | Δ*waaL* | Δ*gtrABS* | pGVXN970 | pGVXN1076 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| O75 | stLMTB11737 | Δ*rfb*::O75 *rfb* CCUG31 | Δ*waaL* | Δ*gtrABS* | pGVXN1217 | pGVXN1076 |

**[00295]** Кластер генов биосинтеза O-антигена (*rfb*)

**[00296]** Во всех штаммах *E. coli*, продуцирующих O-антиген, природный геномный кластер генов биосинтеза O16::IS5 (rfb) *E. coli* W3110 заменяли выбранными кластерами генов специфического биосинтеза O-антигена из штаммов *E. coli* выбранного серотипа, кодирующих специфичные для серотипа структуры O-антигена (см. Таблицу 1 для этих структур O-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 O-антигена, достигалась благодаря единственному акту гомологичной рекомбинации. В случае генных кластеров *rfb* O16 и O18A донорскую ДНК рекомбинировали через фланкирующие гены *gnd* и *rmlCA*, 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.

**[00297]** Ген лигазы O-антигена (*waaL*)

**[00298]** Все штаммы *E. coli*, продуцирующие O-антиген, несут искусственно введенную делецию лигазы геномного O-антигена *E. coli* W3110, кодируемой геном *waaL*. В штаммах ΔwaaL нарушается перенос O-антигена на липид A, а вместо этого осуществляется перенос O-антигена на белок-носитель для увеличения выхода продукта.

**[00299]** Гены гликозилирования O-антигена (*gtrABS*)

**[00300]** В геномах штаммов-продуцентов *E. coli* O8, O15, O16, O18A, O25B и O75 осуществляли делецию генов *gtrABS E. coli* W3110, которые отвечают за гликозилирование O-антигена O16. В то время как гены *gtrA* и *gtrB* в разных серотипах высоко гомологичны и взаимозаменяемы, ген *gtrS* кодирует специфичную для серотипа O-антигена глюкозилтрансферазу. В *E. coli* W3110 GtrS может переносить остаток глюкозы (Glc) на сахар GlcNAc в мотиве α-L-Rha-(1→3)-D-GlcNAc O-антигена O16 *E. coli*. В штаммах-продуцентах *E. coli* O1A, O2 и O6A делеция или замена гена *gtrABS* отсутствует. В этих O-антигенах отсутствует мотив α-L-Rha-(1→3)-D-GlcNAc, который является естественным субстратом для *gtrS E. coli* O16. В продуцирующем штамме *E. coli* O4 ген *gtrS* W3110 был заменен геном *gtrS E. coli* O4 для обеспечения правильного гликозилирования O-антигена O4 *E. coli*.

**[00301]** Олигосахарилтрансфераза pglB

**[00302]** 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 Таблице 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.

**[00303]** **Таблица 4.** Плазмиды PglB и EPA, использованные в штаммах-продуцентах О-антигена *E. Coli*

| **Название плазмиды** | **Ген** | **Описание**[1] |
|---|---|---|
| pGVXN114 | *pglB* | Частота использования кодонов *C. jejuni*; SpR |
| pGVXN970 | *pglB* | Частота использования кодонов оптимизирована для *E. coli*; SpR |
| pGVXN971 | *pglB*$^{N534Q}$ | Частота использования кодонов оптимизирована для *E. coli*; природный сайт гликозилирования PglB инактивирован; SpR |
| pGVXN1217 | *pglB*$^{N311V}$ | Частота использования кодонов оптимизирована для *E. coli*; PglB с оптимизацией по субстрату; SpR |

| Название плазмиды | Ген | Описание[1] |
|---|---|---|
| pGVXN1221 | *pglB*$^{N311V,K482R,D483H,A669V}$ | Частота использования кодонов оптимизирована для *E. coli*; PglB с оптимизацией по субстрату; SpR |
| pGVXN2381 | *pglB*$^{Y77H,S80R,Q287P,K289R,N311V}$ | Частота использования кодонов оптимизирована для *E. coli*; 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

**[00304]** Белок носитель (EPA)

**[00305]** 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 *epa* размещался на плазмиде после индуцибельного промотора L-арабинозы (Ara) (Таблица 4). Таблица 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+)**

**[00306]** Продукция биоконъюгата может быть оптимизирована путем модификации олигосахарилтрансферазы PglB *C. jejuni,* что может привести к более эффективному или более выраженному N-гликозилированию интересующего O-антигена с белком-носителем EPA. В штамме *E. coli* для продукции биоконъюгата с гликозилированным полисахаридным O-антигеном O4 (O4-Glc+) была применена такая стратегия оптимизации, которая позволила получить оптимизированный (O4-Glc+)-специфический вариант PglB, улучшив выход биоконъюгата.

**[00307]** В этом подходе штамм-продуцент полисахаридного O-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-Glc+-специфических моноклональных антител.

**[00308]** Обнаружили, что один из исследуемых вариантов PglB, содержащий аминокислотную замену N311V, значительно улучшал выход гликозилированных биоконъюгатов O4 (Фиг. 7A).

**[00309]** При дальнейшем усовершенствовании, когда вариант N311V PglB модифицировали дополнительно, аминокислотная замена Y77H дополнительно увеличивала O4-Glc+-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. 7B). Плазмида pLMTB4008 (SpR) кодирует вариант PglB с оптимизированной для *E. coli* частотой использования кодонов, оптимизированный по субстрату (O4-Glc+), содержащий мутации Y77H и N311V.

**[00310]** Обнаружили, что вариант PglB с оптимизированной субстратной специфичностью к полисахаридному O-антигену O4-Glc+, содержащий аминокислотные замены N311V и Y77H по сравнению с гликозилтрансферазой *C. jejuni* дикого типа PglB (wt), удваивает выход биоконъюгата по сравнению с вариантом PglB-N311V, оптимизированным в первом цикле.

**[00311]** Аналогичным образом с помощью скрининга также определили наиболее оптимальные по продуктивности варианты PglB для продукции биоконъюгата O-антигена *E. coli* других девяти серотипов в композиции ExPEC10V.

**[00312]** Обнаружили, что PglB с аминокислотными мутациями N311V, K482R, D483H и A669V дает самый высокий выход биоконъюгатов, содержащих полисахаридный антиген O1A, O6A или O15.

**[00313]** Обнаружили, что PglB дикого типа (т.е. не имеющий аминокислотный 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.

**[00314]** Обнаружили, что PglB с аминокислотными мутациями Y77H, S80R, Q287P, K289R и N311V дает самый высокий выход биоконъюгатов, содержащих полисахаридный антиген O16.

**[00315]** Обнаружили, что PglB с аминокислотной мутацией N311V дает самый высокий выход биоконъюгатов, содержащих полисахаридный антиген O75.

**[00316]** 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

**[00317]** 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 EPA 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.

**[00318]** Каждый биоконъюгат получали путем культивирования соответствующих клеток-хозяев (Пример 6, Таблица 3) в биореакторах (объемом 10 и/или 200 литров) 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.

**[00319]** Полученные таким образом биоконъюгаты О-антигена *E. coli,* которые представляют собой лекарственные субстанции (ЛС) для ExPEC10V и ExPEC4V, показали сопоставимые основные показатели качества: (1) чистота, связанная с технологическим процессом (измеренная с помощью RP-HPLC (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).

**[00320]** 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 Таблице 1, для всех десяти биоконъюгатов, которые являются ЛС для композиции ExPEC10V, описанной выше.

**[00321]** Среди десяти серотипов, биоконъюгаты которых были получены для композиции ExPEC10V, самый низкий выход биоконъюгата наблюдался у серотипа O18.

**[00322]** Лекарственный продукт (DP) ExPEC10V содержит смесь десяти моновалентных ЛС, описанных выше.

**<u>Пример 9.</u> Токсикология вакцины ExPEC10V**

**[00323]** 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 О-серотипов O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75, соответственно), вводимый объем составлял 0,6 мл (176 мкг PS/мл). Некропсию производили на 2-й день.

**[00324]** 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**

**[00325]** 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; 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 О-антигену *E. coli* (не показано).

**[00326]** 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 (Таблица 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) (Таблица 5).

**[00327]** 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 OPK.

**Таблица 5.** Описание экспериментальных групп

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

**[00328]** Результаты показаны на Фиг. 8 и обобщены в Таблице 6.

**[00329] Таблица 6.** Сводные показатели выработки антител, специфических к O-антигену *E. coli*, у кроликов NZW в ответ на ExPEC10V.

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

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

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

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

**[00330]** 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, Таблица 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, Таблица 6).

**[00331]** 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, Таблица 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, Таблица 6).

**[00332]** 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, Таблица 6).

**[00333]** 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).

**[00334]** 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.

**[00335]** 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).

**[00336]** Для конъюгатов O6A, O8 и 015 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.

**[00337]** 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.

**[00338]** 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.

**[00339]** До сих пор, функциональные антитела, способные уничтожать штаммы *E.coli*, индуцированные этой вакциной у кроликов, были показаны для серотипов O1A, O2, O4, O6A, O15, O16 и O25B.

**[00340]** В дополнительном эксперименте получали партию вакцины ExPEC10V, соответствующую требованиям GMP (производство см. в Примере 8 выше), и вводили кроликам NZW в рамках токсикологического исследования (Таблица 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% (масс./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.

**[00341]** Значительное усиление гуморального ответа против всех O-антигенов и белка-носителя EPA наблюдалось на 31 и 50 день после вакцинации в группе, получавшей ExPEC10V, по сравнению с контрольной группой, получавшей только физиологический раствор (Фиг. 9, Таблица 8). Для серотипа O1A значительно более выраженный гуморальный ответ наблюдался также в день 1 (исходный уровень), когда вакцинированных животных сравнивали с контрольными животными. Эти результаты позволяют предположить, что некоторые животные предварительно подвергались воздействию *E. coli* или имеют антитела, перекрестно реагирующие с O1A-LPS.

**[00342]** **Таблица 7.** Экспериментальные группы и доза ExPEC10V, использованная у кроликов NZW.

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

*Каждая доза (вводимый объем 0,6 мл) содержит 9,6: 9,6: 9,6: 9,6: 9,6: 9,6: 9,6: 9,6: 19,2: 9,6 мкг полисахарида (PS) для серотипов O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B, O75, соответственно (176 мкг общего PS/мл). Каждая доза содержит 382,8 мкг белка EPA (638 мкг EPA/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 ≤ 0,0001.

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

**[00343]** В настоящее время вакцин для предотвращения IED не существует. Серотипы, составляющие вакцину ExPEC10V (O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75), отбирали для решения проблемы инвазивных заболеваний, вызываемых большинством клинически значимых штаммов ExPEC, которые также представляют большинство изолятов ExPEC, вызывающих устойчивые к противомикробным препаратам IED, в том числе ST131. Выбранные серотипы являются репрезентативными для десяти преобладающих O-серотипов ExPEC, вызывающих инфекции циркулирующей крови у пожилого населения и отвечающих примерно за 70% инфекций циркулирующей крови, вызываемых ExPEC.

**[00344]** 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.

**[00345]** Имеется предшествующий клинический опыт с ExPEC4V, более ранней вакциной-кандидатом, которая содержала набор из четырех конъюгатов O-антигена *E. coli* (O1A, O2, O6A и O25B), также присутствующих в ExPEC10V. Основываясь на результатах четырех клинических исследований (два завершенных исследования фазы 1, одно завершенное 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 вакциной настораживающих сигналов по безопасности не отмечалось. Большинство нежелательных явлений (НЯ) относились к 1 и 2 степени, сообщалось об очень небольшом количестве НЯ 3 степени. Полученные по запросу отсроченные местные НЯ (НЯ, которые начинаются после 5-го дня после вакцинации) наблюдались в основном при более высоких дозах ExPEC4V. В каждом исследовании было показано, что вакцина ExPEC4V является иммуногенной, демонстрируя дозозависимый иммунный ответ на вакцину, а титр иммуноглобулинов G (IgG), специфичных к O-антигену, возрастает, о чем свидетельствуют результаты иммуноферментного анализа (ELISA). Анализ опсонофагоцитарной активности (OPKA), оптимизированный для ExPEC4V, продемонстрировал функциональную активность антител. Совместный анализ результатов ELISA и OPKA 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 протяжение трех лет после вакцинации ExPEC4V. На данный момент также показано, что сыворотки людей, вакцинированных ExPEC4V и имевших высокие титры серотип-специфичных опсонофагоцитарных антител, при пассивном переносе мышам, которых впоследствии внутрибрюшинно заражали штаммами *E. coli* серотипа O25B или O2, были способны обеспечивать защиту *in vivo* (не показано). Следовательно, ExPEC4V-специфические опсонофагоцитарные человеческие антитела опосредуют уничтожение бактерий *in vivo*, что согласуется с данными по другим конъюгированным вакцинам, у которых предложенный механизм защиты заключается в индукции опсонофагоцитарных антител, которые опосредуют уничтожение бактерий.

**[00346]** 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.

**[00347]** 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.

**[00348]** 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 Таблице 1.

**[00349]** ЗАДАЧИ И КОНЕЧНЫЕ ТОЧКИ

**[00350]** КОГОРТА 1 - Фаза 1/2a, период с маскированием данных для исследователя с открытым периодом долгосрочного наблюдения (N = 404):

| Задачи | Конечные точки |
|---|---|
| **Основные** | |
| • Оценка безопасности и реактогенности различных доз ExPEC10V у участников в возрасте ≥60 и ≤85 лет | • Полученные по запросу местные и системные нежелательные явления (НЯ), регистрируемые в течение 14 дней после вакцинации (с 1 дня до 15 дня)<br>• Сообщенные спонтанно НЯ, регистрируемые с момента введения исследуемой вакцины до 29 дня после вакцинации (с 1 дня до 30 дня)<br>• Серьезные нежелательные явления (НЯ), регистрируемые с момента введения исследуемой вакцины до 181 дня |
| • Оценка дозозависимой иммуногенности ExPEC10V на 15 день у участников в возрасте ≥60 и ≤85 лет | • Титры антител к ExPEC10V, измеренные в мультиплексном иммуноанализе на основе электрохемилюминесции (ECL) и мультиплексном анализе опсонофагоцитарной активности (MOPA) на 15 день |
| **Второстепенные** | |
| • Оценка корреляции между сывороточными титрами, полученными в мультиплексном иммуноанализе на основе ECL (общие антитела) и MOPA (функциональные антитела) на 15 день | • Титры антител к ExPEC10V, измеренные в мультиплексном иммуноанализе на основе ECL и MOPA на 15 день |
| • Оценка дозозависимой иммуногенности ExPEC10V на 30 и 181 день у участников в возрасте ≥60 и ≤85 лет | • Титры антител к ExPEC10V, измеренные в мультиплексном иммуноанализе на основе ECL и MOPA на 30 и 181 день |

| Задачи | Конечные точки |
|---|---|
| • 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 | • Серьезные НЯ, связанные с исследуемой вакциной или предусмотренными исследованием процедурами, от 182 дня и до конца исследования |
| • Оценка в периоде ДН иммуногенности дозы ExPEC10V, выбранной для дальнейших клинических разработок на основе первичного анализа на 30 день | • 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** | |
| • Оценка безопасности и реактогенности выбранной дозы ExPEC10V у участников в возрасте ≥60 лет с ИМП в анамнезе за последние 5 лет | • Полученные по запросу местные и системные НЯ, регистрируемые в течение 14 дней после вакцинации (с 1 дня до 15 дня)<br>• Сообщенные спонтанно НЯ, регистрируемые с момента введения исследуемой вакцины до 29 дня после вакцинации (с 1 дня до 30 дня)<br>• Серьезные НЯ, регистрируемые с момента введения исследуемой вакцины до 181 дня |

| Задачи | Конечные точки |
|---|---|
| • Оценка иммуногенности выбранной дозы ExPEC10V на 30 день у участников в возрасте ≥60 лет с ИМП в анамнезе за последние 5 лет | • Титры антител к ExPEC10V, измеренные в мультиплексном иммуноанализе на основе ECL и MOPA на 30 день |
| **Второстепенные** | |
| • Оценка корреляции между сывороточными титрами, полученными в мультиплексном иммуноанализе на основе ECL (общие антитела) и MOPA (функциональные антитела) на 30 день у участников в возрасте ≥60 лет с ИМП в анамнезе за последние 5 лет | • Титры антител к ExPEC10V, измеренные в мультиплексном иммуноанализе на основе ECL и MOPA на 30 день |
| • Оценка иммуногенности выбранной дозы ExPEC10V на 15 и 181 день у участников в возрасте ≥60 лет с ИМП в анамнезе за последние 5 лет | • Титры антител к ExPEC10V, измеренные в мультиплексном иммуноанализе на основе ECL и MOPA на 15 и 181 день |
| **Задачи** | **Конечные точки** |
| • Оценка в периоде ДН безопасности выбранной дозы ExPEC10V у участников в возрасте ≥60 лет с ИМП в анамнезе за последние 5 лет | • Серьезные НЯ, связанные с исследуемой вакциной или предусмотренными исследованием процедурами, от 182 дня и до конца исследования |
| • Оценка в периоде ДН иммуногенности выбранной дозы ExPEC10V у участников в возрасте ≥60 лет с ИМП в анамнезе за последние 5 лет | • 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) |
| **Поисковые** | |
| • Оценка влияния ExPEC10V на кишечный микробиом (стул) по результатам метагеномного анализа | • Метагеномный анализ образцов стула у отобранной подгруппы участников для оценки влияния ExPEC10V на:<br>– Распространенность патогенов (например, *Clostridium difficile*) в кишечной флоре |

| Задачи | Конечные точки |
|---|---|
| | – Распространенность серотипов ExPEC10V в кишечной флоре |

[00351] ОБЩАЯ СХЕМА ИССЛЕДОВАНИЯ

[00352] Это рандомизированное многоцентровое интервенционное исследование, включающее две когорты.

[00353] 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. 10A). Только участники из группы, получавшей выбранную дозу ExPEC10V (приблизительно 100 участников) и участники из группы Prevnar 13 переходят в период ДН. Окончание исследования для когорты 1 - это последний визит участника через 3 года (день 1096).

[00354] 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 1/2a 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. 10B). Все участники когорты 2 переходят в период ДН. Окончание исследования - это последний визит участника из когорты 2 через 3 года (день 1096).

[00355] <u>Когорта 1: Фаза 1</u>

[00356] 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 (Таблица 11) и по одному участнику в группы ExPEC4V и Prevnar 13.
Этап 2: Отбирали и рандомизировали 24 участника; 18 участников в группу низкой дозы ExPEC10V (Таблица 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 (Таблица 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 (Таблица 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 (Таблица 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 (Таблица 11) и по три участника в группы ExPEC4V и Prevnar 13.

**[00357]** В 1 день все участники получали однократную внутримышечную (в/м) инъекцию либо ExPEC10V (1 из 3 доз), либо ExPEC4V, либо Prevnar 13 в соответствии с группой вакцинации, в состав которой их включили в рамках исследования. С первой сигнальной четверкой участников на каждом из этапов 1, 3 и 5 связывались по телефону через 24 часа после вакцинации для сбора информации о безопасности. Замаскированные данные о безопасности через 24 часа 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.

**[00358]** 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 (Таблица 11) для получения одной в/м инъекции либо ExPEC10V (1 из 3 доз), ExPEC4V или Prevnar 13 в 1 день.

**[00359]** 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 2a.

**[00360]** Когорта 1: Фаза 2a

**[00361]** 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 2a исследования. Эти дополнительные 320 участников включали в исследование и рандомизировали параллельно в соотношении 2:2:2:1:1 в одну из пяти исследуемых групп вакцинации для получения в день 1 однократной внутримышечной инъекции либо ExPEC10V (1 из 3 доз), либо ExPEC4V или Prevnar 13 (Таблица 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.

**[00362]** Для когорты 1 первичный анализ проводится, когда все участники совершили визит на 30-й день (4 визит) или прервали участие в исследовании раньше. Окончательный анализ проводится, когда все участники совершили визит на 181-й день или прервали участие в исследовании раньше. Для участников, переходящих к открытому периоду долгосрочного наблюдения (ДН) (группа с выбранной дозой ExPEC10V и группа Prevnar 13), ежегодные контрольные анализы включают данные по безопасности и иммуногенности (мультиплексный иммуноанализ на основе ECL и MOPA) во время посещения через 1 год (366 день), 2 года (731 день) и 3 года (1096 день) после вакцинации.

**[00363]** Когорта 2

**[00364]** 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).

**[00365]** 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 (Таблица 11).

**[00366]** 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 MOPA) во время посещения через 1 год (366 день), 2 года (731 день) и 3 года (1096 день) после вакцинации.

**[00367]** 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.

**[00368]** КОЛИЧЕСТВО УЧАСТНИКОВ

**[00369]** Всего в исследовании приняли участие 1004 участника; 404 участника в когорте 1 и 600 участников в когорте 2.

**[00370]** ГРУППЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ

**[00371]** Описание воздействия

**[00372]** **ExPEC10V:** Биоконъюгированная вакцина *E. coli* в фосфатном буферном растворе, содержащая полисахаридный О-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.

**[00373] 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.

**[00374] Prevnar 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.

**[00375] Плацебо**: физиологический раствор. Однократная в/м (в дельтовидную мышцу) инъекция 0,5 мл плацебо в день 1.

**[00376]** Материалы исследования ExPEC описаны в Таблице 9.

**[00377] Таблица 9**. Исследуемые вакцины BAC1001MV ExPEC4V

| **Группа воздей-ствия** | **O1A** (мкг) | **O2** (мкг) | **O4** (мкг) | **O6A** (мкг) | **O8** (мкг) | **O15** (мкг) | **O16** (мкг) | **O18A** (мкг) | **O25B** (мкг) | **O75** (мкг) | **EPA** (мкг) | **PS (сум-марно)** (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 обезврежнная 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.

**[00378]** ExPEC10V состоит из 10 одновалентных лекарственных субстанций (ЛС). Для этого клинического исследования производятся 2 различные концентрации (средняя и высокая) лекарственного препарата (DP) (Таблица 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% [масс./масс.] Полисорбата 80, 5% [масс./масс.] сорбита, 10 мМ метионина).

**[00379]** **Таблица 10:** Состав вакцины ExPEC10V для клинического исследования фазы 1/2a

| **Ингредиент** | **Количество (мкг/мл)[a]** | | |
|---|---|---|---|
| **Активный[a]** | **Низкая концентрация[b]** | **Средняя концентрация** | **Высокая концентрация** |
| ***Полисахаридный О-антиген*** | | | |
| EcoO1A | 8 | 16 | 16 |
| EcoO2 | 8 | 8 | 16 |
| EcoO4 | 8 | 8 | 16 |
| EcoO6A | 8 | 16 | 16 |
| EcoO8 | 8 | 8 | 16 |
| EcoO15 | 8 | 8 | 16 |
| EcoO16 | 8 | 8 | 16 |
| EcoO18A | 8 | 8 | 16 |
| EcoO25B | 16 | 32 | 32 |
| EcoO75 | 8 | 8 | 16 |
| ***Белок-носитель*** | | | |
| EPA | 320 | 441 | 640 |
| **Эксципиенты** | | | |
| $KH_2PO_4$ | 6,19 мМ | | |
| $Na_2HPO_4$ | 3,81 мМ | | |
| Сорбит | 5% (мас./мас.) | | |
| Метионин | 10 мМ | | |
| Полисорбат 80 | 0,02% (мас./мас.) | | |

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

[a] Активный ингредиент представляет собой биологически синтезированный конъюгат, состоящий из PS антигена и белка-носителя (EPA); доза рассчитывается только по PS группировке.

[b] «низкую концентрацию» получают в клинике путем разбавления «высокой концентрации» 1:1 буфером для разведения

**[00380]** ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ

**[00381]** 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.

**[00382]** ОЦЕНКА ИММУНОГЕННОСТИ

**[00383]** 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 (OPKA) в мультиплексном формате (MOPA). Оценка иммуногенности титров антител к пневмококку, вызванных Prevnar 13, не производится.

**[00384]** 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 EPA. 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).

**[00385]** Уровни функциональных антител, индуцированных ExPEC10V, измеряют с помощью мультиплексного анализа опсонофагоцитарной активности (MOPA). 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, содержащие среду, в которую добавлен определенный антибиотик, который избирательно способствует росту штамма, устойчивого к данному антибиотику. После выращивания в течение ночи подсчитывают колониеобразующие единицы (КОЕ), чтобы определить количество выживших бактерий. Данный анализ отвечает требованиям, указанным в рекомендациях ICH.

**[00386]** Для антител к серотипам ExPEC10V, измеренным с помощью мультиплексного иммуноанализа на основе ECL и MOPA, а также к EPA, измеренным только с помощью мультиплексного иммуноанализа на основе ECL, оценивают следующие показатели иммуногенности и заносят в таблицы по исследуемым группам вакцинации для всех моментов времени, в которых определяют иммуногенность:

- доля участников с ≥2-кратным и ≥4-кратным увеличением титров сывороточных антител с 1-го дня (до вакцинации)
- средний геометрический титр (GMT)
- GMR: кратность изменения от базового уровня, рассчитанное по отношению значений после базового уровня к значениям базового уровня.

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

**[00387]** При выборе дозы для более поздних фаз учитывают совокупность данных, имеющихся на момент первичного анализа когорты 1 (результаты 30-го дня).

**[00388]** **Таблица 11:** Когорта 1: Схема вакцинации

| | | **Фаза 1** | | | | | | **Фаза 2а** | **Суммарно** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **Этап 1** | **Этап 2** | **Этап 3** | **Этап 4** | **Этап 5** | **Этап 6** | **Этап 7** | |
| **Исследуемая группа вакцина-ции** | **Вакцинация в 1-й день.** | **Первые участники (низкая доза)** | **Дополнительные участники (низкая доза)** | **Первые участники (средняя доза)** | **Дополнительные участники (средняя доза)** | **Первые участники (высокая доза)** | **Дополнительные участники (высокая доза)** | **Дополнительные участники фазы 2а** | |
| G1 | Низкая доза 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 A (EPA), полученного из *Pseudomonas aeruginosa.*

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

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

[00389] **Таблица 12:** Когорта 2: Схема вакцинации

| **Исследуемая группа вакцинации** | **Вакцинация в 1-й день** | **Суммарно** |
|---|---|---|
| G6 | ExPEC10V[a] | 400 |
| G7 | Плацебо | 200 |
| **Суммарно** | | **600** |

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

**[00390]** 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.

**[00391]** СТАТУС

**[00392]** Набор и вакцинация когорты 1 описанного выше исследования завершены. Исследование проводится с маскированием данных. На основании текущего анализа данных о безопасности серьезных проблем с безопасностью выявлено не было, и вакцина ExPEC10V имеет приемлемый профиль безопасности.

**[00393]** 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 MOPA продолжается. Демаскирование данных и статистический анализ выполняются с привлечением организации по клиническим исследованиям (CRO).

**[00394]** Вакцинация Когорты 2 начинается после определения дозы ExPEC10V для этой Когорты на основании окончательного первичного анализа результатов 30-го дня для Когорты 1.

**[00395]**

**[00396]** Специалистам в данной области техники понятно, что воплощения, описанные выше, могут быть модифицированы без изменения сущности изобретения. Поэтому понятно, что это изобретение не ограничивается конкретными раскрытыми воплощениями, но также охватывает модификации, которые соответствуют сущности данного изобретения, изложенного в данном описании, и входят в объем данного изобретения.

# ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

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

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

**SEQ ID NO: 2** (оптимизированная консенсусная последовательность гликозилирования)

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

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

G SGGG**DQNAT**G SGGGKLAEEA FDLWNECAKA CVLDLKDGVR SSRMSVDPAI ADTNGQGVLH YSMVLEGGND
ALKLAIDNAL SITSDGLTIR LEGGVEPNKP VRYSYTRQAR GSWSLNWLVP IGHEKPSNIK VFIHELNAGN QLSHMSPIYT
IEMGDELLAK LARDATFFVR AHESNEMQPT LAISHAGVSV VMAQAQPRRE KRWSEWASGK VLCLLDPLDG VYNYLAQQRC
NLDDTWEGKI YRVLAGNPAK HDLDIK**DNNN ST**PTVISHRL HFPEGGSLAA LTAHQACHLP LEAFTRHRQP RGWEQLEQCG
YPVQRLVALY LAARLSWNQV DQVIRNALAS PGSGGDLGEA IREQPEQARL ALTLAAAESE RFVRQGTGND EAGAASADVV
SLTCPVAK**DQ NRT**KGECAGP ADSGDALLER NYPTGAEFLG DGGDVSFSTR GTQNWTVERL LQAHRQLEER GYVFVGYHGT
FLEAAQSIVF GGVRARSQDL DAIWRGFYIA GDPALAYGYA QDQEPDARGR IRNGALLRVY VPRWSLPGFY RTGLTLAAPE
AAGEVERLIG HPLPLRLDAI TGPEEEGGR**V** TILGWPLAER TVVIPSAIPT DPRNVGGDLD PSSIPDKEQA ISALPDYASQ
PGKPPREDLK LGSGGG**DQNA T**

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

MNNLIMNNWCKLSIFIIAFILLWLRRPDILTNAQFWAEDSVFWYKDAYENGFLSSLTTPRNGYFQTVSTFIVGLT
ALLNPDYAPFVSNFFGIMIRSVIIWFLFTERFNFLTLTTRIFLSIYFLCMPGLDEVHANITNAHWYLSLYVSMIL
IARNPSSKSWRFHDIFFILLSGLSGPFIIFILAASCFKFINNCKDHISVRSFINFYLRQPYALMIVCALIQGTSI
ILTFNGTRSSAPLGFSFDVISSIISSNIFLFTFVPWDIAKAGWDNLLLSYFLSVSILSCAAFVFVKGTWRMKVFA
TLPLLIIIFSMAKPQLTDSAPQLPTLINGQGSRYFVNIHIAIFSLLCVYLLECVRGKVATLFSKIYLTILLFVMG
CLNFVITPLPNMNWREGATLINNAKTGDVISIQVLPPGLTLELRKK

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

ATGAATAATTTAATTATGAATAACTGGTGTAAATTATCTATATTTATTATTGCATTTATTTTGCTATGGCTTAGA
AGGCCGGATATACTCACAAACGCACAATTTTGGGCAGAAGATTCCGTTTTCTGGTATAAGGACGCCTATGAGAAC
GGATTCTTAAGTTCACTAACAACGCCTAGGAATGGGTATTTCCAGACTGTTTCTACATTTATAGTTGGTCTGACT
GCTTTATTAAATCCAGATTATGCACCTTTTGTTTCTAATTTTTTTGGCATAATGATTCGCTCAGTAATTATATGG
TTTTTATTTACAGAAAGATTCAACTTCCTCACATTGACTACTAGGATTTTCTTATCTATTTATTTTCTATGCATG
CCTGGATTGGATGAAGTTCATGCAAATATAACAAATGCACATTGGTATTTGTCATTATATGTATCAATGATCCTG
ATAGCTCGCAATCCAAGTTCAAAATCATGGAGGTTTCATGATATATTCTTTATCTTGCTATCCGGGCTCAGTGGC
CCATTTATAATTTTCATTTTAGCAGCTTCATGCTTTAAATTTATAAATAATTGTAAAGATCATATTAGTGTAAGA
TCTTTCATAAATTTCTACTTGCGTCAGCCATACGCATTAATGATTGTTTGCGCTTTAATTCAAGGAACTTCTATA
ATTCTAACTTTCAATGGCACACGTTCCTCAGCACCGCTAGGATTCAGTTTTGATGTGATTTCGTCTATTATATCA
TCGAATATTTTTTTATTTACATTTGTCCCATGGGATATTGCAAAGGCTGGGTGGGATAATTTACTGTTATCTTAT
TTTTTGTCTGTTTCGATTTTGTCGTGTGCGGCCTTTGTTTTTGTTAAAGGTACGTGGCGAATGAAAGTATTTGCA

ACTTTACCATTGCTAATTATAATATTTTCAATGGCAAAACCACAATTGACAGACTCGGCACCTCAATTGCCAACA
CTTATTAATGGGCAAGGTTCAAGATACTTCGTAAATATACATATTGCGATATTCTCTTTGCTATGTGTTTACTTA
CTTGAGTGCGTCAGGGGGAAAGTGGCAACTTTATTTTCCAAAATATACTTAACAATTTTGCTATTCGTGATGGGA
TGTTTGAATTTTGTTATCACCCCACTCCCAAACATGAACTGGAGGGAAGGTGCTACTTTGATTAATAATGCAAAA
ACTGGTGATGTCATTTCGATTCAAGTGCTACCACCTGGCCTAACACTTGAACTAAGGAAAAAATAA

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

MLKKEYLKNPYLVLFAMIILAYVFSVFCRFYWVWWASEFNEYFFNNQLMIISNDGYAFAEGARDMIAGFHQPNDL
SYYGSSLSALTYWLYKITPFSFESIILYMSTFLSSLVVIPTILLANEYKRPLMGFVAALLASIANSYYNRTMSGY
YDTDMLVIVLPMFILFFMVRMILKKDFFSLIALPLFIGIYLWWYPSSYTLNVALIGLFLIYTLIFHRKEKIFYIA
VILSSLTLSNIAWFYQSAIIVILFALFALEQKRLNFMIIGILGSATLIFLILSGGVDPILYQLKFYIFRSDESAN
LTQGFMYFNVNQTIQEVENVDLSEFMRRISGSEIVFLFSLFGFVWLLRKHKSMIMALPILVLGFLALKGGLRFTI
YSVPVMALGFGFLLSEFKAIMVKKYSQLTSNVCIVFATILTLAPVFIHIYNYKAPTVFSQNEASLLNQLKNIANR
EDYVVTWWDYGYPVRYYSDVKTLVDGGKHLGKDNFFPSFALSKDEQAAANMARLSVEYTEKSFYAPQNDILKTDI
LQAMMKDYNQSNVDLFLASLSKPDFKIDTPKTRDIYLYMPARMSLIFSTVASFSFINLDTGVLDKPFTFSTAYPL
DVKNGEIYLSNGVVLSDDFRSFKIGDNVVSVNSIVEINSIKQGEYKITPIDDKAQFYIFYLKDSAIPYAQFILMD
KTMFNSAYVQMFFLGNYDKNLFDLVINSRDAKVFKLKI

**SEQ ID NO:** 7 (пример аминокислотной последовательности gtrA; *E. coli* W3110 yfdG, GenBank: BAA16209.1)

MLKLFAKYTSIGVLNTLIHWVVFGVCIYVAHTNQALANFAGFVVAVSFSFFANAKFTFKASTTTMRYMLYVGFMG
TLSATVGWAADRCALPPMITLVTFSAISLVCGFVYSKFIVFRDAK

**SEQ ID NO: 8** (пример аминокислотной последовательности gtrB–*E. coli* W3110 yfdH, GenBank: BAA16210.1)

MKISLVVPVFNEEEAIPIFYKTVREFEELKSYEVEIVFINDGSKDATESIINALAVSDPLVVPLSFTRNFGKEPA
LFAGLDHATGDAIIPIDVDLQDPIEVIPHLIEKWQAGADMVLAKRSDRSTDGRLKRKTAEWFYKLHNKISNPKIE
ENVGDFRLMSRDVVENIKLMPERNLFMKGILSWVGGKTDIVEYVRAERIAGDTKFNGWKLWNLALEGITSFSTFP
LRIWTYIGLVVASVAFIYGAWMILDTIIFGNAVRGYPSLLVSILFLGGIQMIGIGVLGEYIGRTYIETKKRPKYI
IKRVKK

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

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCGATACCC
AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAA
GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA
CTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG
AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCA
TTTGTCGTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATG
ATTGCACGTTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCC
GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGAT
CAGCCGCAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTCGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAACTG
GAACGTACTCAGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCC
GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG
TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA
TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAA
TCTTCCTGCCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA
GGATTTTCCTTGTTTCCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA
ACGCTCGTCACATCATAGGCATGCATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC
CTCTATTAATCAAACTGAGAGCCGCTTATTTCACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGTGAAAATA
CTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTGGTTCAGCTGTAGTTCGTCACATTATAAATAATACGCAGGATAGTGTT

GTTAATGTCGATAAATTAACGTACGCCGGAAACCGGGAATCACTTGCTGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATGTT
TTTGAACATGCGGATATTTGCGATGCACCTGCAATGGCACGGATTTTTGCTCAGCATCAGCCGGATGCAGTGATG
CACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTTGGT
ACTTATGTCCTTTTGGAAGCCGCTCGCAATTACTGGTCTGCTCTTGATAGCGACAAGAAAAATAGCTTCCGTTTT
CATCATATTTCTACTGACGAAGTATATGGTGATTTGCCTCATCCTGACGAGGTAAATAATACAGAAGAATTACCC
TTATTTACTGAGACAACAGCTTACGCGCCAAGCAGCCCTTATTCCGCATCCAAAGCATCCAGCGATCATTTAGTC
CGCGCGTGGAAACGTACCTATGGTTTACCGACCATTGTGACTAATTGCTCTAACAATTATGGTCCTTATCATTTC
CCGGAAAAATTGATTCCATTGGTTATTCTCAATGCTCTGGAAGGTAAAGCATTACCTATTTATGGTAAAGGGGAT
CAAATTCGCGACTGGCTGTATGTTGAAGATCATGCGCGTGCGTTATATACCGTCGTAACCGAAGGTAAAGCGGGT
GAAACTTATAACATTGGTGGGCACAACGAAAAGAAAAACATAGATGTAGTGCTCACTATTTGTGATTTGCTGGAT
GAGATTGTACCGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAAATCACTTATGTTGCCGATCGTCCGGGACACGATCGCCGT
TATGCGATTGATGCTGAGAATATTGGTCGCGAATTGGGATGGAAACCACAGGAAACGTTTGAGAGCGGGATTCGG
AAGACAGTGGAATGGTATCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAATGTGAAAAGTGGTGCCTATCAATCGTGGATT
GAAGAGAACTATGAGGGCCGCCAGTAATGAATATCCTCCTTTTTGGCAAAACAGGGCAGGTAGGTTGGGAACTAC
AGCGTGCTCTGGCACCTCTGGGTAACTTGATTGCTCTTGATGTTCATTCCACTGATTATTGTGGCGATTTCAGTA
ACCCCGAAGGTGTGGCTGAAACCGTCAAAAAAATTCGCCCAGATGTTATTGTTAATGCTGCTGCTCATACCGCGG
TAGATAAGGCTGAGTCAGAACCAGAATTTGCACAATTACTCAATGCGACCAGCGTTGAAGCAATTGCAAAAGCGG
CTAATGAAGTTGGGGCTTGGGTAATTCATTACTCAACTGACTACGTCTTCCCTGGAAATGGCGACATGCCATGGC
TCGAGACTGATGTAACCGCTCCGCTCAATGTTTATGGCAAAACCAAATTGGCTGGAGAAAGAGCATTACAAGAAC
ATTGCGCAAAGCATCTTATTTTCCGTACCAGCTGGGTATATGCAGGTAAAGGAAATAACTTTGCCAAAACAATGT
TACGTCTGGCAAAAGAGCGCGAAGAACTGGCTGTGATAAACGATCAGTTTGGCGCACCAACAGGTGCTGAATTGC
TGGCTGATTGCACCGCTCATGCCATTCGCGTGGCATTAAAAAAACCAGAAGTTGCTGGCTTGTACCATCTGGTAG
CAAATGGCACAACAACCTGGCACGATTACGCCGCGCTAGTATTCGAAGAAGCCCGTAAAGCAGGGATTGACCTTG
CACTTAACAAACTCAACGCCGTACCAACAACGGCTTATCCTACTCCAGCCCGCCGTCCTCATAATTCTCGCCTCA
ATACCGAAAAGTTTCAGCAGAACTTTGCGCTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTGGGCGTGAAACGTATGCTCAACG
AATTATTTACGACTACGGCAATTTAACAAATTTTTGCATCTCGCTCATGATGCCAGAGCGGGATGAATTAAAAGG
AATGGTGAAATGAAAACGCGTAAAGGTATTATTCTGGCTGGTGGTTCCGGCACTCGTCTTTATCCTGTGACGATG
GCAGTGAGTAAACAACTGCTGCCGATTTATGATAAGCCGATGATTTATTATCCGCTTTCAACGCTTATGTTAGCG
GGTATTCGCGATATTCTTATTATCAGTACGCCACAGGATACACCGCGTTTCCAACAATTGTTGGGGGACGGGAGT
CAGTGGGGGCTTAATCTACAGTATAAAGTACAACCGAGTCCGGATGGCCTGGCGCAAGCGTTTATTATTGGTGAA
GACTTTATTGGTGGTGATGATTGTGCACTCGTACTTGGCGATAATATCTTCTATGGACACGACTTGCCGAAATTA
ATGGAAGCTGCTGTTAACAAAGAAATCGGTGCAACGGTATTTGCTTATCACGTCAATGATCCTGAACGTTATGGT
GTCGTGGAGTTTGATAATAACGGTACTGCAATTAGCCTGGAAGAAAAACCGCTGGAACCAAAAAGTAACTATGCG
GTTACTGGGCTTTATTTCTATGACAATGATGTTGTAGAAATGGCGAAAAACCTTAAGCCTTCTGCCCGTGGCGAA
CTGGAAATTACCGATATTAACCGTATTTATATGGAGCAGGGACGTTTGTCTGTCGCTATGATGGGGCGTGGTTAT
GCCTGGTTGGATACTGGTACACATCAAAGTCTTATTGAAGCAAGTAACTTCATTGCCACCATTGAAGAGCGTCAG
GGATTAAAGGTATCTTGCCCGGAAGAGATTGCTTACCGTAAAGGGTTTATTGATGCTGAGCAGGTGAAAGTATTA
GCCGAACCGCTGAAGAAAAATGATTATGGTCAGTATCTGCTAAAAATGATTAAAGGTTATTAATAAAATGAACGT
AATTAAAACTGAAATTCCTGATGTGCTGATTTTTGAACCAAAAGTTTTTGGTGATGAACGTGGCTTCTTTTTTGA
GAGTTTTAACCAGAAAGTATTTGAAGAAGCTGTAGGACGGAAGGTTGAATTTGTTCAGGATAACCATTCTAAGTC
TAAAATAAATGTATTGCGTGGGATGCATTATCAAACACAAAATACTCAAGGAAAACTGGTTCGGGTAATTTCTGG
TTCAGTATATGATGTTGCCGTAGATTTAAGAGAAAAATCAAAGACATTTGGCAAATGGGTGGGTGTAGAATTATC
TGGGAATAATAAAAGACAATTGTGGATCCCCGAAGGTTTTGCCCATGGTTTTTATGTGTTGGAGGAGAATACCGA
ATTTGTTTATAAATGTACCGATACTTATAACCCTGCTCATGAACACACATTGCTATGGAATGATCCAACTATCAA
TATAAGTTGGCCAATCATACAAAACTGCAAGCCAATTATTTCTGAAAAAGATGCTAATGGACATCTTTTTTCACA
TAAAACCTATTTCTGAAATGCAATATTATGAGTTTAATTAGAAACAGTTTCTATAATATTGCTGGTTTTGCTGTG
CCGACATTAGTTGCAGTCCCTGCTTTGGGGATTCTTGCCAGGCTGCTTGGACCGGAGAATTTTGGACTTTTCACA
CTAGCATTCGCTTTGATAGGATATGCAAGTATTTTCGACGCCGGGATTAGTCGAGCTGTAATCAGAGAAATCGCT
CTTTATCGAGAAAGTGAAAAAGAGCAAATACAAATTATTTCGACAGCAAGTGTAATCGTACTATTCTTAGGGGTG
GTTGCAGCTTTGTTACTTTATTTTAGTAGTAATAAAGTTGTTGAGTTATTGAATGTTAGTTCCGTTTATATTGAA
ACAGCAGTGCGTGCATTCTCTGTTATTTCATTTATAATACCTGTGTATCTGATTAACCAGATTTGGCTTGGTTAT
CTGGAAGGGCTAGAAAAATTTGCAAATATAAATGTTCAGAGAATGATTTCTAGCACAAGCTTGGCTATATTACCA
GTGATATTTTGTTATTACAATCCCTCGTTGCTTTATGCTATGTATGGGTTGGTGGTTGGGCGTGTGATTTCATTT
TTGATTAGCGCAATAATTTGTCGAGATATTATTCTTAAAAGTAAACTTTACTTTAATGTGGCAACTTGCAATCGT
CTTATCTCTTTTGGTGGATGGATAACAGTTAGTAATATCATAAGCCCAATCATGGCATATTTCGACCGCTTTATC
ATCTCTCATATTATGGGGGCTTCGAGAATTGCATTTTATACAGCGCCCTCAGAGGGTGTATCAAGGTTAATTAAT
ATCCCATATGCTTTGGCAAGAGCTCTATTTCCTAAATTGGCATATAGCAATAATGATGATGAACGAAAAAAATTA
CAACTACAGAGCTACGCAATTATAAGCATTGTATGTCTACCCATAGTTGTTATTGGTGTCATTTTTGCCTCATTC
ATAATGACAACATGGATGGGACCTGATTATGCCTTAGAAGCAGCAACTATCATGAAAATACTTCTTGCTGGTTTT
TTCTTTAACTCTTTAGCGCAAATACCTTATGCATACTTGCAATCTATCGGAAAGTCAAAAATTACCGCATTTGTG

CATCTCATAGAACTTGCGCCATACTTATTATTATTGTATTACTTCACAATGCATTTCGGCATAATTGGCACGGCA
ATCGCTTGGTCACTTAGAACATTTTGTGATTTTGTTATACTACTTTCGATATCGAGAAGAAAATGATTGCGGTTG
ATATTGCGCTTGCAACCTACAATGGTGCTAATTTTATTCGGCAACAGATTGAATCTATCCAGAAACAAACTTATA
GAAATTGGCGTCTTATAATAAGTGATGATAACTCGAGTGATGATACTGTTGATATTATTAAGGATATGATGTCTA
ACGACAGTCGTATCTATTTGGTAGGAAATAAAAGACAAGGAGGGGTTATTCAGAACTTTAATTATGCTCTTTCAC
AAACTACATCTGAAATTGTGTTACTATGTGACCAGGATGACATTTGGCCGGAGGAGCGTCTGGAAATTCTTATAG
ATAAATTTAAGGCCTTGCAGCGTAATGATTTTGTTCCGGCAATGATGTTTACTGATTTGAAATTAGTAGACGAAA
ATAATTGTTTGATTGCAGAAAGTTTTTATCGAACGAATAATATTAATCCACAAGATAATCTGAAAAATAATAATC
TTCTCTGGCGTTCAACGGTATATGGCTGTACTTGCATCATGAATAAGAAACTTGTTGATATTGCATTGCCTATAC
CTACATATGCACATATGCATGATCAATGGTTGGCATTATTAGCGAAGCAATATGGTAACATTTTTTATTTCGACT
ATGCGTCTGTTCGTTATAGGCAACATTCTACAAATGTTGTTGGTGGTAGAAATAAAACGCCATTTCAAAAATTTA
ATTCCATACAAAAAAACCTAAAAAGGATTAATTTGCTAGTGGATAGAACTGTTGCTTTAATTAAATCAAATAACG
ATTTCTATCCAGGGAATAAAATGGAAAATAAAATTGATTACTTAAAATTTGGAGTGAATGAAGTATTACCTTATC
TTTTTAAAGGAAACAAGAAAGTTTTTTCACTTTGTGTATTAATTAGTTTGGCATTACAAAAATGATATATTTATT
ATTTTTTTTTGCACTGTTTATGATCTGTACGTTTTTAACACACAGGCGACAGGCATTATATGTTGTATCTGCGTT
AGTATTTCTTTTTTTGGCTTTAACCTATCCATCAGGAGGGGACTGGATAGGTTATTTTCTCCATTATGACTGCAT
GGTTAATGAGCAGTGTAATAATGGTTTTATAATGTTTGAACCTGGATATGAATTAATTGTTTCCTTATTTGGATA
TTTGGGATTTCAGACAATTATTATTTTTATAGCCGCTGTAAATGTAATTCTAATATTAAATTTTGCAAAGCATTT
TGAAAACGGAAGTTTTGTTATTGTTGCGATAATGTGCATGTTCCTTTGGAGTGTTTATGTTGAGGCGATTAGACA
GGCTCTGGCCTTATCTATAGTTATATTTGGGATTCATTCTCTTTTTTTGGGTAGAAAAAGGAAATTTATAACATT
AGTATTATTTGCGTCAACTTTCCATATAACTGCTTTGATTTGTTTTCTTCTAATGACTCCTCTATTTTCAAAGAA
ATTAAGCAAGATAATAAGTTATAGCCTATTAATTTTCAGTAGCTTCTTTTTCGCTTTTTCTGAAACCATATTAAG
TGCACTCCTTGCAATTTTGCCAGAAGGATCCATTGCCAGTGAAAAATTAAGTTTTTACTTAGCAACCGAGCAATA
CAGGCCACAGTTATCTATTGGGAGTGGCACTATTCTTGACATTATACTTATTTTTCTGATATGTGTAAGTTTTAA
ACGAATAAAGAAATATATGCTCGCTAATTATAATGCTGCAAATGAGATATTGCTTATTGGTTGCTGTCTTTATAT
TTCTTTCGGTATTTTTATCGGGAAAATGATGCCAGTTATGACTCGCATTGGTTGGTATGGTTTTCCATTTGTTAT
AGTACTTCTTTATATTAACTTGGGTTATTCAGAATATTTTAAGAGGTATATAAATAAAAGAGGGTGTGGGTATAG
CAAATTATTAATTGCTTTTTATTTTTTGCTACAAATTTTGCGACCATTAACATATGATTATAGCTATTATAATAT
AATGCACCAGGATACTTTGCTGAATAGGTTTGATGCATTAGATGATGCATCATTAAGACAATCAGCGAAGAGAAA
ATGTTTCGATTTGGGAAAGATAGGATATGGTTTCTTATGTAGTATATAATATCCTGCATTCATTCGGATAATTTC
CTATGGAAGTGTCCTTTGCTCTGTCTGTCCTCATTTGTTGAAATTTTATGTTAATAAGAAGCTTTAGATAACCAC
TTAGGAACTGTATGTTTGATCTGTCCAAAAATTATATTATTGTAAGTGCGACGGCGCTGGCTTCCGGAGGTGCAT
TAACTATATTAAAGCAATTTATAAAACATGCATCACAAAATTCAAATGACTATATTATGTTTGTATCTGCGGGAT
TGGAGTTGCCGGTCTGTGATAACATCATTTACATAGAAAACACACCAAAAGGATGGTTGAAAAGAATATATTGGG
ATTGGTTCGGTTGTCGGAAGTTTATCTCGGAACATAAGATTAACGTTAAGAAAGTAATTTCTCTACAAAATTCCA
GTTTGAATGTTCCTTACGAACAGATTATTTACTTGCACCAGCCAATTCCTTTTAGTAAAGTTGATTCTTTTTTAA
AAAATATCACATCCGATAACGTAAAGCTTTTTTTATATAAAAAGTTTTATTCCTATTTTATATTTAAATATGTGA
ATGCCAATACAACCATCGTAGTGCAAACGAATTGGATGAAAAAAGGAGTGCTGGAGCAATGTGATAAAATTAGTA
CCGAAAGGGTCCTTGTTATAAAACCTGATATCAAAGCATTTAATAATACTAATTTTGATGTAGATATGGATGTAT
CTGCAAAAACACTCTTATATCCAGCGACACCACTTACCTATAAAAATCATTTGGTCATTCTGAAGGCGTTGGTTA
TTTTAAAGAAAAAGTATTTTATAGATGATCTGAAATTCCAAGTGACTTTTGAAAAGAATAGGTACAAAAATTTTG
ATAAGTTTGTGCAATTAAATAACTTAAGCAAAAACGTTGATTATCTCGGCGTTCTTTCATACTCGAACTTGCAAA
AAAAATATATGGCGGCATCTTTAATCGTTTTTCCTAGCTATATCGAATCATATGGGTTACCACTCATCGAAGCTG
CTAGTTTAGGAAAAAAAATCATTAGTAGTGATCTTCCTTATGCCCGGGATGTTTTAAAGGATTATAGCGGCGTAG
ATTTTGTAATTTACAATAATGAAGATGGCTGGGCTAAGGCGTTGTTTAATGTTTTAAATGGCAATTCGAAGCTCA
ATTTTAGGCCTTATGAAAAAGATAGTCGTTCATCTTGGCCACAGTTCTTCTCTATTTTGAAATAAGGTGTATTAT
GTTTAATGGTAAAATATTGTTAATTACTGGTGGTACGGGGTCTTTCGGTAATGCTGTTCTAAGACGTTTTCTTGA
CACTGATATCAAAGAAATACGTATTTTTTCCCGGGATGAAAAAAAACAAGATGACATGAGGAAAAAATATAATAA
TCCGAAACTTAAGTTCTATATAGGTGATGTTCGCGACTATTCGAGTATCCTCAATGCTTCTCGAGGTGTTGATTT
TATTTATCATGCTGCAGCTCTGAAGCAAGTACCTTCCTGCGAATTCCACCCAATGGAAGCTGTAAAAACGAATGT
TTTAGGTACGGAAAACGTACTGGAAGCGGCAATAGCTAATGGAGTTAGGCGAATTGTATGTTTGAGTACAGATAA
AGCTGTATATCCTATCAATGCAATGGGTATTTCCAAAGCGATGATGGAAAAAGTAATGGTAGCAAAATCGCGCAA
TGTTGACTGCTCTAAAACGGTTATTTGCGGTACACGTTATGGCAATGTAATGGCATCTCGTGGTTCAGTTATCCC
ATTATTTGTCGATCTGATTAAATCAGGTAGACCAATGACGATAACAGACCCTAATATGACTCGTTTCATGATGAC
TCTCGAAGACGCTGTTGATTTGGTTCTTTACGCATTTGAACATGGCAATAATGGTGATATTTTTGTCCAAAAGGC
ACCTGCGGCTACCATCGAAACGTTGGCTATTGCACTCAAAGAATTACTTAATGTAAACCAACACCCTGTAAATAT
AATCGGCACCCGACACGGGGAAAAACTGTACGAAGCGTTATTGAGCCGAGAGGAAATGATTGCAGCGGAGGATAT
GGGTGATTATTATCGTGTTCCACCAGATCTCCGCGATTTGAACTATGGAAAATATGTGGAACATGGTGACCGTCG
TATCTCGGAAGTGGAAGATTATAACTCTCATAATACTGATAGGTTAGATGTTGAGGGAATGAAAAAATTACTGCT
AAAACTTCCTTTTATCCGGGCACTTCGGTCTGGTGAAGATTATGAGTTGGATTCATAATATGAAAATTTTAGTTA

CTGGCGCTGCAGGGTTTATCGGTCGAAATTTGGTATTCCGGCTTAAGGAAGCTGGATATAACGAACTCATTACGA
TAGATCGTAACTCTTCTTTGGCGGATTTAGAGCAGGGACTTAAGCAGGCAGATTTTATTTTTCACCTTGCTGGGG
TAAATCGTCCCGTGAAGGAGTGTGAATTTGAAGAGGGAAATAGTAATCTAACTCAACAGATTGTTGATATCCTGA
AAAAAAACAATAAAAATACTCCTATCATGCTGAGTTCTTCCATCCAGGCTGAATGTGATAACGCTTATGGAAAGA
GTAAAGCAGCTGCGGAAAAAATCATTCAGCAGTATGGGGAAACGACAAACGCTAAATATTATATTTATCGCTTGC
CGAATGTATTCGGTAAGTGGTGTCGACCAAATTATAACTCCTTTATAGCAACTTTCTGCCATCGCATTGCAAATG
ATGAAGCTATTACAATTAATGATCCTTCAGCAGTTGTAAATCTGGTGTATATAGATGACTTTTGTTCTGACATAT
TAAAGCTATTAGAAGGAGCGAACGAAACTGGTTACAGGACATTTGGTCCAATTTATTCTGTTACTGTTGGTGAAG
TGGCACAATTAATTTACCGGTTTAAAGAAAGTCGCCAAACATTAATCACCGAAGATGTAGGTAATGGATTTACAC
GTGCATTGTACTCAACATGGTTAAGTTACCTGTCTCCTGAACAGTTTGCGTATACGGTTCCTTCTTATAGTGATG
ACAGAGGGGTATTCTGTGAAGTATTGAAAACGAAAAACGCGGGCCAGTTTTCGTTCTTTACTGCGCATCCAGGAA
TTACTCGGGGTGGTCATTATCATCATTCCAAAAATGAGAAATTTATTGTCATCCGAGGAAGTGCTTGTTTCAAAT
TTGAAAATATTGTCACGAGTGAACGATATGAACTTAATGTTTCCTCTGATGATTTTAAAATTGTTGAAACAGTTC
CGGGATGGACGCATAACATTACTAATAATGGCTCGGATGAGCTAGTTGTTATGCTTTGGGCAAATGAAATATTTA
ATCGTTCTGAACCAGATACTATAGCGAGAGTTTTATCGTGAAAAAATTGAAAGTCATGTCGGTTGTTGGGACTCG
TCCAGAAATTATTCGACTCTCGCGTGTCCTTGCAAAATTAGATGAATATTGTGACCACCTTATTGTTCATACCGG
GCAAAACTACGATTATGAACTGAATGAAGTTTTTTTCAAAGATTTGGGTGTTCGCAAACCTGATTATTTTCTTAA
TGCCGCAGGTAAAAATGCAGCAGAGACTATTGGACAAGTTATCATTAAAGTTGATGAGGTCCTTGAACAGGAAAA
ACCAGAAGCCATGTTAGTACTTGGCGATACTAACTCCTGTATTTCAGCAATACCAGCAAAGCGTCGAAGAATTCC
GATCTTCCATATGGAGGCTGGGAATCGTTGTTTTGACCAACGCGTACCGGAAGAAACTAACAGAAAAATAGTTGA
TCATACCGCTGATATCAATATGACATATAGTGATATCGCGCGTGAATATCTTCTGGCTGAAGGTGTACCAGCCGA
TAGAATTATTAAAACCGGTAGCCCAATGTTTGAAGTACTCACTCATTATATGCCGCAGATTGATGGTTCCGATGT
ACTTTCTCGCCTGAATTTAACACCTGGGAATTTCTTTGTGGTAAGTGCCCACAGAGAAGAAAATGTTGATACCCC
TAAACAACTTGTGAAACTGGCGAATATACTTAATACCGTGGCTGAAAAATATGATGTCCCGGTAGTTGTTTCTAC
TCATCCTCGCACTCGTAACCGCATCAACGAAAACGGTATTCAATTCCATAAAAATATCTTGCTTCTTAAGCCATT
AGGATTTCACGATTACAACCATCTGCAAAAAAATGCACGTGCTGTTTTATCGGATAGTGGGACTATTACAGAAGA
GTCCTCCATTATGAACTTCCCTGCACTCAATATACGAGAAGCGCACGAACGCCCGGAAGGCTTCGAAGAAGGGGC
AGTAATGATGGTCGGTCTTGAATCTGATCGCGTTTTACAGGCATTAGAAATTATTGCAACACAGCCTCGTGGAGA
AGTACGCTTACTTCGTCAGGTTAGTGACTATAGCATGCCAAATGTTTCAGATAAAGTTCTGCGTATTATCCATTC
ATATACTGACTACGTTAAACGGGTTGTCTGGAAGCAATACTAATGAAACTTGCATTAATCATTGATGATTATTTG
CCCCATAGCACACGCGTTGGGGCTAAAATGTTTCATGAGTTAGGCCTTGAATTACTGAGCAGAGGCCATGATGTA
ACTGTAATTACGCCTGACATCTCATTACAAGCAATTTATTCTATTAGTATGATTGATGGTATAAAGGTTTGGCGT
TTCAAAAGTGGACCTTTAAAGGATGTAGGTAAGGCTAAACGTGCCATAAATGAAACTCTTTTATCTTTTCGCGCA
TGGCGCGCATTTAAGCACCTCATTCAACATGATACATTTGATGGTATCGTTTATTATTCCCCCTCTATTTTTTGG
GGCGACTTGGTTAAAAAAATAAAACAACGATGCCAGTGCCCAAGCTATCTGATCCTAAGGGATATGTTTCCACAG
TGGGTCATTGATGCAGGTATGTTGAAAGCCGGTTCACCAATTGAAAAATATTTTAGGTATTTTGAAAAAAAGTCA
TATCAGCAGGCTGGCCGGATAGGGGTAATGTCTGATAAGAATCTTGAGATATTTCGCCAGACCAATAAAGGTTAT
CCGTGTGAAGTTTTACGTAATTGGGCCTCAATGACTCCTGTGTCTGCCAGCGATGATTATCATTCACTTCGTCAA
AAATACGATCTAAAAGATAAAGTCATTTTTTTCTATGGCGGTAATATTGGGCATGCTCAGGATATGGCAAACTTA
ATGCGCCTTGCGCGTAATATGATGCGTTATCATGATGCTCATTTCCTGTTTATAGGGCAGGGTGATGAAGTTGAG
CTGATAAAATCTCTTGCTGCAGAATGGAATTTAACTAATTTCACTCATCTACCTTCAGTGAACCAGGAAGAGTTT
AAATTAATTTTATCTGAAGTTGATGTCGGCCTGTTCTCCCTTTCATCTCGCCATTCTTCACATAATTTCCCCGGA
AAATTACTAGGGTATATGGTTCAATCAATCCCGATCCTTGGGAGTGTGAATGGCGGCAATGATTTAATGGATGTA
ATTAATAAGCACAGAGCCGGTTTCATTCATGTTAATGGTGAAGATGATAAACTGTTTGAATCTGCACAATTGCTT
CTTAGTGATTCAGTTTTAAGAAAACAGCTAGGTCAGAACGCTAATGTGTTGTTAAAGTCTCAATTTTCGGTTGAA
TCGGCGGCACATACTATCGAAGTCCGACTGGAGGCTGGAGAATGCGTTTAGTTGATGACAATATTCTGGATGAAC
TTTTTCGCACTGCAGCAAATTCTGAACGTTTGCGCGCTCATTATTTATTGCACGCATCTCATCAGGAGAAGGTTC
AACGTTTACTTATTGCATTTGTACGCGACAGCTATGTTGAACCCCATTGGCATGAGTTACCGCATCAGTGGGAAA
TGTTTGTCGTCATGCAAGGGCAATTAGAAGTTTGTTTGTATGAGCAAAATGGTGAGATCCAAAAACAGTTTGTTG
TTGGAGACGGTACGGGAATAAGCGTCGTGGAATTTTCCCCAGGAGATATACATAGTGTCAAATGCCTGTCACCAA
AAGCCCTTATGTTGGAGATAAAGGAGGGGCCATTTGACCCACTCAAAGCTAAGGCTTTTTCTAAGTGGTTATAGG
GCGATACACCACCGTTTATTCTTCTATCTTATTCTATACATGCTGGGTTACCATCTTAGCTTCTTCAAGCCGCGC
AACCCCGCGGTGACCACCCCTGACAGGAGTAGCTAGCATTTGACCACCCCTGACAGGATTAGCTAGCATATGAGC
TCGAGGATATCTACTGTGGGTACCCGGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGA
ATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATAT

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

MKKIWLALAG LVLAFSASA

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

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCGATACCC
AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAA
GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA
CTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG
AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCA
TTTGTCGTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATG
ATTGCACGTTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCC
GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGAT
CAGCCGCAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTCGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAACTG
GAACGTACTCAGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCC
GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG
TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA
TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAA
TCTTCCTGCCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA
GGATTTTCCTTGTTTCCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA
ACGCTCGTCACATCATAGGCATGCATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC
CTCTATTAATCAAACTGAGAGCCGCTTATTTCACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGCTAGCGTG
AAGATACTTGTTACTAGGGGCGCAGGATTTATTGGTTCTGCTGTAGTTCGTCACATTATAAATAATACGCAGGAT
AGTGTTGTTAATGTCGATAAATTAACGTACGCCGGAAACCTGGAATCACTTGCTGATGTTTCTGACTCTGAACGC
TATGTTTTTGAACATGCGGATATTTGCGATGCTGCTGCAATGGCGCGGATTTTTGCTCAGCATCAGCCGGATGCA
GTGATGCACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTGGATCGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATT
GTTGGTACTTATGTCCTTTTGGAAGCGGCTCGCAATTACTGGTCTGCTCTTGATGGCGACAAGAAAAATAGCTTC
CGTTTTCATCATATTTCTACTGACGAAGTCTATGGTGATTTGCCTCATCCTGACGAAGTAAATAATAAAGAACAA
TTACCCCTCTTTACTGAGACGACAGCTTACGCGCCTAGTAGTCCTTATTCCGCATCAAAGCATCCAGCGATCAT
TTAGTCCGCGCGTGGAAACGTACCTATGGTTTACCGACTATTGTGACTAACTGTTCGAATAACTACGGTCCTTAT
CACTTTCCGGAAAAATTGATTCCACTAGTAATTCTTAATGCTCTGGAAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAAA
GGGGATCAAATTCGTGACTGGCTGTATGTTGAAGATCATGCGCGTGCGTTATATACCGTAGTTACTGAAGGTCAA
GCGGGTGAAACCTATAACATTGGCGGACACAACGAAAAGAAAAACATCGATGTTGTGCTGACTATTTGTGATTTG
TTGGACGAGATAGTCCCGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAAATTACTTATGTTGCTGATCGCCCAGGGCATGAT
CGCCGTTATGCGATTGATGCTGAGAAGATTGGTCGCGAATTGGGATGGAAACCACAGGAAACGTTTGAGAGTGGG
ATTCGTAAAACGGTGGAATGGTATTTGGCTAATGCAAAATGGGTTGATAATGTGAAAAGTGGTGCCTATCAATCG
TGGATTGAACAGAACTATGAGGGCCGCCAGTAATGAATATCCTCCTTTTTGGCAAAACAGGGCAGGTAGGTTGGG
AACTACAGCGTGCTCTGGCACCTCTGGGTAATTTGATTGCTCTTGATGTTCACTCCACTGATTACTGTGGTGATT
TTAGTAACCCTGAAGGTGTGGCTGAAACAGTCAAAAGAATTCGACCTGATGTTATTGTTAATGCTGCGGCTCACA
CCGCAGTAGATAAGGCTGAGTCAGAACCCGAATTTGCACAATTACTCAATGCGACTAGCGTTGAATCAATTGCAA
AAGCGGCAAATGAAGTTGGGGCTTGGGTAATTCATTACTCAACTGACTACGTATTCCCTGGAAATGGCGACACGC
CATGGCTGGAGATGGATGCAACCGCACCGCTAAATGTTTACGGTGAAACCAAGTTAGCTGGAGAAAAAGCATTAC
AAGAGCATTGTGCGAAGCACCTAATTTTCCGTACCAGCTGGGTCTATGCAGGTAAAGGAAATAATTTCGCCAAAA
CGATGTTGCGTCTGGCAAAAGAGCGTGAAGAACTAGCCGTTATTAATGATCAGTTTGGTGCGCCAACAGGTGCTG
AACTGCTGGCTGATTGTACGGCACATGCCATTCGTGTCGCACTGAATAAACCGGATGTCGCAGGCTTGTACCATT
TGGTAGCCAGTGGTACCACAACCTGGTACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAATGCAGGCATTC
CTCTTGCACTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAACAACTGCCTATCCTACACCAGCTCGTCGTCCACATAACTCTC
GCCTTAATACAGAAAAATTTCAGCAGAATTTTGCGCTTGTATTGCCTGACTGGCAGGTTGGTGTGAAACGCATGC
TCAACGAATTATTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTGATGGTGGAGCAAGATGAATTA
AAAGGAATGATGAAATGAAAACGCGTAAAGGTATTATTTTAGCGGGTGGTTCTGGTACTCGTCTTTATCCTGTGA
CTATGGTCGTCAGTAAACAGCTATTACCTATATATGATAAACCGATGATCTATTATCCGCTTTCTACACTGATGT
TAGCGGGTATTCGCGATATTCTGATTATTAGTACGCCACAGGATACTCCTCGTTTTCAACAACTGCTGGGTGACG
GTAGCCAGTGGGGCCTGAATCTTCAGTACAAAGTGCAACCGAGTCCGGATGGTCTTGCGCAGGCATTTATTATCG
GTGAAGAGTTTATTGGTGGTGATGATTGTGCTTTGGTACTTGGTGATAATATCTTCTACGGTCACGACCTGCCTA
AGTTAATGGATGCCGCTGTTAACAAAGAAAGTGGTGCAACGGTATTTGCCTATCACGTTAATGATCCTGAACGCT
ATGGTGTCGTTGAGTTTGATAAAAACGGTACGGCGATCAGCCTGGAAGAAAAACCGCTACAACCAAAAAGTAATT
ATGCGGTAACCGGGCTTTATTTTTATGATAACGACGTTGTCGAAATGGCGAAAAATCTTAAGCCTTCTGCCCGCG
GTGAACTGGAAATTACCGATATTAACCGTATCTATATGGAACAAGGGCGTTTATCTGTTGCCATGATGGGGCGTG
GTTATGCGTGGTTAGACACGGGGACACATCAGAGCCTGATTGAGGCAAGCAACTTTATTGCAACAATTGAAGAGC
GTCAGGGGCTGAAAGTTTCCTGCCCGGAAGAAATTGCTTACCGTAAAGGGTTTGTTGATGCTGAGCAGGTGAAAG
TATTAGCTGAACCTCTGAAAAAAAATGCTTATGGTCAGTATCTGCTGAAAATGATTAAAGGTTATTAATAAAATG

AACGTAATTAAAACAGAAATTCCTGATGTACTGATTTTTGAACCGAAAGTTTTTGGTGATGAGCGTGGTTTCTTT
TTTGAGAGCTTTAACCAGAAGGTTTTTGAGGAAGCTGTAGGCCGCAAAGTTGAATTTGTTCAGGATAACCATTCG
AAGTCTAGTAAAGGTGTTTTACGCGGGCTGCATTATCAGTTGGAACCTTATGCACAAGGAAAATTGGTGCGTTGC
GTTGTCGGTGAAGTTTTTGACGTAGCTGTTGATATTCGTAAATCGTCATCGACTTTTGGCAAATGGGTTGGGGTG
AATTTATCTGCTGAGAATAAGCGGCAATTGTGGATTCCTGAGGGATTTGCACATGGTTTTTTAGTGCTGAGTGAG
ACGGCGGAGTTTTTGTATAAGACGACAAATTATTATCATCCTCAGAGTGATAGAGGAATAAAATGGGATGATCCA
AGCATCAATATTTCATGGCCAGTCGATTCACAAGTGCTGCTATCAGCTAAAGATAATAAGCATCCTCCATTAACA
AAGATTGAAATGTATAGTTAAGATCACGATAAATCTTGGAAGGGTTGCAAAATTGAATAAAATAGTGAGCAAAAG
TGAAATAAGGAACGTAATCCACAATGCTGGCTATATGATGATTACTCAGATAGCTTTATATGTTGCACCATTATT
TATACTGAGTTATCTGTTAAAAACACTGGGGGTTGCACAGTTTGGTAATTATGCCTTAATACTATCAATCGTTGC
ATATTTACAGATTATAACGGATTATGGTTTTTCTTTTAGTGCAAGTCGTGCGATCTCACAGAATAGAGAGGACAA
AGAATATATATCAAAAATTTATCTGTCAACTATGACTATCAAGTTGGCGATATGCGCTTTCTTATTCTTATTGCT
CATGCTATTTTTAAATCTTTTGCCTGTGCAAGCTGAATTAAAACAAGGAATATTATATGGATATCTTCTTGTAAT
AGGAAATACTTTCCAACCACAATGGTTTTTCCAAGGTATCGAAAAATTAAAAATCATAGCCCTTTCTAATGTTAT
ATCAAGATGCGCCGCGTGTTTACTTGTATTTATCTATGTGAGGAATAGCGAGGATTTACAAAAAGCACTTTTAGT
ACAGTCACTTCCATTAGTAATTTCTGCGATTGGATTAAATATATTTATATTGAAATATATCAATATTATTTTTCC
GGAAAAAAAATTATTTAAGGTAATTTTAAAAGAAGGTAAGGATTTTTTTCTTGCATCACTTTATTCTGTTATTCT
CAATAATAGTGGCATTTTTCTATTAGGGATTTTTACTAATCCTGTTATTGTTGGTGTATATGCCGCCGCTGAAAA
GATAGTCAAGGCCGTATTGTCGCTATTTACACCACTGACGCAAGCTATATATCCTTATAATTGTCGTAAGTTTTC
ACTATCCGTATTTGACGGCATTGAGGCAGCAAAAAAAACTGGTATACCAATTATAATTTTAGCATTTATAGCTGC
TGTTATCGTTGCAATTACCTTACCTGTTGCAATCGACTATCTTAATTTTCCAAAAGAAACAATTTTTGTAGGTCA
AATATTAAGTGCATGGATCTTTTTTGGTGTTCTTAATAATGTATTCGGCATTCAGATATTGAGTGCATCAGGAAG
AAGTAAAATATATAGTAGGATGGTATTCGTATCAGCGCTTATAACATTACTTTTGATTACTCTATTATTGCAGTT
TTGTAACGCCACTGGAGTGGCATGTGCAATATTATTGGGTGAAATGTTCTTATCAATATTGTTACTTAAGCGATA
TAAAAAAATAATTTAAGGAATAGTTATGAAGAAGTTATTATTAGTGTTCGGTACTAGGCCTGAAGCAATAAAGAT
GGCCTCTATCATTGAATTATTAAAAAAAGATTGTAGATTCGAATATAAAATATGTGTGACAGGCCAACATAAAGA
GATGCTTGATCAAGTTATGCAAGTATTTGATGTTAAACCTGATTATAATTTACGGATTATGCAGCCTGGGCAAAC
ATTAGTATCTATAGCAACAAATATACTCTCACGGTTAAGTGAAGTTTTAATTATAGAAAAGCCAGATATTATACT
TGTGCATGGGGATACAACGACTACCCTTGCTGCTACTTTAGCTGGGTATTACCACCAAATAAAAGTTTGTCATGT
GGAAGCAGGATTAAGAACAGGGGATATTTACTCTCCTTGGCCTGAAGAGGGCAATCGTAAAGTTACAGGGGCATT
AGCATGTATTCATTTCGCCCCAACAGAGAGATCAAAAGATAATCTCCTGAGGGAGGGGGTCAAAGTAAATAATAT
ATTTGTAACGGGTAATACCGTCATCGACTCTTTATTTATTGCAAAAGATATCATAGATAATGACCCTAATATAAA
GAACGCTTTACATAATAAATTTAATTTTCTTGATAAAAGCCGACGAGTAGTACTTATAACAGGTCATCGAAGAGA
AAATTTCGGGAAAGGTTTTGAAGATATATGCTTTGCAATAAAGGAATTAGCTTTCATTTATCCTAATGTAGATTT
TATTTATCCGGTGCATCTTAATCCCAATGTAATGGAACCAGTACATCGTATATTAGATAATATATGTAATATTTA
CCTTATTGAGCCCTTGGATTATTTGCCTTTTGTTTATTTAATGAATGAGTCATATTTAATATTGACTGATTCAGG
GGGGATACAAGAAGAAGCGCCTTCGTTAGGTAAACCGGTTTTGGTTATGCGTGATACTACTGAACGCCCTGAGGC
GGTTGAGGCTGGTACTGTTGTATTAGTGGGGACTTCTAAGATAAAAATAGTAAATAAAGTAACGGAGCTATTAAA
CAATGCTGATATCTACAATGCTATGTCTCTGTTACATAATCCATATGGCGATGGAACAGCTGCTCAAAAAATTCT
TAATGTGCTCGCCCAAGAGCTAATTTAATTTAAGCTAAAAATATGTTATTAATTATTGCTGATTATCCAAACGAA
ATGAATATGCGCGAGGGAGCTATGCAACGAATAGATGCGATAGACTCTCTCATTCGAGATCGCAAGCGAGTGTAT
TTGAATATTTCATTCAAAAAGCATCTAGTTCGCTCAAATAGTTCCTTTAATAATGTTATAGTTGAAAATCTAAAT
GCAATTATTCACAGAAACATCATAAAACAGTACATGCAAAAATCAACAACTATATATGTTCATTCTGTTTATAAT
TTATTAAAGGTTATAACGCTCATTGATCTAAAAAAAAACAATTCTTGATATACATGGTGTTGTACCGGAAGAACTT
TTGGCAGATAATAAAAAATTACTTAGTAAAGTATATAACATGGTGGAAAAAAAAGGTGTCCTTGGATGCAAAAAA
TTAATACACGTCAGTACAGAAATGCAAAAACACTATGAAGCAAAATATGGAGTAAACTTGGCTGAAAGGTCAATA
GTGCTCCCGATTTTTGAATATAAAAATATAACCCAATCGCAAAACAAATGGACAGAAAATAAAATACGAAGTATC
TATCTTGGAGGATTACAAACATGGCAAAATATTGATAAAATGATTCAAGTTTGTGATGACACAGTGATAAACAAT
GAAGCAGGTAAGTATGAATTCAACTTTTTCATCCCACAGAGTAACTTGGAAGGGTTTATAGATAAATATTCGTTA
AAATTACATAATATCAATGCTAATGCATCTACGCTATCACGTGATGAAGTAATTCCCTTTCTAAAAGAATGTCAT
ATTGGTTTTGTATTGCGCGATGATATAATAGTAAACAGAGTTGCGTGCCCTACAAAATTGGTTGAATATTTAGAG
TGTGGTGTCGTTCCAGTTGTGCTCTCCCCACTTATAGGTGATTTTTATTCGATGGGATATCAATACATTACTACA
GAGGAAATGGCTAACAGAAGTATAAGTTTGTTGGATCTTGAAAAAATGGCTGCACATAATTTACAAATTTTGACT
TCTTATCAGAAGAGAACCTACAAGGCACAGAAAGAACTTATTGCTCAACTGTGCTGAATTTTTTACATATATAAA
ATTATGTAAGCATATCGCGGGTCAGGTAATTGTATGCGTATCAAATATAAAGATAACGGTTATATATTATGTTTT
CTATTATGTTTCATTTTGAGCTACTTAGTTTTACTCAAATCTGACTACTTTCCTGCTGATTTTCTGCCATATACA
GAAATATACGATGGGACATACGGAGAAATCAATAATATTGAGCCTGCCTTTTTATATTTAACACGGTTGTTTCAT
TATTTAAATTTCCCCTATATATATTTTTTGCAATGTTAGTTTGTGCCTTATGTTTAAGTTGGAAAATAAAATATGCA
AGAAAAATAATTAAAGATAGTTATATATATTTGTTCTTGTATGTATATGTATCATTTTATGTGTTTTTGCATGAA
ATGACTCAATTGCGCATAGCAATTGCAGTCACTATGTGCTATGTGTCGGTTTATTATTACTTTTATAAAAATTGT

ATTAAACATGCACTGCCATGGATGGTGTTGGCTATTTTGTTTCATTACAGCGCCTTGCTTTTATTTATGTCATTA
TTTATATACAGTTATAGGAGGTTATTAATAGTAATTATAGGGTTTGTAATATGTATGAGCTTTTTAAACGTGTAT
GCAGATACAATTGCACTATATTTGCCAAATGAAAAAATAGTAAATTATTTATATAGTATTTCATCATCATTAGAC
AATAGAAATGATTTGGCAATATTCAACCTGAATAATATAATATTTTTATCAATATTTATTTTGATCTTTTATCTT
AGCCGATATATAAAATTAAATGATAATGAGGCGAAGTTTATTAAGTATGTGCAATGTTCAGGAATATTAGCCTTT
TGTATTTTCTTTCTGGCTAGTGGAGTCCCGGTCATTGCTTATCGAACTGCAGAGTTGCTGCGAATATTTTATCCG
ATGGCTTTAGTATTAATCCTTTCGCATATAAAAAATAATAATATGCGTTATTTTATTGCAGTCATTATAGTTATC
CTTTCAGGCTTAATGTTGTTTATAACACTAAGGGCTGTATCAATAGTTGGTCAAGGATTATAAAATGAATGTTGC
TATTTTGTTGTCTACGTATAATGGCGAAAAATATTTAGAGGAACAACTGGATTCATTGCTGCTTCAAAGTTATCA
GGATTTTGTAGTGTATATCCGTGATGACGGATCATCTGATAGAACTGTAAATATAATAAACCAATACGTAATGAA
AGATAACAGATTTATTAACGTGGGTAATTCAGAAAATCTTGGTTGTGCTGCTTCGTTTATTAATTTATTAAGAAA
TGCTTCAGCCGATATTTATATGTTTTGTGACCAAGATGATTATTGGCTTCCGAATAAATTACAGCGTGCTGTGGA
TTATTTTTCGGCTATTGATCCTTTACAACCTACCTTGTATCATTGCGATCTAAGCGTTGTTGATGAAAAACTTAA
TATTATACAAAATTCATTTTTGCAGCATCAGAAAATGTCAGCGTATGATTCAATGAGAAAAAATAATCTTTTCAT
ACAAAATTTTGTTGTTGGTTGTTCATGTGCTGTTAATGCTTCACTTGCGGAATTTGTTCTTTCGCGAATTGGAGA
GCAGCATGTAAAAATGATAGCTATGCATGACTGGTGGTTAGCCGTGACTGCAAAACTTTTTGGTCGAATCCATTT
TGATAATACTCAAACGATTCTTTATCGACAACATCAGGGCAATGTATTAGGTGCAAAATCATCAGGTATGATGCG
TTTTATTCGATTAGGATTAAATGGGCAAGGGATTTCGCGAGTAGTATCTTTTAGAAAAAAAGTTTGTGCGCAAAA
TAAGCTTCTTTTAGATGTCTATGATAAAGATTTAAATCTTGAGCAAAAAAAATCTATCAGGCTTGTAATTGAGGG
CCTTAAAGAGAACTCTTCAATTGCTGACCTTTTAAAATGTTTCTATCATGGTAGCTATATGCAAGGTTTTAAACG
TAATCTTGCCTTAATATATTCAGTTCTTTACACAAAAAAAAGAAGATAGTGTATCCTTATGAAAAAAATTGCTAT
TATCGGTACTGTTGGCATACCAGCATCATATGGCGGATTTGAAACATTAGTTGAAAATTTAACAAGATACAATTC
CTCGGGAGTTGAATATAATGTTTTTTGTTCATCGTTTCACTACAAATCCCACCAAAAAAAACATAATGGGGCCCG
TTTAATTTATATTCCGCTTAAAGCCAATGGATGGCAGAGCATTGCGTATGACATAATTTCGTTAGCATATTCTAT
TTTTTTGAAGCCTGATGTGATTCTGATTTTAGGGGTTTCTGGTTGTTCATTTTTGCCTTTCTTCAAACTCTTAAC
ACGCGCTAAGTTTATTACTAATATTGATGGCCTGGAATGGCGAAGAGATAAATGGAATTCAAAAGTGAAACGTTT
CTTAAAATTTTCAGAAAAAATCGCAGTTCAATATTCGGATGTCGTTATTACGGATAATGAGGCAATTTCTGAGTA
CGTTTTTAACGAGTATAATAAAGATAGCCGAGTTATTGCCTATGGAGGGGATCATGCATGGTTAAATACTGAGGA
TGTATTTACAACAAGAAATTATAAAAGCGATTACTACCTTTCTGTATGTCGTATCGAACCCGAAAACAATGTAGA
ATTAATTTTAAAAACATTTTCAAAGCTAAAATATAAAATAAAATTTATTGGAAATTGGAATGGCAGCGAGTTTGG
AAAGAAACTTAGGCTGCATTATTCTAACTATCCAAATATTGAAATGATTGATCCGATTTATGATCTTCAACAATT
ATTTCACTTACGAAATAATTGCATAGGATATATACATGGTCATTCGGCTGGAGGAACAAACCCTTCTTTAGTCGA
GGCAATGCATTTTAGTAAACCTATATTTGCATATGATTGTAAGTTTAATAGGTACACTACTGAAAATGAAGCATG
TTATTTTTCTAATGAATCTGACCTCGCAGAGAAAATCATAATGCATTGTGAGCTATCATTAGGTGTCTCTGGCAC
GAAAATGAAAGAAATTGCTAACCAGAAATACACTTGGAGACGAATAGCAGAAATGTATGAGGATTGCTATTAACT
CTGTTAAACTTCAAATCTTTTACAATATATGGCATGACTATAAGCGCATTAATTGTTTTTCAAGCCGCTCTCGCG
GTGACCACCCCCTGACAGGGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAA
CTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATA
CTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTCCAGGCCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGAC
AGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCGCTCAACA
TCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGAAGTGATTGCCGAAAATC
CAGGCAAGAAACTGGTTCCTTACTATACGGTGAAAGAGTTTGTCGAATCTCTGGAAACGCCTCGTCGCATCCTGT
TAATGGTGAAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCA
TCATTGATGGTGGTAACACCTTCTTCCAGGACACTATTCGTCGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTTAACT
TCATCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAG
AAGCCTATGAATTGGTAGCACCGATCCTGACCAAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCT
ATATTGGTGCCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGA
TTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGT
GGAATAACGGTGAACTGAGCAGTTACCTGATCGACATCACCAAAGATATCTTCACCAAAAAAGATGAAGACGGTA
ACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACCGGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGG
ATCTCGGCGAACCGCTGTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTTTGCACGTTATATCTCTTCTCTGAAAGATCAGCGTG
TTGCCGCATCTAAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTC
GTCGTGCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGCTGCGTCTGAAGAGT
ACAACTGGGATCTGAACTACGGCGAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCTGC
AGAAAATCACCGATGCTTATGCCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAATTG
CCGATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGATGTCGTTGCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCCGGTTCCGACCTTCT
CCGCAGCGGTTGCCTATTACGACAGCTACCGTGCTGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTGACT
ATTTGGTGCGCATACTTATAAGCGTATCGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

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

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCGATACCC
AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAA
GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA
CTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG
AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCA
TTTGTCGTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATG
ATTGCACGTTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCC
GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGAT
CAGCCGCAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTCGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAACTG
GAACGTACTCAGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCC
GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG
TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA
TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAA
TCTTCCTGCCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA
GGATTTTCCTTGTTTCCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA
ACGCTCGTCACATCATAGGCATGCATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC
CTCTATTAATCAAACTGAGAGCCGCTTATTTCACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGTGAAAATA
CTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTGGTTCAGCTGTAGTTCGTCACATTATAAATAATACGCAGGATAGTGTT
GTTAATGTCGATAAATTAACGTACGCCGGAAACCGGGAATCACTTGCTGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATGTT
TTTGAACATGCGGATATTTGCGATGCACCTGCAATGGCACGGATTTTTGCTCAGCATCAGCCGGATGCAGTGATG
CACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTTGGT
ACTTATGTCCTTTTGGAAGCCGCTCGCAATTACTGGTCTGCTCTTGATAGCGACAAGAAAAATAGCTTCCGTTTT
CATCATATTTCTACTGACGAAGTCTATGGTGATTTGCCTCATCCAGATGAAGTAAATAATACAGAAGAATTACCC
TTATTTACTGAGACGACAGCTTACGCGCCAAGCAGCCCTTATTCCGCATCCAAAGCATCCAGCGATCATTTAGTC
CGCGCATGGAAACGTACGTATGGTTTACCGACCATTGTGACTAATTGCTCGAACAACTATGGTCCGTATCACTTC
CCGGAAAAGCTTATTCCATTGGTTATTCTTAATGCACTGGAAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAAAGGGGAT
CAAATTCGCGACTGGTTGTATGTAGAGGATCATGCTCGTGCGTTATATACCGTCGTAACCGAAGGTAAAGCGGGT
GAAACTTATAACATTGGCGGACACAACGAAAAGAAAAACATCGATGTTGTGCTGACTATTTGTGATTTGTTGGAT
GAGATTGTACCGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAAATTACTTATGTTGCTGATCGCCCAGGGCATGATCGCCGT
TATGCAATTGATGCCGATAAAATTAGCCGCGAATTGGGCTGGAAACCACAGGAAACGTTTGAGAGCGGGATTCGC
AAAACGGTGGAATGGTATCTGGCTAATACAAATTGGGTTGAGAATGTGAAAAGCGGTGCTTATCAGTCATGGATC
GAACAAAACTATGAGGGCCGTCAGTAATGAATATCCTGCTTTTCGGCAAAACAGGGCAGGTGGGTTGGGAACTGC
AGCGTGCTCTGGCGCCGCTGGGTAATCTGATCGCTCTTGATGTTCACTCCACTAATTATTGTGGAGATTTCAGCA
ACCCCGAAGGTGTGGCAGAAACCGTCAAAAAAATTCGTCCTGACGTTATTGTTAATGCTGCTGCTCACACTGCAG
TAGATAAAGCAGAATCAGAACCGGATTTCGCACAATTACTTAACGCGACAAGCGTCGAAGCGATTGCAAAAGCTG
CTAATGAAGTCGGGGCCTGGGTTATACACTACTCTACTGATTATGTTTTCCCAGGCAGTGGTGACGCGCCATGGC
TGGAAACGGATGCAACAGCACCGCTAAATGTTTACGGTGAAACAAAATTAGCTGGGGAAAAGGCATTACAAGAAC
ATTGCGCAAAGCATCTTATTTTCCGTACCAGCTGGGTATACGCTGGTAAAGGAAATAACTTTGCTAAAACGATGT
TGCGTTTGGCAAAAGAACGCGAAGAACTGGCTGTGATAAACGATCAGTTTGGCGCACCAACAGGTGCTGAATTGC
TGGCTGATTGCACCGCTCATGCCATTCGCGTGGCATTAAAAAAACCAGAAGTCGCTGGCTTGTACCATCTGGTAG
CAAGTGGCACAACAACCTGGCACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGGATTAATCTTG
CACTTAACAAACTTAACGCCGTGCCAACAACGGCCTATCCCACACCAGCCCGTCGACCCCATAACTCTCGCCTCA
ATACAGAAAAGTTTCAGCAGAACTTTGCGCTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTGGGCGTGAAACGTATGCTCAACG
AATTATTTACGACTACGGCAATTTAACAAATTTTTGCATCTCGCTCATGATGCCAGAGCGGGATGAATTAAAAGG
AATGGTGAAATGAAAACGCGTAAAGGTATTATTCTGGCTGGTGGTTCCGGCACTCGTCTTTATCCTGTGACGATG
GCAGTGAGTAAACAATTGCTGCCGATTTATGATAAGCCGATGATTTATTATCCGCTTTCAACGCTTATGTTAGCG
GGTATTCGCGATATTCTTATTATTAGTACGCCACAGGATACACCGCGTTTCCAACAATTATTGGGGGACGGGAGC
CAGTGGGGTCTTAATCTACAGTATAAAGTACAACCGAGTCCGGATGGCCTGGCGCAAGCGTTTATTATTGGCGAA
GACTTTATTGGTGGTGATGATTGTGCACTCGTACTTGGCGATAATATCTTCTATGGACACGACTTGCCGAAATTG
ATGGAAGCTGCTGTTAACAAAGAAAGCGGTGCAACGGTATTTGCTTATCACGTTAATGATCCTGAACGCTATGGT
GTCGTGGAGTTTGATAATAACGGTACGGCAATTAGCCTGGAAGAAAAACCGCTGGAGCCAAAAAGCAACTATGCG
GTTACTGGGCTTTATTTCTATGACAATGACGTTGTGGAAATGGCTAAAAACCTTAAGCCTTCTGCCCGTGGCGAA
CTGGAAATTACCGATATTAACCGTATTTATATGGAACAAGGACGTTTGTCTGTAGCCATGATGGGGCGTGGCTAT
GCATGGTTGGATACAGGGACGCATCAAAGCCTTATTGAAGCAAGTAACTTCATTGCAACAATTGAAGAGCGTCAG
GGATTAAAGGTATCTTGCCCGGAAGAGATTGCTTACCGTAAAGGGTTTATTGATGCCGAGCAGGTGAAAGTATTA
GCCGAACCGCTTATCAAGAATCAATATGGTCAATATTTGCTGAAAATGATCAGCGAATAGTATATGGGAACTCAA

TGATGGATATTAAATTAATCTCTTTGCAAAAACATGGGGATGAGCGCGGTGCATTAATTGCTCTTGAAGAGCAAC
GAAATATACCTTTCGAAGTCAAAAGAATATATTACATACTTGAGACTCTTAATGGAGTAAGACGCGGATTTCATG
CGCACAAGGTTACTCGTCAGTTAGCTATTGTAGTCAAGGGAGCTTGTAAATTTCATCTGGATAATGGTAAAGAAA
CAAAGCAGGTGGAACTTAATGATCCAACAATTGCGTTGCTGATAGAACCCTATATATGGCATGAAATGTATGATT
TTAGTGATGATTGTGTGCTGCTTGTAATTGCGGATGATTTCTATAAAGAGTCTGATTATATCCGCAATTATGATG
ATTTTATTAGAAGAGTAAATTCAATTGAGAATTCATAAGCTAAGTGACGTCCAGACAACATCAATTGGTGATGGA
ACAACTATCTGGCAGTTTGTTGTGATACTAAAAGGTGCTGTAATTGGTAATAATTGCAACATCTGTGCAAATACC
TTAATTGAAAATAACGTTGTAATTGGTAACAATGTCACAGTCAAAAGCGGTGTGTATATTTGGGATGGCGTTAAA
ATAGAGGATAATGTTTTTATTGGTCCTTGTGTAGCATTTACAAATGATAAGTATCCTCGCTCTAAAGTCTATCCT
GATGAATTTTTGCAAACAATAATACGCAAAGGAGCATCAATAGGTGCTAACGCAACCATCCTGCCAGGAATTGAA
ATTGGTGAAAAAGCAATCGTTGGTGCGGGGAGTGTTGTAACCAAAAATGTACCGCCATGCGCAATAGTAGTAGGT
AATCCAGCTCGATTTATTAAATGGGTAGAGGATAATGAATAAAATTGATTTTTTAGATCTTTTTGCAATTAACCA
GCGACAGCACAAAGAATTAGTCTCTGCGTTTAGTAGGGTGCTAGATTCTGGTTGGTATATCATGGGCGAAGAACT
TGAGCAGTTCGAGAAAGAGTTCGCAGAATACTGTGGAGTTAAGTATTGCATTGGTGTAGCAAATGGCCTTGATGC
GTTGATACTAGTATTGAGGGCATGGAAAGAACTTGGCTATCTTGAAGACGGTGACGAGGTATTAGTACCGGCAAA
TACATATATTGCTTCTATTCTTGCTATAACAGAGAACAAACTTGTTCCTGTTCTTGTTGAACCAGATATAGAAAC
TTATAATATTAATCCTGCTTTAATTGAAAATTACATTACGGAAAAAACTAAAGCAATATTACCGGTTCACTTATA
TGGTCTATTGTGCAATATGCCAGAAATTAGTGCAATCGCCAGAAAATATAATCTGTTGATTCTTGAAGATTGTGC
ACAAGCACATGGTGCAATACGTGATGGTCGCAAAGCTGGAGCTTGGGGGGATGCTGCAGGATTTAGTTTTTATCC
AGGAAAAAACCTTGGAGCTTTGGGGGATGCGGGAGCTGTTACTACAAATAATGCAGAATTATCCTCAACTATAAA
AGCTTTGCGAAATTATGGGTCACATAAGAAATATGAAAATATTTATCAGGGATTGAATAGTCGATTGGATGAACT
GCAAGCAGCCTTATTGCGTGTAAAAATCCATACATTACCGGAAGATACTGCGATTCGGCAAAGGATTGCTGAAAA
ATATATTCGTGAAATAAAAAACCCTGCGATTACGTTACCAGTGTACGAAGGCCAAGGTGCGCATGTTTGGCATTT
ATTTGTAGTAAGAATCGCTAATCGTGAAAAATTCCAGTCATACTTATTAGAGAAGGGTATCAAAACCTTAATTCA
CTATCCATTACCACCCCATAAGCAGCAAGCATATCAAAATATGTCTAGCCTTAGCCTTCCAATTACTGAGCAAAT
TCATGATGAAGTCATTTCTTTACCTATAAGTCCGGTAATGAGTGAAGATGATGTCAATTATGTAATCAAAATGGT
CAATGATTACAAGTAATGAAAAAATTTCTTCAGGTAACTATATTATCCGCTATCTATACATTCATTAAAATGATT
GCGGGTTTTATCATCGGTAAGGTAGTAGCAATTTATACAGGGCCATCAGGGGTAGCAATGCTTGGCCAAGTGCAA
AGTTTAATCACAATAGTTGCAGGTACTACCTCTGCACCTGTAAGCACAGGCCTTGTTCGATATACTGCGGAAAAT
TGGCAAGAAGGACAAGAAGCATGCGCGCCATGGTGGCGCGCATGCTTAAGGGTTACTCTGTTTTTATTCTTGCTT
ATTATTCCCGTTGTTATTATATTGTCGAAAAATATTAGTGAGTTACTTTTTAGCGATGGACAATACACATGGTTA
ATCATTTTCGCATGTTGTATATTGCCATTCTCCATTATAAATACATTGATCGCTTCAGTTTTAAATGGTCAACAA
TTTTATAAGCAATATATATTGGTTGGGATGTTTTCTGTATTCATTTCTACTATGTTTATGATTTTGTTGATTGTA
GCTTATAATCTTAAAGGTGCATTGATTGCCACAGCTATAAATAGTGCTATTGCTGGTCTTGTATTGGTTTTATTT
TGTCTCAATAAATCTTGGTTTAGATTTAAATATTGGTGGGGTAAAACGGATAAAGACAAAATTATAAAAATTATT
CATTATACTCTGATGGCTCTGGTTTCTGTTATCTCCATGCCTACAGCATTGATGTGTATTAGAAAAATATTGATT
GCTAAAACTGGTTGGGAGGATGCAGGGCAATGGCAGGCCGTATGGAAGATATCTGAGGTTTATCTTGGTGTTGTG
ACAATTGCTTTGTCAACATATTTCTTACCAAGATTGACAATTATAAAAACAAGTTTCCTTATAAAAAAAGAAGTA
AATAGTACTATATTATACATAATATCTATTACTTCATTCATGGCGTTGAGTATCTATTTATTCCGCGATTTGGTA
ATAACAGTTTTATTTACTGAACAGTTTCGCTCAGCTCGTGAATTATTTTTATTACAACTTATAGGGGATGTAATA
AAAATTGCTGGGTTTCTTTATGCATACCCTCTTCAAAGTCAGGGGCATACTAAACTATTCATCAGTTCAGAAGTG
ATTTTTTCTATGCTCTTTATCATTACCACCTATATTTTTGTTGTAAATTATGGAGTACATGGTGCTAACATAAGT
TATGTCATTACATATAGTTTATATTTTGTGTTTGCATTTGTGTTTACTAATTTTATTAATGTTAGAAGAAATAAT
TAAAAACAGAGGTTGAATTTTGAAAATAATTATACCTGTCTTAGGATTTGGCAGGGCTGGTGGTGAAAGAGTTCT
TTCTAAGCTGGCAACTGAATTGATGAATTATGGACATGATGTAAGTTTTGTTGTTCCAGATAATAGAACTAATCC
ATATTATGCTACCACAGCAAAAATTGTCACGAGTAAATCTAGTCAAAACCGTGTAAAAATATTGAGAATCATTAA
AAATTACTATAATCTGTGGCGTAAATGCATAGAGTTAAATCCTGATGCTGTAGTTGCTAGTTTTCATTTGACTGC
CTATCTTGTCGCATTATTACCAATCACCCGTCGTAAGAAATATTATTATATTCAGGCGTATGAAGTTAATTTTTT
TGATAATATAATATGGAAATTAATAGCGGGTTTAACATATTATTTACCGCTTAAAAAAATACTAAATAGTCCTAA
TTTGCTTCCTCATAAACATGATGATTTTATAGGAGTAGTTCCTGCAGGAGTAGATTTAAACGTTTTCTATCCGAA
ACCATCAAATAGGTTATTAAATGGTCACACATCAATAGGGATTATTGGTAGAAAAGAGAAGCACAAAGGAACTAG
CGAAATTATTTCAGTATTGTGTTCACTGGAAAATAAAGCTGGAATTATAATCAATATTGCGATCTATCTTGAAGA
AGTTGATAAGCAGCGTTTAATCGCTGCCGGGTTTCAGGTTAATTTTTTTCCGATTACTTCTGATTTAGAATTGGC
ATCCTTTTATCGAAGCAATGACATCATGATTGCTGTTGGGTTAATTGAAGATGGCGCTTTCCATTATCCTTGTGC
TGAATCAATGGCTTGTGGTTGTCTTGTTATTTCAAATTATGCGCCACTTACTGAAACTAACAGTGTACTTAAATT
AGTCAAGTTTGATGCTTGCAAACTTGGTGAAGCAATTAATCTTTGTCTCAATCTTGACCTAGAAGAAAAAAGCAA
AGAAATCCAATCTAATATTTCTGTGTTGAATAAATATGACTGGAAAATTGTTGGTGAAACTTTCAATAGTTTATT
GTTAGATGCAAATAAATAGTATACGTTGATGGGGAAAATATGAATATTGTTAAAACTGATATTCCAGATCTGATC
GTTCTTGAACCAAAAGTGTTTAGTGATGAACGCGGCTTTTTTATGGAGAGTTATAATCAGATTGAATTTGAGAAG
GCAATAGGAAGGCACGTAAATTTTGTTCAGGATAATCATTCAAAATCTAGTAAAGGCGTACTACGTGGGTTGCAT

TATCAATTAGCACCGTATGCACAGGCTAAATTAGTTCGATGTGTTGTAGGTCAGGTATTTGATGTTGCTGTTGAT
CTTAGAAAAAATTCACCAACGTTCAAAAAATGGTTTGGAATAACCCTTTCCGCAGAAAATAAACGACAATTATGG
ATACCCGAAGGATTTGCTCATGGTTTCTTGGTGACCAGTGATGAAGCTGAGTTCATTTATAAGACAACTAACTAC
TATGCTCCTGGTCATCAGCAAGCAATTATTTACAATGATCCTATTTTAAACATCGATTGGCCTTTCTGCAGTAGT
GCTCTGTCATTATCACAAAAAGATCAAGAAGCAAAATTATTTTCAGAATTATTGGACAGTGAACTGTTCTAATAA
AGTGTGCCACCTTATCCGTCTGAAGGATAGGTGGTTGCTTATATTTTTTTGAGTATGTTTGTATAATGACAGAAA
ATAGTCCGAAATATAAACACGATAAAAGCTTAATAAGTTTTATCTACTTATTTTTTATATTTACACTTATTGTAG
GCTTTATTATCGCAAATACCCAGTTTTTGGGGCGAAGTAGAGACTATGATAATTATATACAGATCTTTTCTGGTA
AAGAAGGGGAGGGGGTTCTTGAATTATTTTATCGCGGATTGATGTTAATAACGACCAGCTATGAAACTATCATTT
TTATAATTTTAACATGTTCTTTTTTTATAAAGGCAAGGTTTCTCGCTAACTATTCGCGTAATTTTTCAGGCTTGA
CCTTATTCTTTATTTATTATGCAAGCGTTGCACTTTGGGTTTTAGATTATACTCAATTCAGAAATGGTCTATGTA
TTTCCATTTTAATGTTTTCCGTATACTATTTATTTATAAATAAACCGACTTATTTTTATTTCTCGGTATTATGTG
CAATTGCAACTCATTGGTCTGCTTTGCCTTTTTTGCTTTTATATCCTTTTGTCTATTCAACAAAAATAAGACGCC
TTGGTTATTTTTGTTTCAGTATTCTTGTTTTGATTGCGATCTCAGGAGAAGGAAAAGAGATCATATCTTTTATAA
GAAATTTTGGAGTGGGACAAAAAATAGGAAATGAAGCTGGTGTAAATTTAATAAATTCATTATCCCTTACCGCTA
TTTCCTGGTTTATTATTAGTTACATATCAAGCATTGGAAATGAAAGGAGAAATTTAAGGCTTTTCTTTTGTTATG
GTGTCATGCAATACGTGACTTTTAGCCTTTTCTCTCTACCTGTTATGGCTTTCCGTATTTTGGAAATGTATTTTT
TCCTTATGCTAACCATTGGGGTGTTTATTAAGCAAAAAAAGAATTATTATTTTATTTTTTGCAAAGTGTTAATTT
TATTGTATCTAACATACTATTATCATATGGTCTTTGGAGTGATTAATGTGTAAGGCTAAGGTGTTGGCTATAATT
GTTACTTACAACCCGGAAATTATTCGATTGACGGAATGTATTAACTCTTTAGCCCCACAAGTTGAGAGAATAATT
CTTGTAGATAATGGCTCAAATAATAGTGATTTGATAAAAAATATCAGTATTAATAACCTTGAAATTATTTTACTT
TCGGAAAACAAAGGCATTGCATTTGCTCAGAACCATGGTGTTAAGAAGGGCCTGGAAGCAAAAGAGTTTGACTAT
TTATTTTTCTCAGATCAGGATACTTGCTTTCCTAGCGATGTTATTGAAAAACTTAAGAGTACATTTACGAAAAAT
AATAAAAAAGGTAAAAATGTTGCTTGTGCTTCTCCTTTTTTTAAAGACCATCGTTCAAATTATATGCATCCGTCA
GTCAGCCTAAATATTTTTACGAGTACAAAAGTTATATGTAGTGAAGTAGACGATGATCTTTATCCCTCGCATGTT
ATTGCTTCTGGGATGTTAATGTCTCGTGAAGCATGGCGCGTCGTCGGACCATTTTGTGAAAAACTCTTTATAGAC
TGGGTTGATACAGAATGGTGTTGGCGTGCATTAGCTAATAATATGATTATTGTTCAGACACCATCAGTCATCATT
TCTCATGAACTTGGGTATGGGCAGAAAATTTTTGCTGGTCGATCTGTTACAATACATAATTCTTTCAGAAATTTT
TATAAAATACGCAATGCAATATACTTAATGCTGCATTCAAATTATAGCTTCAAGTATCGTTATCATGCTTTTTTT
CATGCGACAAAGAATGTTGTATTTGAAATTTTATATTCGAAAGAAAAATTAAATTCACTGAAGGTTTGTTTTAAA
GCTGTACGTGATGGTATGTTCAATAATTTTTAATACGAAAATAGTTAGGCTCAAGGTGTTTAAATGGAAGAAAAT
AATATGAAGACGGTCGCTGTAGTTGGCACAGTGGGTGTTCCTGCTTGTTATGGTGGGTTCGAATCACTTGTTCAG
AATCTAATTGATTATCAATCTGATGGTATACAATATCAGATATTTTGCTCTTCAAAAAAATATGATAAAAAATTT
AAAAATTATAAAAATGCAGAATTAATCTATTTGCCGATAAATGCCAATGGCGTCTCTAGCATAATTTATGATATT
ATGTGTTTAATTATTTGTTTATTCAAAAGGCCAGATGTTGTTTTAATATTGGGGGTGTCTGGTTGTTTATTTCTA
CCAATTTATAAACTATTTTCAAAATCAAAGATTATTGTCAATATTGATGGGCTTGAATGGCGTAGAAATAAATGG
GGAACGTTTGCTAAGAAATTTCTTAAAATATCTGAGGCGATATCTATTAGAATAGCTGATATTATCATTTCAGAT
AATCAAGCAATAGCTGATTATGTGGAAAATAAGTACAAGAAAAAAAGTGTAGTTATAGCTTATGGCGGAGATCAT
GCCACTAATCTTAGTACACCGATAGACAATGATCAAAAAAAAGAAGGTTATTATTTGGGGCTTTGTAGGATAGAG
CCTGAGAATAATATAGAAATGATTCTGAATGCCTTCATTAATACAGATAAAAAAATTAAATTTATGGGTAATTGG
GATAACAGCGAGTATGGACGCCAGCTAAAAAAATATTATTCAAACTATCCAAATATCACCCTACTAGAACCTAAC
TATAATATTGAAGAGCTTTATAAACTAAGAAAAAATTGTCTTGCATACATTCATGGACACTCGGCTGGTGGAACA
AACCCTTCTTTAGTTGAAGCGATGCATTTTAATATTCCTATTTTTGCTTTCGATTGTGACTTTAATCGTTACACA
ACTAACAATTTAGCTCATTACTTTAATGATTCTGAACAACTTAGCTTATTAGCAGAAAGTTTGTCTTTTGGAAAT
CTTAAATGTCGAGTATTAGATTTAAAAAATTATGCTGAAGATATGTATAACTGGAGGCATATAGCTGCTATGTAT
GAATCTATTTATTAAACGCATTAACAATAATATAATTGACCTTATATAGCAGGGAAAGATCACGTAACGCTGCGG
CGCGCCGATCCCCATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTTTCTAGAGAATAGGAACTT
CGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTT
TAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTCCAGGCCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGG
AGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCGCTCAACATCG
AAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGAAGTGATTGCCGAAAATCCAG
GCAAGAAACTGGTTCCTTACTATACGGTGAAAGAGTTTGTCGAATCTCTGGAAACGCCTCGTCGCATCCTGTTAA
TGGTGAAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCA
TTGATGGTGGTAACACCTTCTTCCAGGACACTATTCGTCGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTTAACTTCA
TCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAG
CCTATGAATTGGTAGCACCGATCCTGACCAAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATA
TTGGTGCCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTG
CTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGA
ATAACGGTGAACTGAGCAGTTACCTGATCGACATCACCAAAGATATCTTCACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACT
ACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACCGGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATC

TCGGCGAACCGCTGTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTTTGCACGTTATATCTCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTTG
CCGCATCTAAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTC
GTGCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGCTGCGTCTGAAGAGTACA
ACTGGGATCTGAACTACGGCGAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCTGCAGA
AAATCACCGATGCTTATGCCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAATTGCCG
ATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGATGTCGTTGCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCCGGTTCCGACCTTCTCCG
CAGCGGTTGCCTATTACGACAGCTACCGTGCTGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTGACTATT
TTGGTGCGCATACTTATAAGCGTATCGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

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

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCGATACCC
AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAA
GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA
CTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATTTGCCCGCCGGGCGTGACAATTATG
AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTGGGCCACTCCATTTTATGTGCACGACCTGCCATTGGTGACAATCCA
TTTGTCGTGGTGCTGCCAGACGTTGTGATCGACGACGCCAGCGCCGACCCGCTGCGCTACAACCTTGCTGCCATG
ATTGCGCGCTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCT
GTCATCCAGACCAAAGAGCCGCTGGACCGCGAAGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTCATCGAAAAACCGGAT
CAGCCGCAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTTGGTCGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAACTT
GAACGCACTCAGCCTGGTGCATGGGGGCGTATTCAGCTGACTGATGCCATTGCCGAACTGGCGAAAAAACAGTCC
GTTGATGCCATGCTGATGACCGGCGACAGCTACGACTGCGGTAAAAAAATGGGTTATATGCAAGCGTTCGTGAAG
TATGGACTACGCAACCTCAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGGATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA
TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAGATTAGCGGCGAAAGTAATTTGTTGCGAA
TTTTCCTGCCGTTGTTTTATATAAACAATCAGAATAACAACGACTTAGCAATAGGATTTTCGTCAAAGTTTTCCA
GGATTTTCCTTGTTTCCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCATTTGAATTTTACGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA
ACGCTCGTCACATCGTAGACATGCATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCTGAAATTA
TAAAGTCATTCTTATAGAACATCGCATTTCAATAATATAATTACACCTAAATGAATAGGATACAACGTGTGCACA
ATTATTTAAGGCTTAAAGATAAAATAAAAAACGTATTTTTAGGGTTGTATATATTGCAGTTATTTAATTATATCG
CGCCATTGGTAATTATCCCTATCCTGATAAAATATATTGGGTTGGGGGAATATGGGGAATTGGTCTATATTACAT
CTATTTATCAAATAGTGGCTTTGATTATTGATTTTGGCTTTACTTACACAGGACCTGTGGTTGCTGCGAGACATA
GATGTGAGACCCAAAATTTACAGCGCTATTACTCAATAGTTGTTCTTTTAAAATCATTGCTTTTTATAATTGCAT
TAACATGTGTATTTTTATTGTGCAGATTAAATATAGTCCACTTGTCATTTTTTGGGTTTTTGTCAATTTTTCTAT
GCACTATTGGTAATATATTATCGCCCAATTGGTTTTTGCAGGGGATTGGTGATTTTAAAAAACTTTCATACTCAC
AAGTAATAGTGAGAATAACATTGTTTATCATACTTCTTGTTTATGTCTGTAGTGGCGGAGATAATGTTTTTATCC
TAAGTTTTTTGCAAAATGCAACATTACTCATATGCTGTATATACTTATGGCCAAATATTCATATTAGCCATGTTG
TTCATCTTAAACCTAATGAATGCATTGTGGAATTTAAGAAGGCAGGAAATGTTTTTATTGGCGTAATAGGTACGA
TTGGTTACAATGGTCTAATTCCTGTGTTAATTGGAAACCTTTGCGGTAATACGAGTCTTGGTGTTTTTTCAATCG
TTCAAAAAATGACAACAGCATGTCAAAGTCTAATTAATCCAATATCACAGTATATGTTATCTCAAGTTTCAGAAA
TTAAACCTCAAGATAAACTGTTTTATTATAGAATTAAAAAAAGTTTTTTTGTGCATTTAACAATTAGCATAATTG
CATGTTTATGTTATATGGGGTTAGGGCAATATGTGGCGACTTTTATAGGTAAAGTTGACGTTTCATTTGTTATTA
TTTTATTTGCGTCAATAATTACCATTTTTTCATCTTTAAATAATGTCCTTGGTATACAGTTTCTTATACCGACAG
ATAATGTAAAAATACTACGAAGTATAAATGTTATGGCGGGAATTATTGTTGTTAGTTTGTCCTGGCTGTTAATAT
CACGCTTTGACATTCTGGGGGGGGTTTTATTAAACCTAATTGGTGAGTTTCTTGTATTCAGTATGCTAGCTTTTA
TTGCCCATCGAAAGTGGGGAGCGAGAGTATAATGAAAGTGAAGGCGGTTCCTGCTATTACATTCTATTTAAGTTT
AATGCTGACAATTTTAGTGTTACTGTTTGGTAATGAACCAAATAAATCACAATATATCCTTGTTATAGCAACGAT
AACAGTTTTTTATATCGCATATATCACTAATAAAATAACTTCTCCGGCCAGCCTTCTCGTTATATCATCTTTTGT
GTTTTTAGGTTGTCGCCCTTTATTATCTTTGTTTGCAAACTATGATTATAGGATTGCCGATTGGTTTATTGAAGG
ATATATGGATGACGATGTGATTTTGGCTAACTATGCTATAACACTAATGTATTATGGTTATACATTGGGACTAAT
TCTATGCAAAAATACTGAAAAATTTTATCCGCATGGTCCTTATCCTGAAAAACAATTGCTAAAAATAAAGTTTCT
TTTGACTTTATTTTTTCTGGGTTCGATAGGTATGGTTGTAAAAGGGATATTCTTTTTTAACTTTATAGAATCTAA
TAGTTATGTTGATATTTATCAATCAAATATAACAACGCCAATAGGTTATGATTTTCTATCTTATTTATTTTATTG
TTCTTTTTTCCTTATATGTGCGTTTCATATACAGTTCAGAACAAATAAAAAATTTCTTTTTATTGCGATATGCAT
TGCTGCATTTAGCACCTTGAAGGGTAGTCGTAGTGAAGCTATAACGTTTCTTTTAACGGTTACATGTATATATTT
TAATGAAGTAAAGACAAGAAACTTACGTCTGCTGATTACAATGATTTTTGTTTTTAGCGTCATTTTTGTGATTAG
TGAATTTATCTCAATGTGGCGCACTGGAGGGAGTTTTTTTCAATTAATGCAGGGTAATAATCCTGTTATAAACTT
TGTATACGGCATGGGAGTATCATATCTTTCCATTTATCAATCAGTAAAACTACAACTATTGTCAGGGGGATATAA
TGTTACCTATCTATTCAGCCAGTTAATAATAACTTGCTCGTCAATATTTAATGTCAAATTGAGCTTGCCGGAAAT

AAGCTATAGCCATTTGGCCTCATACACAGCAAACCCAGAACTATATAATCTTGGGTTCGGACTTGGGGGGAGTTA
TTTAGCAGAATCGTTTTTAGCATTTGGTCTGATTGGATGTTTCATTATACCCTTTTTACTTTTACTTAATTTAAA
TGTATTGGAAAAATATACAAAAAACAAACCAATTATATATTTTGTTTATTATAGTGTGTTGCCACCTATATTATT
CACACCAAGAGAGACTTTGTTCTATTTCTTCCCCTATCTTGTCAAAAGTATATTTGTTGCTTTTTTAGTTACATT
ATACATCCAGTATAAAAAGGATTGACCAAAATGTCAGAAAAAAATGTCAGCATAATAATCCCAAGTTATAACAGG
GCTCATATTCTTAAGGAGGTCATACCAAGTTATTTTCAGGATGAGACTTTAGAGGTTATAGTTATCAATGATGGA
TCAACAGATAATACAAATAGTGTATTAGCTGAACTGAAGGAAAAATATTCTCAGTTAGTTATTTTAGAAAATGAA
ACGAATAAAAAACAGATGTATTCTAAAAACCGAGGGATTGAAATAGCCAAAGGGAAATATATTTTTTTTGGTGAT
GATGACTCTTACCTCTTACCCGGTGTTATATCTCGGTTATTGGCTACAAAATATGAGACAGGCGCTGATGTAATC
GGCGCAAGAATACTTTATATGAATAATAACGAGAAAACAATTGAAGATTGCATAAATCGACATAAAAAAGAGGGG
CGTTTTGTTAGTGATCTAAATAGATTGGATTTTAGTTATACATGTGATTTGGACCATCCGATTGAATGTTTTTAT
GCACAGCCTTTTGTTCTAGCTGAAAGGGAACTAATATCGAAATATCGATTTGATATATCTTATACGGGAAACTGC
TATCGTGAGGAAACTGATTTCATGCTATCTCTATTTATTAAAAATAAAAAATTTATATATGATTCAAAGGCTTTG
TTAATAAATTTACCTCCAAGAAAAGCGACGGGAGGGGCAAGAACAGCTAATCGATTAAAATATCATTACGAAAGT
TGCATAAATAATTATAGATTTTTAAAAAAATATAATGATAATTTGAATCTTCTTTCAGGACAAAAGCATGCTATA
TTTTACCGACAGTGTCAATTCGTTCTGCTAAAAATGAAGTCGTTTATCGGGAAGTTTTTAAAATGATTATATATA
TCGCCGCGTATAATGGTTCAGGAGGGCAAGGTGGGGTGGAAAGGGTTGTTGCCCAACAATGTAACATTCTTAAAA
ATTTGGGGGTTAAAGTCATTATACTTGATAAAACATACTTCAAAATTTCTAACAAAATTCGTAACAAAAAAATAC
AAGTAGCACTTTATCCAATATTAGTTTCTCTTTATTTAACCTTACAAAAATTACGTGGCGTGACGTTTAAAGTTA
TTGCACATGGCTATTGTTCTCCTTTTTATAGGAATGACATCTTAATAGCTCATGGCAATATGAAATGTTATTTTC
AAACAGTCATGAATAAAAAACCTAATCGGTTGTCTGGCAGTGGTCTTTTATCTTTCTATGAGCGTTGGGCTGGAG
CATTTTCAAAAAATATCTGGGCTGTTTCAAATAAGGTTAAAAGTGAATGGAATGAGCTTTACAATATTAATTCAC
ATAAAATCAAAGTTGTTCGAAATTTTATAAATCTTGCACAATTTGATTACACTGATGTTAATGAAGCAGAATATG
TGACATTTGTCGGGCGATTGGAAAAAGGAAAAGGAATAGATGATCTGTATTACATATGTAAAAATCTGCCAGATA
CTTCCTTCCATTTAGTTTCAAGTATTCCCGCCCCACAAAATTTTGCTTCGCTAAATAATGTTCTGACCAGCATTG
CTGTCCCCTATGCGAAAATGCCAGAAATATTTAAGAAATCCAGAGTACTTATTTTACCGTCCTATTATGAAGGAT
ATGAGCTGGTTACTATTGAAGCGCTATGCTGTGGTTGCCCTGTGATAGGCTATAATGTTGGTGCAATTAGAGAGT
TGTATGCAGAAAGTTTTCCTGGCGTATTTATTGCCAATAATAAAGAAGATTTAGCACAAGTAGCCTACAAATTAA
TTAGTCTTGATAATGAAAAATATTATCATTTGAGACAAACTATTTATAGCAAGCGTGAGCTTTTTTCTGAAGAGA
GATATGCGGAAATTTTAACGGCGGCATTTAATGAAAAAAAATAAGAAACTCTGTCTCATTTCAATTAACTCATAT
AATGAACTTACCGGAGGAGGAGTATATTTACGTACGCTTGTTAGTTTTCTACAAAAACAGAATGTTAATTTAACA
CTTATTGATAAAAAATCCTCAGGTAAACTATTCGAAGACAATACTTTTCAACATATATCATTTATTAAAGGTAAA
CGTCAGGATATAATATCCAGGCTTTTTTTTATACCATCATTTTATGTCCCTTATATTTTCTCAATAATTAAAATT
TTACGGAAGCAAGATATTCTTGCTTTTCACAACTCTCGGCTTGGATTGTTATGTCTGCTTTTTAGAATACTCATG
CCCCACAAAAAGATCATATTGTTTACGGATAACTTCGAATATGACTTAATAAGACAAAAAGATAAAAACATAACT
ACTTTTATTGAAAAATTAATTGTTTATCTCAATGAATTTATCGGGCTTAAGAATTCAGATTTAGTTAGCTATATT
ACCCGGCAAGATAAAAATGCAATGGATAAATTTTATGGGATTAAAAAAAGCAGAAATTTAATTCTCCCTGTGATA
TTTAGTAGAGAAAAACCAACTGATGTATTGTCAGCTCACTTTATTAATGAGTATAATCGATTGAATAATGATAAT
AGGAAAAAAGTAGTATTTACTGCATCTTTTGATTTTTTTCCAAATATAGATGCTGCCAACTATGTTTTAAATGCA
GCAAAGTCTAATAATGATTATTGCTATATTTTGGCAGGTAGGAAAAGTACTACTTTGAATCTTCCTGATTTGGAT
AATTTATTTTTTTTCGATAATCTATCTAATAGTGAAATGTCATATTTATTATCTGCTTGTGATGTTTTTTATTCT
CCTATAGTTTTAGGAAGTGGAATGAAAACAAAAATTGCAGAAGCACTATCATATGGATTATATATTTATGCGACA
GAGCATTCCTTAATCGGCTATGATGAAATTATACACAATAAGGAGTGTGTTAAAAAAATCTCACATTTGGATGAG
GAATTTCCTAAAGATTTCAAGATGAAAAGTATCAATAAACAGCTAATAATGTCTTATCAGCAAAAATATTATTCA
CATTATCGGTTTAATGGCCATGAACTTGATATAATAAATTTTGACGATTAGTTAGTGGAGATATAATATGAACAT
ATTAGTAACTGGTGGTGCTGGATATATCGGATCTCATACGGCTATTGAATTACTGAATGCAGGTCATGAGATTAT
CGTTCTGGACAATTTCAGTAATGCTTCATACAAGTGTATCGAAAAAATAAAAGAAATTACTCGACGTGATTTTAT
AACAATTACTGGAGATGCTGGGTGTAGGAAGACACTCTCCGCTATTTTCGAGAAACACGCCATAGATATAGTTAT
TCATTTTGCTGGCTTTAAATCTGTTTCAGAGTCTAAAAGTGAACCCTTAAAGTATTACCAGAATAATGTTGGAGT
GACCATTACTTTATTACAGGTAATGGAAGAGTACAGAATTAAAAAATTTATCTTTAGTTCATCTGCGACAGTCTA
TGGTGAACCAGAGATAATTCCAATTCCAGAAACAGCTAAAATTGGAGGAACTACGAATCCATATGGCACATCGAA
GTATTTTGTTGAAAAAATTCTAGAGGATGTTAGTTCCACGGGAAAACTGGATATAATTTGCTTGAGATATTTTAA
TCCTGTCGGTGCTCATTCTAGTGGTAAAATAGGTGAGGCTCCATCTGGTATCCCTAATAATCTTGTTCCTTATTT
ATTGGATGTTGCGAGTGGTAAACGTGATAAATTATTTATTTATGGCAATGATTACCCTACTAATGATGGAACAGG
TGTAAGGGATTTTATTCATGTTGTTGACTTAGCGAAAGGTCATTTGGCTGCAATGAATTATTTAAGTATCAATTC
GGGATATAATATCTTTAATCTTGGTACAGGAAAAGGTTATTCGGTACTTGAATTAATCACTACATTTGAAAAATT
AACAAACATTAAGGTCAATAAATCTTTTATAGAGAGAAGGGCAGGGGATGTTGCGTCTTGTTGGGCTGATGCAGA
TAAAGCTAATTCTTTATTGGACTGGCAAGCCGAACAAACTCTAGAACAGATGTTATTGGACTCGTGGCGTTGGAA
AAAAAATTATCCAGACGGATTCTGAATATAAAAGGTTTCAGTTTTATGAATCAATCAGAGCAGAGAAAAAAAATA
CTGGTTCTTACACCTCGCTTTCCCTACCCTGTCATTGGAGGGGATAGATTAAGAGTCTATATGTTATGTAAAGAA

CTTTCCAAAAAATATGATCTTATTCTTCTGAGCTTATGTGATCAACCACTAGAACTTGAAATAAATATAAATGAC
TCGGTCTTCAAAGAAATTCATCGTGTCTATCTACCAAAATATAAATCATATTATAATGTATTAAAAGCTTTGGTT
ACGCAAAAACCGTTGCAAATTGCTTATTATCAATCGGACACATTTAAGAATAAATACAATAAATTAATTAAACAA
TGCGATGCAGTATTTTGTCATCTGATAAGAGTTGCTGATTATGTTAAGGATACAGACAAGTTCAAAATTCTTGAT
ATGACAGATGCAATATCTTTGAATTACAGTCGCGTTAAAAAATTAGCAAGTAAAAAAAGTTTGCGTGCAATTATT
TATTCTCTGGAACAAAAAAGATTAGAATCATATGAACGTTCTGTGGCGAATCTTTTTGATTTGACCACTTTTATT
TCATCCGTAGACCGTGACTATCTCTACCCTAATCTGGGCAGTAATATCCATATAGTCAATAATGGGGTTGATACA
TCAGCCTTGAGATATATAAAAAGAGAAATAAAAATCGATAAGCCTGTGGAACTTATATTTATCGGAAATATGTAT
TCTTTACAAAATATGGATGCTGCAAAACATTTTGCTAAGAATATTTTACCTTGCTTGTATGATGAGTTTAATATT
ATTTTTAAAGTGATTGGTAAGATCTCAGAAACTAATAAAAATATATTAAATTCATTTAAAAATACAATTGCTTTA
GGTACTGTTGATGATATCAATTCTTCCGCTTCTACAGGGCATATAGGTATATGTCCTGTTCGTCTTGGAGCAGGC
GTACAAAATAAAATTCTTGAATACATGGCTTTAGGTTTACCATGTATTACATCTAGCATTGGTTATGAAGGTATT
AATGCAAAATCAGGTAGCGAAATTTTTGTTGCAGATACAGTAGAGCAATATAAAAACGTACTAAGAGAAATAATT
TACGATTATAATCGTTATACTGAAGTGGCTGAAAATGCCCGTAGTTTTGTAGAAAATAATTTTTCTTGGGAATCA
AAAGTTGCCAATTTAATGAATACATTAGATGAGAAATTATATGAACAATAATAAAATTATTACACCTATCATTAT
GGCTGGTGGTTCAGGCAGTCGGTTGTGGCCACTATCAAGAATTCTCTATCCGAAACAATTTCTTAGCCTAATCGG
TAGTCATACCATGCTTCAAACAACGGCTAATCGTCTGGATGGTTTGGATTGTACCAACCCTTATGTCATTTGTAA
TGAACAATACCGCTTTATAGTTGCTGAACAGCTTAGAAAAATCGATAGATTGACTTCAAAGAATATCATCCTTGA
GCCTGTTGGGCGTAACACTGCCCCTGCAATTGCATTAGCGGCGTTGCTGATGTCTAAGTCTGATAAAAGTGCAGA
TGATCTTATGCTCGTACTGGCTGCAGATCACGTTATACACGATGAAGAAAAATTTTGTAACGCTGTTAGATCGGC
AATTCCATACGCTGCTGATGGGAAATTGGTAACATTTGGTATAATTCCAGACAAAGCAGAAACTGGTTATGGTTA
TATACATCGAGGACAATATATTAATCAGGAAGATTCGGATGCATTTATAGTGTCATCATTTGTTGAAAAGCCAAA
TCATGAGACAGCCACTAAATATCTTGCTTCCGGTGAGTATTATTGGAATAGCGGTATGTTTTTGTTTAGTGCAAA
TCGTTATATAGAGGAACTTAAACAATTTCGGCCTGATATTTTATCCGCTTGTGAAAAAGCAATTGCTTCAGCGAA
CTTTGACCTTGATTTTGTGCGTTTAGATGAAAGTTCTTTCTCTAAGTGCCCTGAAGAATCAATTGATTACGCTGT
AATGGAAAAAACAAAAGACGCAATTGTTATTCCAATGGATGCTGGCTGGAGTGATGTCGGTTCATGGTCTTCTCT
TTGGGAAATTAATGATAAAGACTCAGACGGCAACGTAATAGTTGGGGATATTTTCTCTCATGAAACAAAGAATTC
TTTCATATATGCCGAATCGGGAATTGTTGCTACAGTTGGAGTGGAAAATTTAGTTGTTGTCCAAACAAAGGATGC
TGTTCTTGTCTCAGAGAGAAATAAAGTTCAGGATGTAAAGAAAATAGTAGAACAAATTAAAAATTCAGGTCGTAG
CGAGCATTATGTTCATCGCGAAGTATATCGTCCTTGGGGTAAATATGATTCCATTGACACAGGGGAGCGTTATCA
GGTCAAACGTATAACAGTAAATCCTGGTGAAGGACTTTCTTTACAAATGCACCATCATAGGGCAGAACATTGGAT
CATAGTTTCTGGAACTGCAAGGGTGACTATAGGTTCTGAAACTAAGATTCTTAGCGAAAATGAATCTGTTTACAT
ACCTCTTGGTGTAATACACTGCTTGGAAAATCCAGGGAAAATTCCTCTTGATTTAATTGAAGTTCGTTCTGGATC
TTATTTAGAAGAAGACGATGTTATCCGTTTTCAGGACCGATATGGTCGTAGCTAAATTTTTGATAATGTAACGTT
AGTAGAAGAGCGCTAATATTTTTAGTTAATCTGTAATAAGTATTATTTGTTTAAGGTATATCATGTCGAGTTTAC
CCTGCTTTAAAGCCTATGATATTCGCGGGAAATTAGGCGAAGAACTGAATGAAGATATTGCCTGGCGCATTGGTC
GCGCTTATGGCGAATTTCTCAAACCGAAAACCATTGTGTTAGGCGGTGACGTCCGACTCACCAGCGAAACCTTAA
AACTGGCGCTGGCGAAGGGGTTACAGGATGCGGGCGTCGATGTGCTGGATATTGGCATGTCCGGCACCGAAGAGA
TCTATTTCGCCACGTTCCATCTCGGCGTGGATGGCGGCATCGAAGTTACCGCCAGCCATAACCCGATGGATTACA
ACGGCATGAAACTGGTGCGCGAAGGGGCTCGCCCGATCAGCGGTGATACCGGACTGCGCGACATCCAGCGTCTGG
CAGAAGCCAACGACTTTCCTCCCGTTGATGAAACCAAACGCGGTCGCTATCAGCAAATCAATCTGCGTGACGCTT
ACGTTGATCACCTGTTCGGTTATATCAACGTCAAAAACCTCACGCCGCTCAAGCTGGTGATTAACTCCGGGAACG
GCGCGGCGGGTCCGGTGGTGGACGCCATTGAAGCCCGCTTTAAAGCCCTCGGCGCACCCGTGGAATTAATCAAAG
TGCACAACACGCCGGACGGCAATTTCCCCAACGGTATTCCTAACCCGCTACTGCCGGAATGTCGCGACGACACCC
GCAATGCGGTCATCAAACACGGCGCGGATATGGGCATTGCCTTTGATGGCGATTTTGACCGCTGTTTCCTGTTTG
ACGAAAAAGGGCAGTTTATTGAGGGCTACTACATTGTCGGCCTGCTGGCAGAAGCGTTCCTCGAAAAAAATCCCG
GCGCGAAGATCATCCACGATCCACGTCTCTCCTGGAACACCGTTGATGTGGTGACTGCCGCAGGCGGCACCCCGG
TAATGTCGAAAACCGGACACGCCTTTATTAAAGAACGTATGCGCAAGGAAGACGCTATCTACGGTGGCGAAATGA
GCGCCCACCATTACTTCCGTGATTTCGCTTACTGCGACAGCGGCATGATCCCGTGGCTGCTGGTCGCCGAACTGG
TGTGCCTGAAAGGAAAAACGCTGGGCGAACTGGTGCGCGACCGGATGGCAGCGTTTCCGGCAAGCGGTGAGATCA
ACAGCAAACTGGCACACCCCGTTGAGGCGATTAACCGCGTGGAACAGCACTTTAGCCGCGAGGCGCTGGCGGTGG
ATCGCACCGATGGCATCAGCATGACCTTTGCCGACTGGCGCTTTAACCTGCGCTCCTCTAACACCGAACCGGTGG
TGCGGTTGAATGTGGAATCGCGCGGCGATGTACCGCTGATGGAAGAAAAGACAAAACTTATCCTTGAGTTACTGA
ACAAGTAATTCAGTAATTTCATATAAATGGGTTTTAAAAAACGGAAAAGATGAGATATCCGGTGTGGTATATCCA
AGGTAATGCTATTCAGTATCTCTATGAGTGAGTTAACATCTATACCACATTTAAGCCGCACACTTCGGGATCCCC
ATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACT
AAGGAGGATATTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTT
GTATACTTATTTGCGAACATTCCAGGCCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTC
CAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCGCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTA
TACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGAAGTGATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAAACTGGT

TCCTTACTATACGGTGAAAGAGTTTGTCGAATCTCTGGAAACGCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCAGG
TGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATTGATGGTGGTAA
CACCTTCTTCCAGGACACTATTCGTCGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTTAACTTCATCGGTACCGGTGT
TTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTGGT
AGCACCGATCCTGACCAAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGCCGATGG
CGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTC
TCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGAATAACGGTGAACT
GAGCAGTTACCTGATCGACATCACCAAAGATATCTTCACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGT
GATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACCGGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGCT
GTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTTTGCACGTTATATCTCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTTGCCGCATCTAAAGT
TCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTCGTGCGCTGTATCT
GGGCAAAATCGTTTCTTACGCCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGCTGCGTCTGAAGAGTACAACTGGGATCTGAA
CTACGGCGAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCTGCAGAAAATCACCGATGC
TTATGCCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAATTGCCGATGACTACCAGCA
GGCGCTGCGTGATGTCGTTGCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCCGGTTCCGACCTTCTCCGCAGCGGTTGCCTA
TTACGACAGCTACCGTGCTGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTGACTATTTTGGTGCGCATAC
TTATAAGCGTATCGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

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

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCGATACCC
AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAA
GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA
CTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG
AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCA
TTTGTCGTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATG
ATTGCACGTTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCC
GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGAT
CAGCCGCAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTCGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAACTG
GAACGTACTCAGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCC
GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG
TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA
TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAA
TCTTCCTGCCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA
GGATTTTCCTTGTTTCCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA
ACGCTCGTCACATCATAGGCATGCATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC
CTCTATTAATCAAACTGAGAGCCGCTTATTTCACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGCTAGCGAT
CGCTTAAGATCTAGGATTTCATTATGTTACTTCCTGTAATTATGGCTGGTGGTACCGGCAGTCGTCTCTGGCCGA
TGTCACGCGAGCTTTATCCGAAACAGTTCCTCCGCCTGTTCGGGCAGAACTCCATGCTGCAGGAAACCATCACCC
GACTCTCGGGCCTTGAAATCCATGAACCGATGGTCATCTGTAACGAAGAGCACCGCTTCCTGGTGGCTGAACAGC
TACGCCAGCTCAATAAGCTGTCGAATAATATTATTCTTGAGCCGGTCGGGCGCAACACCGCCCCGGCCATCGCCC
TGGCAGCCCTTCAGGCCACCCGCGACGGCGACGACCCGCTGATGCTGGTTCTCGCCGCTGACCATATCATCAATA
ACCAGTCGGCCTTCCACGACGCCATCCGGGTCGCCGAGCAGTATGCTGATGAAGGTCATCTGGTCACCTTCGGTA
TCGTGCCGAATGCCCCGGAAACTGGCTACGGTTACATTCAGCGCGGCGTGGCGCTCACCGATAGTGCCCATTCCG
CGTACCAGGTGGCCCGCTTTGTGGAGAAGCCGGATCGCGAGCGCGCCGAGGCTTACCTCGCCTCCGGGGAGTACT
ACTGGAACAGCGGCATGTTTATGTTCCGCGCCAAGAAATACCTCATCGAGCTGGCCAAATACCGTCCGGATATCC
TGGAAGCCTGCCAGGCTGCGGTGAATGCCGCCGATAATGGCAGCGATTTCATCAATATCCCGCATGATATTTTCT
GCGAGTGCCCGGATGAGTCCGTGGACTATGCCGTTATGGAGAAAACCGCCGATGCGGTGGTGGTCGGTCTCGATG
CTGACTGGAGCGACGTCGGCTCCTGGTCCGCACTATGGGAGGTCAGCCCGAAAGACGAGCAGGGCAATGTCCTCA
GCGGTGACGCGTGGGTACACAACAGCGAAAACTGCTACATCAACAGCGACGAGAAGCTAGTGGCGGCCATTGGCG
TAGAGAATCTGGTGATTGTCAGCACTAAGGACGCCGTGCTGGTGATGAATCGCGAGCGTTCCCAGGACGTGAAGA
AGGCGGTCGAGTTCCTCAAGCAGAACCAGCGCAGCGAGTACAAGCGCCACCGTGAGATTTACCGCCCCTGGGGCC
GTTGCGACGTAGTGGTCCAGACCCCGCGCTTCAACGTCAACCGCATCACGGTGAAACCAGGCGGTGCCTTCTCGA
TGCAGATGCACCACCATCGCGCCGAGCATTGGGTTATTCTCGCCGGCACCGGTCAGGTGACTGTCAACGGTAAGC
AGTTCCTGTTGTCCGAGAACCAGTCCACCTTTATTCCGATTGGCGCCGAGCACTGCCTGGAAAACCCTGGCTGTA
TTCCGCTGGAAGTGCTGGAGATCCAGTCGGGGGCGTACCTTGGCGAGGACGACATTATTCGTATTAAAGACCAGT
ATGGTCGTTGCTAATTATTTTCGGGACAAGACGCAGAATGACACAGTTAACTTGTTTTAAAGCTTATGACATCCG
TGGTGAACTGGGTGAGGAACTGAACGAGGACATCGCCTACCGTATCGGTCGCGCCTACGGCGAATTTCTGAAACC

CGGGAAGATAGTGGTGGGGGGCGATGTGCGCCTCACAAGCGAGTCGCTGAAGCTGGCGCTGGCCCGCGGGTTAAT
GGACGCCGGTACCGACGTGCTGGACATCGGCCTGAGCGGTACCGAAGAGATTTACTTTGCCACCTTCCACCTTGG
GGTAGATGGTGGCATCGAGGTGACCGCGAGCCACAATCCTATGAACTACAACGGCATGAAGCTGGTGCGCGAGAA
TGCGAAGCCCATCAGCGGCGACACCGGCCTGCGGGATATCCAGCGCCTGGCGGAGGAAAACCAGTTCCCGCCAGT
GGACCCGGCGCGTCGCGGGACCCTGAGCAAGATATCGGTACTGAAGGAGTATGTTGACCATCTGATGAGCTACGT
GGACTTCTCGAACTTCACCCGTCCACTGAAGTTGGTGGTGAACTCCGGAAACGGGGCTGCGGGGCACGTGATTGA
TGAGGTGGAGAAACGCTTCGCGGCGGCTGGGGTGCCGGTAACCTTTATCAAGGTGCATCACCAGCCGGATGGCCA
TTTCCCTAACGGTATCCCGAATCCGCTGCTGCCGGAGTGCCGCCAGGATACCGCCGACGCGGTGCGCGAGCATCA
GGCCGACATGGGGATTGCCTTTGACGGCGACTTCGATCGCTGCTTCCTGTTCGATGACGAAGCTTCGTTTATCGA
GGGGTATTACATTGTCGGCCTGCTGGCTGAGGCGTTCCTGCAGAAGCAGCCGGGAGCGAAAATCATTCACGACCC
GCGCTTGACGTGGAACACGGTAGACATCGTGACCCGCAACGGCGGCCAGCCGGTGATGTCGAAGACGGGGCATGC
GTTCATCAAGGAGCGGATGCGTCAGGAAGACGCTATCTACGGCGGGGAGATGAGTGCGCACCATTACTTCCGCGA
TTTCGCCTACTGCGATAGCGGGATGATCCCGTGGCTGCTGGTGGCGGAGCTGCTGTGTCTGAAGAACAGCTCGCT
GAAATCGCTGGTGGCGGACCGCCAGAAGGCGTTCCCTGCGTCGGGAGAGATCAACCGCAAGCTAAGTAATGCTGC
TGAGGCGATCGCCCGCATCCGGGCGCAGTATGAGCCGGCGGCTGCACACATCGACACAACGGACGGGATCAGTAT
TGAATACCCTGAATGGCGCTTTAACCTGCGCACGTCTAACACCGAGCCGGTGGTGCGTCTGAACGTTGAGTCCAG
AGCTGATGTGGCGCTTATGAATGAAAAAACGACCGAGCTGTTACACCTGTTAAGCGGGGAATAAGGTGAGAGATT
TACTAACGACGATTTATCGTTATCGGGGATTTATCTGGAGCAGTGTTAAACGTGATTTTCAGGCACGCTATCAAA
CTAGTATGCTGGGCGCACTATGGCTCGTTTTACAACCGCTCTCTATGATTCTGGTCTATACCCTGGTTTTTTCCG
AGGTGATGAAGGCAAGAATGCCCGATAATACCGGGTCGTTTGCCTATAGTATTTATCTCTGTTCCGGGGTACTGA
CCTGGGGATTATTTACTGAGATGCTGGATAAAGGTCAGAGCGTATTTATTAACAATGCTAATCTGATCAAGAAAC
TCAGTTTTCCGAAAATCTGTCTGCCGATCATCGTGACGTTATCGGCGGTGCTAAATTTCGCGATTATTTTCAGTC
TGTTTCTAATTTTTATCATTGTCACCGGTAACTTCCCCGGCTGGCTCTTTCTCTCGGTGATACCGGTCCTGCTTT
TGCAGATCCTGTTTGCCGGTGGGCTGGGGATGATCCTTGGTGTCATGAACGTCTTTTTCAGGGATGTGGGGCAAC
TGGTTGGCGTTGCGCTGCAATTCTGGTTTTGGTTCACACCCATTGTTTATGTACTGAATTCATTACCTGCATGGG
CAAAAAATCTGATGATGTATAACCCGATGACTCGGATCATGCAATCTTATCAGTCCATCTTCGCCTATCATCTGG
CCCCCAACTGGTATTCGCTATGGCCAGTATTGGCTCTCGCCATTATTTTCTGCGTCATCGGTTTCAGGATGTTCC
GCAAGCATGCGGCGGATATGGTGGATGAATTATAATGAGTTATATCAGAGTAAATAATGTCGGTAAGGCGTATCG
CCAGTATCACTCAAAGACCGGGAGACTGATCGAATGGTTATCCCCTCTGAATACCAAACGCCATAATTTGAAATG
GATCCTCCGCGATATTAATTTCGAAGTCGCTCCGGGCGAGGCTGTCGGTATTATCGGTATCAACGGTGCAGGCAA
GAGTACCCTGCTTAAACTCATAACCGGGACGTCCAGGCCGACGACTGGAGAAATTGAAATCTCCGGACGTGTCGC
TGCATTACTCGAATTGGGGATGGGGTTTCATTCTGATTTCACTGGTCGGCAGAATGTTTATATGTCTGGGCAACT
GTTGGGGTTATCGTCAGAGAAAATAACTGAACTGATGCCGCAAATTGAAGAGTTTGCTGAGATTGGGGACTATAT
CGATCAACCTGTGCGCGTCTACTCCAGTGGGATGCAAGTTCGATTAGCTTTTAGTGTAGCGACGGCTATCCGTCC
TGATGTGCTAATTATCGATGAGGCATTATCTGTTGGGGATGCATATTTCCAGCATAAAAGCTTTGAGCGTATTCG
AAAATTTCGTCAGGAAGGGACCACGCTGTTGCTGGTATCCCATGATAAACAAGCGATCCAAAGCATTTGCGACCG
GGCCATTTTATTGAATAAAGGCCAAATTGAAATGGAAGGTGAACCTGAAGCAGTGATGGATTATTACAATGCTCT
TCTGGCCGATAAACAAAATCAGTCCATTAAACAAGTTGAGCATAATGGTAAAACGCAAACTGTTTCAGGCACTGG
TGAGGTGACTATCTCTGAGGTTCATCTTCTCGATGAACAGGGCAATGTGACTGAATTTGTTTCGGTAGGGCATCG
TGTCAGCTTGCAGGTCAACGTTGAGGTCAAGGACGATATTCCTGAGCTTGTTGTCGGATATATGATTAAGGATCG
ACTTGGGCAGCCGATTTTCGGGACCAATACGTACCATCTCAATCAGACACTCACCTCCCTGAAAAAAGGAGAAAA
GCGTTCGTTCTTATTTTCTTTCGATGCGAGATTGGGGGTTGGCTCCTATTCTGTCGCTGTCGCGTTGCATACTTC
CAGTACGCACCTCGGCAAAAACTATGAATGGCGCGATCTGGCCGTGGTATTCAACGTCGTTAACACGGAACAACA
AGAGTTTGTCGGCGTGTCCTGGTTGCCGCCTGAACTGGAGATTTCTTAATGGGTTCGTCGTTTTATCGTTCATTT
GAAGAACGACACAGAGGTTCGGTTGAAGAAATCAAGCGCCGCTTGAGTTTTTATTTACCTTTTCTTGCAGGTCTG
AAGGACATTTATCCTGATGGCGTGATTGCGGATATTGGTTGCGGACGTGGCGAATGGTTGGAGATCCTGACTGAA
AATGGCATTGCGAACATCGGCGTCGATCTCGATGATGGCATGCTGGCGCGCGCCAGGGAGGCCGGACTGAATGTG
CAGAAAATGGATTGTCTGCAGTTTTTGCAAAGTCAGGCGGATCAGAGCCTGATAGCGTTGACCGGTTTTCATATT
GCTGAGCATTTGCCGTTTGAGGTCCTGCAGCAACTCGCCATGCATACCCTACGGGTGCTGAAACCAGGTGGTTTG
CTGATCCTCGAAACGCCGAACCCGGAGAATGTAAGCGTCGGCACCTGTTCATTTTATATGGATCCAACGCATAAT
CATCCTCTGCCACCGCCACTGCTTGAGTTTTTACCTATTCATTATGGTTTTACCCGAGCAATTACCGTTCGTCTG
CAGGAAAAAGAGGTTCTTCAATCTCCGGATGCAGCCGTTAATTTGGTCGATGTACTCAAAGGGGTGAGCCCCGAC
TACAGCATCATTGCTCAGAAAGCAGCGCCAACAGATATTCTTGAACGCTTTGACACCCTGTTTACCCAGCAGTAC
GGTCTGACGCTGGATGCTCTGAGCAACCGTTACGATGCGATTTTGCGCCAACAGTTTTCGTCCGTTGTCTCACGG
CTGGAGACGTTGAACCAAACCTATATGCAACAGATAAGCCAAATGTCAGAGACTATTCAGACGTTGCAAGGTGAG
GTTGACGATCTGAGTCATGTCATCGATCAGAACCATCAGCTTCATCAGCAAATGGCGGATTTACATAACAGTCGT
TCATGGCGTATTACTCAACCACTACGCTGGTTGTCTTTGCAACGTCAATTATTACGTCAGGAAGGGGCTAAAGTG
CGAGCCCGTAGGGCTGGGAAAAAAATATTGCGCAAAGGGATGGCGCTCTCGCTGGTCTTTTTCCATCGTTACCCT
AAGTCTAAGGTTTATCTGTTTAAGGTTCTGAGAAAAACTGGCTGCTATACATTGCTACAACGTTTGTTCCAACGC
GTAATGCTGGTGCAATCTGACACGATGATGATGCAGTCCAGAAGATATGATGTGGGTACTGAAGAAATGACAAGT

CGCGCGATGAGTATTTATAACGAATTAAAAAATAAAAATACGGAGAAATAACGATGCGTATTGTCATAGATTTAC
AAGGCGCACAGACGGAAAGCCGCTTTCGTGGCATCGGTCGTTATAGTATCGCAATCGCCAGAGGCATAATCAGAA
ATAACAGCCGGCATGAGATTTTCATCGCGCTATCCGCCATGCTGGATGAGTCGATTGCAAATATTAAGGCGCAAT
TTGCCGATCTCCTGCCGGCAGAAAATATAGTCGTATGGCATGCCGTAGGCCCTGTTCGTGCGATGGACCAAGGTA
ATGAATGGCGTCGGGAGAGCGCAGAACTGATTCGGGAAGCGTTTCTTGAATCATTGTGTCCAGATGTCGTTTTCA
TTACGAGTTTGTTTGAAGGTCATGTCGACGATGCGGCTACATCGGTACACAAATTTAGTCGTCAGTATAAAGTAG
CCGTACTGCACCACGATCTTATCCCCCTCGTGCAGGCGGAAACCTATCTGCAGGACGATGTATACAAACCCTACT
ATTTACAGAAAGTTGAGTGGTTAAAAAACGCTGACCTTTTGTTGACTAACTCTGCTTATACCGCACAGGAAGCGA
TCGAGCATCTGCATTTACAGGGCGATCATGTGCAGAATATTGCAGCCGCAGTCGATTCTCAGTTTTGTATGGCGG
AGGTGGCAGCGAGCGAAAAAGAGACCGTCCTTGGCCATTACGGTATTCAGCGCGAGTTCATGTTGTATGCGCCCG
GAGGATTTGACTCAAGGAAAAACTTTAAACGGTTGATTGAGGCCTATGCCGGGCTCAGTGATGCCTTACGTCGCA
GTCATCAACTGGTCATCGTCAGTAAGCTTTCCATCGGTGATCGTCAGTATCTGGAATCCCTTGCGTCAGGTAATG
GTTTACAGCAGGGCGAACTGGTACTCACTGGTTATGTGCCGGAAGATGAGCTGATCCAGCTCTATCGCCTATGTA
AGCTGTTCATCTTTGCTTCACTACATGAAGGTTTTGGGTTGCCGGTTCTGGAAGCAATGTCGTGCGGTGCGCCGG
TGATTGGCTCAAATGTCACCAGTATTCCTGAAGTCATCGGTAATCCTGAGGCATTATTCGACCCGTATTCTGTCT
CTTCCATGAGGGATAAGATCGCGCAATGTTTGACTGATGATACCTTCCTCGCGCGTCTGAAAGAAATGGCGCAGC
AGCAAGCGCGTAATTTCTCTTGGGATAAAGCTGCGGTGACTGCTCTGGAAGCTTTCGAAAAGATCGCGGTAGAAG
ACACCGGTACTGCGCAGGTTTTGCCTGAAGCTTTGATTCAGAAGATCCTTGCTATCTCACAAGGGCAGCCAGATG
ACCGCGATCTGCGCTTGTGCGCAACGGCCATTGATTACAATCTGAAAACGGCAGAACTTTATCAAATCGACGATA
AATCGCTGAACTGGCGTGTGGAAGGCCCATTCGATAGCTCATATAGTCTGGCGTTGGTCAACCGCGAATTTGCCC
GGGCACTCTCAGCCGATGGTGTAGAGGTTTTATTGCATTCCACTGAAGGACCAGGTGATTTTGCCCCAGATGCCT
CGTTTATGGCACAGTCGGAAAATAGTGATCTTCTGGCATTTTATAATCAATGTCAGACCCGCAAGAGTAACGAAA
AGATAGATATTATTAGCAGAAATATCTATCCACCGCGGGTTACCAAAATGGATGCCAAAGTAAAATTCCTTCATT
GTTATGCTTGGGAAGAAACGGGCTTTCCGCAACCGTGGATCAATGAATTTAATCGGGAACTTGACGGAGTGCTGT
GTACTTCGGAACATGTTCGTAAAATACTGATTGATAACGGACTGAATGTGCCCGCATTTGTTGTTGGCAATGGCT
GTGACCATTGGCTCAATATCCCAGCCGAGACGACAAAAGATGTGGATCACGGAACATTCCGTTTCCTGCACGTCT
CTTCTTGTTTCCCACGCAAAGGGATACAGGCAATGCTTCAGGCTTGGGGGAAGGCGTTCACTCGTCGTGACAATG
TTATCTTAATCATTAAGACTTTTAACAATCCGCACAATGAAATTGACGCATGGCTGGCTCAGGCCCAGGCTCAAT
TCATAGACTATCCCAAAGTTGAAGTGATCAAAGAGGATATGTCAGCCACCGAGCTTAAAGGGCTTTATGAAAGCT
GTGATGTTTTGGTTGCTCCAGGTTGCGCTGAAGGCTTTGGTTTACCTATTGCTGAAGCAATGCTGAGTGGGCTAC
CGGCTATCGTCACCAATTGGAGCGGGCAACTTGATTTTGTTAATTCACAAAATTCATGGCTGGTTGACTATCAGT
TCACTCGGGTAAAAACGCACTTTGGTCTGTTTTCCTCAGCCTGGGCCAGTGTGGATATTGACAACTTAACAGATG
CATTAAAAGCGGCAGCCTCAACCGATAAATCAGTGCTGCGTGACATGGCCAATGCTGGTCGCGAGCTTCTTCTGC
AGCAGTTTACCTGGAAAGCGGTGGCTGATCGTTCTTGCCAGGCGGTCAAGACTCTGCGTGCGCATATTGATATTG
CACAGCATCGGGCGCGCATTGGCTGGGTGACGACCTGGAACACGAAATGTGGGATCGCAACCTATTCCCAGCATC
TGGTGGAAAGCGCACCTCATGGCGCGGATGTTGTTTTTGCTCCCCAGGTCAGCGCTGGCGATCTTGTGTGTGCAG
ACGAAGAGTTTGTACTTCGCAACTGGATTGTAGGTAAAGAGAGCAACTATCTGGAAAACCTCCAGCCACACATTG
ATGCTCTGAGACTCGATGTCATTGTGATCCAATTCAACTATGGATTCTTTAATCATCGAGAACTGTCGGCGTTTA
TTCGTCGCCAGCATGACGCCGGTCGTTCAGTTGTTATGACGATGCACTCAACTGTGGATCCGCTGGAAAAAGAGC
CGAGCTGGAATTTCCGTCTTGCTGAAATGAAAGAGGCGCTGGCACTTTGCGACCGGTTGTTGGTGCATTCGATTG
CCGATATGAACCGCCTTAAAGATTTAGGCTTAACTGCGAATGTTGCTTTATTCCCGCACGGTGTTATCAACTACT
CCGCAGCGAGCGTCACACGTCAACAGCAGTCTTTACCGCTAATTGCGAGCTATGGCTTCTGCTTACCGCATAAGG
GCCTGATGGAACTAGTAGAATCCGTCCATAGACTCAAGCAAGCCGGTAAACCGGTTCGTTTACGACTGGTGAACG
CAGAGTATCCTGTTGGGGAGTCACGCGATCTGGTGGCAGAGCTTAAAGCTGCTGCTCAGCGGTTAGGTGTTACCG
ATCTGATTGAGATGCATAATGATTTCCTACCTGATGCGGAGAGTCTGCGGTTGCTTTCAGAAGCCGATCTTCTGA
TTTTTGCTTATCAGAATACTGGGGAGTCTGCTAGCGGGGCGGTACGTTATGGTATGGCGACTCAAAAACCTGTTG
CGGTAACGCCCCTGGCGATATTTGATGATTTGGACGATGCCGTCTTTAAATTTGATGGATGCAGCGTCGATGATA
TCAGTCAGGGGATTGACCGGATCCTGAATTCCATCCGTGAACAGAACTCTTGGGCAACCAGGACTCAACAACGTG
CCGATGCATGGCGGGAACAACATGATTATCAAGCTGTTTCACGCCGTCTGGTTAATATGTGTCAAGGCTTAGCTA
AAGCTAAATATTTTAAATAAAAATATCTCTCTTGTATTTTTTGCCTTTGAATACAAGAGGGGTTAGATAATGTGT
CATTTATTATGAAAATTATTTTTGCTACTGAGCCAATTAAATACCCATTAACGGGCATCGGTCGGTATTCCCTGG
AGCTGGTTAAGCGGCTGGCGGTCGCCCGCGAAATTGAAGAATTAAAGCTATTTCACGGTGCGTCGTTTATAGAAC
AGATCCCTTTGGTGGAGAATAAAAGCGATACCAAAGCCAGCAATCATGGTCGTCTGTCGGCGTTTCTACGCCGAC
AGACGCTGTTGATTGAGGCTTATCGCTTGCTGCATCCGCGGCGCCAGGCGTGGGCATTGCGCGACTATAAGGATT
ATATCTACCATGGCCCCAATTTTTATCTGCCGCATAAACTGGAACGCGCCGTGACCACGTTTCATGACATATCCA
TTTTTACCTGCCCGGAATATCATCCAAAAGATCGGGTTCGCTATATGGAGAAGTCCCTGCATGAGAGTCTGGATT
CGGCAAAGCTGATCCTGACCGTTTCTGATTTCTCGCGCAGTGAAATTATCCGCTTGTTCAACTATCCGGCGGAGC
GGATCGTAACCACCAAGCTAGCCTGCAGCAGTGACTATATCCCACGCAGCCCGGCAGAGTGTCTGCCGGTACTGC
AGAAATATCAGCTGGCGTGGCAGGCCTACGCGCTATATATCGGCACTATGGAGCCACGTAAAAATATCCGAGGCC
TGCTGCATGCCTATCAGCTGCTACCGATGGAGATCCGCATGCGCTATCCGCTAATCCTTAGCGGCTATCGCGGCT

GGGAAGACGATGTGCTGTGGCAGTTAGTCGAGCGCGGTACTCGGGAAGGCTGGATCCGTTACCTCGGATATGTTC
CGGATGAAGACCTGCCGTATCTGTACGCAGCGGCCAGAGTCTTTGTTTATCCCTCCTTCTACGAGGGATTCGGTT
TACCTATTCTTGAAGCGATGTCTTGCGGTGTGCCGGTAGTATGCTCCAATGTCACCTCTTTGCCTGAGGTTGTTG
GCGATGCCGGCCTCGTTGCCGATCCTAATGATATAGACGCGATTAGCGCGCAAATTTTGCAGAGCCTGCAAGATG
ATAGCTGGCGGGAAATCGCCACCGCGCGCGGTCTTGCTCAGGCGAAACAGTTTTCGTGGGAGAACTGTGCGACAC
AGACCATTAACGCCTATAAATTACTCTAAGGGTGTCAGTTGAGAGTTCTACACGTCTATAAGACTTACTATCCCG
ATACCTACGGCGGTATTGAGCAGGTCATTTATCAGCTAAGTCAGGGCTGCGCCCGCCGGGGAATCGCAGCCGATG
TTTTCACTTTTAGCCCGGACAAAGATACAGGTCCTGTCGCTTACGAAGATCATCGGGTCATTTATAATAAACAGC
TTTTTGAAATTGCCTCCACGCCGTTTTCGCTGAAAGCGTTAAAGCGTTTTAAGCTGATTAAAGATGACTACGATA
TCATCAACTACCATTTTCCGTTTCCCTTTATGGATATGCTGCATCTTTCGGCGCGGCCTGACGCCAGGACTGTGG
TGACCTATCACTCTGATATAGTGAAACAAAAACGGTTAATGAAGCTGTACCAGCCGCTGCAGGAGCGATTTCTCA
GCGGCGTAGATTGCATCGTTGCCTCGTCGCCCAATTACGTGGCTTCCAGCCAGACCCTGAAAAAATATCTGGATA
AAACGGTGGTGATCCCGTTTGGTCTGGAGCAGCAGGACGTGCAGCACGATCCGCAGAGGGTCGCGCACTGGCGGG
AAACTGTCGGCGATAAGTTCTTTCTCTTCGTCGGCACTTTCCGCTACTACAAAGGGCTGCATATTCTGATGGATG
CCGCTGAGCGTAGCCGACTGCCAGTGGTGGTTGTAGGGGGCGGGCCGCTGGAATCGGAAGTGCGGCGTGAAGCGC
AGCAGCGCGGGCTGAGCAATGTGATGTTTACCGGCATGCTCAACGACGAAGATAAGTACATTCTCTTCCAGCTCT
GCCGGGGCGTGGTATTCCCCTCGCATCTGCGCTCTGAGGCGTTTGGCATTACGTTATTGGAAGGCGCACGCTTTG
CAAGGCCGCTGATCTCTTGCGAGATCGGTACAGGTACCTCTTTCATTAACCAGGACAAAGTGAGTGGTTGCGTGA
TTCCGCCGAATGATAGCCAGGCGCTGGTGGAGGCGATGAATGAGCTCTGGAATAACGAGGAAACCTCCAACCGCT
ATGGCGAAAACTCGCGTCGTCGTTTTGAAGAGATGTTTACTGCCGACCATATGATTGACGCCTATGTCAATCTCT
ACACTACATTGCTGGAAAGCAAATCCTGAGCGGCCGCGAGCTCGTCGACTCGAGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTG
CTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGGATAAAG
CCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTCCAG
GCCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGT
ATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCGCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCC
CGTGAGAAGACGGAAGAAGTGATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAAACTGGTTCCTTACTATACGGTGAAAGAGTTT
GTCGAATCTCTGGAAACGCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGAT
TCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATTGATGGTGGTAACACCTTCTTCCAGGACACTATTCGT
CGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTTAACTTCATCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTG
AAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTGGTAGCACCGATCCTGACCAAAATCGCC
GCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGCCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTT
CACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTC
ACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGAATAACGGTGAACTGAGCAGTTACCTGATCGACATCACC
AAAGATATCTTCACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAA
GGTACCGGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGCTGTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTTT
GCACGTTATATCTCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTTGCCGCATCTAAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCA
GCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTCGTGCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCCAG
GGCTTCTCTCAGCTGCGTGCTGCGTCTGAAGAGTACAACTGGGATCTGAACTACGGCGAAATCGCGAAGATTTTC
CGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCTGCAGAAAATCACCGATGCTTATGCCGAAAATCCACAGATCGCT
AACCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAATTGCCGATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGATGTCGTTGCTTAT
GCAGTACAGAACGGTATTCCGGTTCCGACCTTCTCCGCAGCGGTTGCCTATTACGACAGCTACCGTGCTGCTGTT
CTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTGACTATTTTGGTGCGCATACTTATAAGCGTATTGATAAAGAAGGT
GTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

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

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCGATACCC
AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAA
GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA
CTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG
AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCA
TTTGTCGTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATG
ATTGCACGTTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCC
GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGAT
CAGCCGCAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTCGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAACTG
GAACGTACTCAGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCC
GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG
TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA

TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAA
TCTTCCTGCCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA
GGATTTTCCTTGTTTCCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA
ACGCTCGTCACATCATAGGCATGCATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC
CTCTATTAATCAAACTGAGAGCCGCTTATTTCACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGCTAGCATG
AGCAAAACTAAACTAAATGTTCTTTACCTTGCAATAAGTCAGGGTGCCAATTACCTACTGCCATTATTAATTTTT
CCTTATCTTGTTAGAGTCATTGGTGTATCGAATTTTGGTGATCTGAGTTTTTCATTGATAACTATACAAGTGTTG
TTAATGGTTGTTGAATATGGTTTTGGATATAGTGGACAAGAGAAATAGCACTAAATAACGATAAAAAATACCAT
TCTGAATTTTTTTGCGGTGTGGTGCTTGCTCGTTTTATATTAATGCTAATTGCAGCTATAATACTCATAATACTC
TGTTTTTTTTATGTTTTTAACGACGTTAAGTCTTTGTTATGTGTTGGTTTTCTGTCCGTAATTGCAGGTGTTTTC
AATCCAAATTGGTTTTTGCAAGGTAAGGAAATGATGAGTGTGATGGCTGTGCTGTCACTATTTTCACGAGGCATA
GCAGTCGTTGCAGTTTATCTAATTATAAAACCCGCAACGCCGATGTACATCAGTGCCTTATTATTGAGCATGCCA
TATATTTTGTATTCATTCTGTGGCGTTGCCTACTTACTTATTATCAAGGAGATTTTTTTATGTAGGCCACCGATA
AAGAAAATTCAAGTAATTTTAAAAAATGGATTTCATTTTTTTTGTTCAACACTTGCGACTAGTGCATACACAATG
TTGACCCCTCTTGTATTGGGTGGCGTATCTGGAAAGTTTGATGTAGGCATCTTTAACTCAGCTAACATGATCAAA
CAAGGTTTGGCTGGACTTGCATCACCATTAGTCCAAGCTTTTTATCCAAGAATTAACATTTTGCAAAGAGAGAAT
CCATATATTGCAAACTTAAAATCTAGAATGATTCTTAAATACTTGCTTGTTTTTTACATGGCTTTAGCAATACCA
TTTTTACTTTTTGCCAACCAATTATCATTATTAATATTCGGCATGAAAGGTGAAGTAATTGCAGGTGCAATGCAA
TTAATGACATTGCTTCCTATATTCATAGGTTTTAATACAGTTGTCGGGTTACTTGTATTAGTACCTAATGGGATG
CAAAAACAGTATTTCAAATCTATTTTCCTAGGAACTATTACTTGTTTAAGCATAGTTTATCCAGCATGTAAATAT
TATGGAGCAACGGGTGCGATTGTGAGTCTTATTGTAGCTGAAATTTTCGTTGGCATGGGAATGCTTAAACAATTC
ATTAAAGTAAATAAAACCGTATGTAGGCCTCATAAATTATGAATATCTCGGTAATAATATCTGTTTGGAAACGCC
CAGTTCAATTAGAATTGATTCTCTCTGAGCTCGATTCTCAGGCTAAAGACAATAGTCTACACCTAGAAGTAATTG
TTTCCGATAGTCATAGTGGTAAAGAAATTGATGATGTAGTTGCTGATAATATTCATAAAAAGAAAAATATTAATA
TTATCCATCAACATACTAAAAATATACTCTCCGCTAAGCGCAATTTCGGAGCATCCCTAGCCCATGGGGATTATT
TAATATTTCTTGATGATGATTGTATACCCGCAAGTGGATATATATCATCGTTGCTGAACTATTTAAAAAAAATGA
ATAGTAAAAGCGTTTTATGTGGGGAAGTTAGATTCGAAAATGAACTCATTGAGACCAGCAATTACTATCGCTACA
GGAACTCTTTACACCCTAAGTTTAGTGATAGTCCTGATATCTCTATGAATGCCTGGACTTTTGTCGCAATGAATT
GTGTTCTTGATAGAAAGGCATTTTCATCAGGTATAGTTTCATATAATGAAAATTTTATTGGTTATGGTTGTGAAG
ATCATGAGTTTGGGTGGCAACTTGAAAAAAATGACTTCAAAATTATTTTTGCTGATTTTAAAATATTACATCACG
AATACAGTGGCGATATAGAAGGATATACAAAAAAAATTCGTGCTACAGCACGTGATGGTATGAATGTATTAAGCA
AAGTAAGGCCTGAAATGTTTTCTACTAATAAAAAATTATTCCTAGTTGAGAAAATATTTAGTAAACACAAAACGT
TTAGTAAAATATGCCAATCAATATTTTTCAATAAATTTATTTTTAAAAAAATAATACAATTTTTAAAAAAAACAG
ATGCAAATAAAAAACTCTATTTCCCAATTCTTTACAGATATGTGTTGATTTCGGCATATATACATGGTATTGGAG
AGCGTGGCACCTCAAAAACAGATGATTTGCTTAAGAACTGGTATATATAGATGATGCTATCTTCATTTATTAAGA
CATTTGTATGGAAGGTAAAAAACAATGAAGTATAATGCATTGATGGCTTTTTTATTATTTTTTGTTGTTTTTTTT
AGATTGTCGCTGATAATACCTTTCTTATATTTGGCATTTATTCCTGCATTTTTTGGTATTATGTATTTAGTGCGT
AATTTTATGATTACTATGGGCAATGGATTGGTATCTATAGATCGTAAAAATTTGTTGCTGTTATCTATATTCATA
ATTATTTTTTTATTTTGTTTGGTTTTCGATTTGTTTCAAAAAAGCCATTCTTTTCAAAGTTATTTTACCGTTAGA
TTATTTATGTTGTTTTTATTTTCATTTGTTCCTGCGTATTATTTAGTAAATAGATTCATAAAGGGTGACTTGAAA
TTAATGGAGCGAATATTAGTGTATTCTCTCTGGGTTCAAATAGTTATTTTTTTTGGTATGTATATAAGTCCAGAG
TTAAAAAGATTGTTATATACTTTCTTTGGTATGTCTGACTCTGTTAATCTTTGGGAACAAAATGCTAAAGTAAGA
GGATTTGGGTTGTCGGGTGAAATAAATTTCATGACACCATTTTTGATGATCTATATGTCATTTTTTATGATGAAA
AGGCGTTATGCTTTAATTACTTTAATTTGTCTGACTCAAATCGTAAATTCTAACATGGCTGTGATTGCAGCCATT
ATTGGTATCGGTTGCTCTAGACTTAATATTAATATAAAAATTGCAACAGTATTGATTTTGGGAGTTTTAGTTTAT
AGCTTAGGAGCGGTGTTCTTTCCTCGATTTTATGATGAGTTCGTTTCTGGAGATGGCACAAGAACTCTGGATATC
TTATTACAGCAACATGTGTTTGTTGTAGGTAATTTAGATTTTTTTAATATTATATTTGGATTACAGCAAAACATA
TCTTCATCAATCCCCGATATTAAACAAAGTTCGGATATGGGCTGGGTTATACTGTTTAATTACGGTGGGTTAACA
TTTATTACACTCTTTTTATTTTTAATCTTTACTATTTCTATTGCGACATTTGGAATGACATATCAAGCAATTATA
TGGATGTTAATTGGGATAATTTTCAATACCAAAGGTTTAGTTTTAGGATCTAACGGCTATTTCTTTCTATCTTTT
ATATATATGTTTTTGAATAGAGTAACACTTAGTGGACAGAGTTCAATTACTAATAAGTTAGGTCAAGTAAGTAAA
TAGCTTCCAGAGTATATTTGTCAATGATTTGAGGTTCGGTTATTATGTTTTCATCTAAAACACTGTTAATTACTG
GTGGTACTGGCTCTTTCGGGAATGCTGTATTAAATAGATTTCTTGATACAGATATTGCAGAAATCCGTATATTTA
GTCGTGATGAAAAAAAACAAGATGATATGCGGAAAAAATACAATAATCAAAAATTAAAGTTCTATATTGGTGATG
TCAGAGATTACCGTAGTATTTTGAATGCGACTCGCGGTGTTGATTTTATATATCATGCAGCGGCACTTAAGCAAG
TTCCATCATGTGAATTTCATCCTATGGAAGCCGTTAAAACTAATATCCTTGGTACGGAAAATGTTCTTGAAGCAG
CTATAGCGAATGAAGTGAAGAGGGTTGTATGCCTAAGTACTGATAAAGCTGTATACCCGATTAACGCAATGGGTA
TTTCAAAAGCTATGATGGAAAAGGTCATGGTCGCGAAATCCCGTAATGTTGATCGCAATAAAACAGTAATATGTG
GTACCCGTTATGGGAATGTTATGGCATCTCGCGGTTCAGTTATTCCATTATTTGTTGATCTTATTAGAGCGGGCA
AGCCACTCACAATAACTGATCCTAATATGACCCGCTTTATGATGACTCTTGAGGATGCGGTAGATTTAGTTCTT

ATGCGTTTGAACATGGTAATAATGGTGATATCTTTGTGCAAAAAGCACCTGCAGCAACTATTGACACATTAGCTA
TTGCTTTAAAGGAATTACTAAATGTTCCTGACCATCCGGTAAATGTCATTGGAACGCGTCATGGCGAGAAATTAT
ATGAAGCTCTACTTAGTCGTGAGGAAATGATCGCTGCTATAGATATGGGCGATTATTACCGTGTCCCGCCAGATC
TTCGTGACCTTAATTATGGCAAATATGTTGAGCAAGGTGATAGCCGAATATCTGAAATAGAAGATTATAACTCTC
ATAATACTCAACGGTTAGATGTTGAAGGCATGAAAGAGCTCTTGCTAAAATTAGCCTTTATTCGAGCAATTCGTG
CTGGTGAAAAATATAATCTGGATTCATGATATGAAAATATTAGTTACTGGTGCAAATGGTTTTATTGGTCGTAAT
TTATGTTTGAGGCTTGAGGAACTTGGTTATAAAGATCTTATTAGAATTGATCGAGAATCAACGAAGCAAGATCTT
GAACAAGGCTTACAGGATGCCGATTTTATTTATCACTTAGCTGGTATCAATAGACCTAAGACTGATGATGAGTTT
ATTTCTGGAAACAGTGATTTAACAAAGCATATAGTTGAGTATCTCCTTTCTATTGGTAAGAATACACCAATTATG
CTAAGTTCTTCGATACAAGCTGAACTTAATAATGCTTATGGGGTTAGCAAAGCTGTAGCTGAAAGCTATGTCGAA
AAATATGCTGCTGCTAGTGGTTCTTCGTATTATATTTTCAGATATCCAAACGTTTTTGGTAAATGGTGTAAGCCA
AACTATAATTCTTTTATAGCAACTTTTTGCTACAATATTTCCAATGATATTGAGATTACTATCAATGATGCAGCA
GCGCCAGTCAATCTGGTCTATATTGATGATGTTTGTACTGATGCTATAGCTCTTCTCTCTGGGACGGTTGAAAGT
GGATATAAAGTTGTTGCACCAATTTATTCAACAACAGTTGGTGAAGTTGCAGAATTAATTTATAGCTTCAAAAAT
AGCCGTTCCACCCTGATCACAGAGGCTGTCGGGGCGGGATTTACCCGTGCATTGTATTCTACATGGCTGAGTTAT
TTACCAGCAGAGAAGTTTGCGTACAAGGTACCTTTTTATGGGGATGCCCGCGGAGTCTTTTGTGAGATGTTGAAA
ACGCCTTCAGCGGGGCAGTTTTCATTTTTTACTGCTCACCCTGGTATTACGCGTGGCGGACATTACCATCACAGT
AAAAATGAGAAGTTTTTGGTCATTCGAGGTCAGGCATGCTTTAAATTTGAACATGTGATTACCGGTGAGCGATAT
GAACTGAAAGTTTCATCGGGTGAGTTTAAGATTGTTGAAACAGTTCCTGGTTGGACACATGACATTACAAATATT
GGAACTGATGAATTAATAGTCATGCTCTGGGCAAATGAAATTTTCAACCGTGATGAGCCCGATACTATTGCGAGA
CCTCTATAATGAAAAAATTAAAAGTTATGTCTGTTGTTGGAACCCGTCCTGAGATTATCCGTTTGTCGAGGGTTC
TTGCTAAGTTTGATGAATACTGCGAGCATATTATTGTCCATACTGGTCAAAATTATGATTACGAATTAAATGAAG
TGTTCTTCAATGACTTGGGTGTTCGAAAACCTGATTATTTTTTAAATGCAGCGGGTAAAAATGCGGCGGAAACCA
TTGGTCAGGTTATTATTAAGGTAGATGAAGTATTAGAAATCGAAAAACCTGAAGCAATACTGGTATTGGGCGATA
CGAATTCATGTATTTCTGCCATTCCGGCCAAACGCCGTAAAGTGCCTATATTTCATATGGAAGCAGGTAACCGTT
GTTTCGATCAACGCGTGCCTGAAGAAACCAACAGACGTATTGTTGACCATACGGCTGATATCAATATGACCTACA
GTGATATTGCTCGTGAATATCTCTTGGCTGAAGGTATCCCAGCTGATCGGATCATAAAAACTGGTAGCCCTATGT
TTGAGGTTCTTTCATATTATATGCCCCAAATTGATGGTTCAGATGTGCTATCGCGTTTGAATCTACAGTCTGGTG
AGTTTTTTGTAGTAAGTGCGCATCGTGAAGAGAATGTTGATTCTCCAAAACAGCTCGTAAAGCTTGCGAACATTC
TAAATACTGTTGCTGAAAAATATAATCTTCCAGTTATTGTCTCCACACACCCAAGGACACGTAACCGAATCCGTG
AGCAAGGAATTGAATTTCATTCAAATATAAATCTACTGAAACCATTGGGTTTCCATGATTATAACCACTTGCAGA
AGAACTCACGAGCTGTGCTTTCAGATAGCGGTACTATCACTGAAGAGTCATCCATCATGAATTTCCCAGCGGTAA
ACATCCGGGAAGCGCATGAGCGTCCGGAAGGCTTTGAGGAAGCATCCGTCATGATGGTGGGGTTAGAGTGTGAAC
GCGTATTACAAGCGCTGGATATTCTGGCAACACAACCGCGAGGTGAAGTCCGTCTTTTACGTCAGGTTAGTGATT
ACAGCATGCCAAATGTGTCGGATAAAGTTGTCAGAATTGTTCACTCTTACACAGATTATGTTAAGAGAGTCGTCT
GGAAAGAATATTGATGAAACTTGCTTTAATCATAGATGATTACCTGCCCAACAGTACTCGTGTTGGTGCAAAAAT
GTTTCATGAACTTGCTCAAGAATTTATCCAGCGTGGGCACGATGTTACGGTAATTACTCCTGGTACGGGCATGCA
AGAAGAGATTTCTTTTGATACCTTTCAGGGGGTAAAAACATGGCGTTTTAAAAGCGGGCCGCTCAAGGATGTAAG
TAAAATTCAGCGAGCGGTCAATGAAACGCTTTTGTCCTATCGGGCGTGGAAAGCCATCAAAAAATGGGTAAAAAA
AGAGACCTTTGAGGGGGTGATTTATTATTCACCTTCCATATTCTGGGGGCCTTTAGTTAAAAAAATTAAAGCTCG
TTGCCAATGTCCTGCTTATCTTATTTTAAGAGATATGTTTCCACAATGGGTAATTGATGCAGGAATGCTTAATGC
TGGTTCCCCAATAGAACGCTACTTTCGTCTTTTTGAAAAAATATCTTATCGTCAGGCAAATCGTATTGGACTTAT
GTCTGATAAGAATCTTGATGTTTTTCGGAAAGATAATAAAGGCTATCCGTGCGAAGTTTTGCGTAATTGGGCATC
CCTAACACCAACGATCATACCCAAGGATTATATACCACTACGTAAGCGACTTGGCCTAGAGGATAAAACCATTTT
CTTCTATGGTGGAAACATAGGTCATGCACAGGACATGACAAACTTGATGCGACTTGTGAGAAACATGGCAGCATA
TCCTCAAGCTCATTTCCTATTTATTGGCCAGGGGGATGAAGTTGAATTAATTAATTCATTAGCATCTGAGTGGGC
ATTGACGAATTTCACCTATTTGCCCTCGGTTAACCAAGATGAATTTAAGTTCATTTTGTCGGAAATGGATATCGG
CTTGTTTTCTCTTTCCGCTAGACACTCTTCCCATAATTTTCCTGGTAAGTTATTAGGCTATATGGTTCAGTCGCT
ACCTATTTTAGGTAGCGTAAATGCCGGAAATGATTTGCTCGACATTGTCAATCAAAATAATGCGGGATTAATCCA
TGTCAATGGTGAGGACGATAAATTATGTCAATCTGCGCTATTAATGTTGCATGATATTGATGTGCGCCGGCAACT
TGGTTCGGGGGCGAATATATTGTTGAAAGAACAATTCTCCGTTGAGTCTGCGGCACAGACGATAGAAATGAGGTT
GGAGGCATGCAATGCGATTAATTGATAATGACCAACTCGACGAATTATATGATCAAGCCGGGCAATCGGAACGTT
TACGTTCCCACCTTATGATGCACGGCTCGCATCAAGAAAAGGTACAGCGTTTACTTATTGCATTAGTAAAGGGCA
GCTATGTTGAACCGCATTATCACGAACTTCCTCATCAGTGGGAAATGTTCATTGTTATGGAGGGGCAACTTCAGG
TTTGTTTGTATGGTAGAAATGGTGAGGTTATAAAGCAATTTATAGCAGGAGATAATACTGGAATGAGCATTGTGG
AGTTTTCTCCGGGCGATATACACAGTGTCGAATGCCTATCTCCGCGTGCTCTTATGGTGGAAGTTAAGGAGGGGC
CATTTGACCCTTCTTTTGCAAAATCGTTCGTGTGAGCGGCCGCGAGCTCGTCGACTCGAGGATCCGTGTAGGCTG
GAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGG
ATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACA
TTCCAGGCCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTA

GTCGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCGCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAAC
CGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGAAGTGATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAAACTGGTTCCTTACTATACGGTGAAA
GAGTTTGTCGAATCTCTGGAAACGCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCT
ATTGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATTGATGGTGGTAACACCTTCTTCCAGGACACT
ATTCGTCGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTTAACTTCATCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGG
GCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTGGTAGCACCGATCCTGACCAAA
ATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGCCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAG
ATGGTTCACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTG
AACCTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGAATAACGGTGAACTGAGCAGTTACCTGATCGAC
ATCACCAAAGATATCTTCACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCT
AACAAAGGTACCGGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGCTGTCGCTGATTACCGAGTCT
GTGTTTGCACGTTATATCTCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTTGCCGCATCTAAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCA
CAGCCAGCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTCGTGCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTAC
GCCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGCTGCGTCTGAAGAGTACAACTGGGATCTGAACTACGGCGAAATCGCGAAG
ATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCTGCAGAAAATCACCGATGCTTATGCCGAAAATCCACAG
ATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAATTGCCGATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGATGTCGTT
GCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCCGGTTCCGACCTTCTCCGCAGCGGTTGCCTATTACGACAGCTACCGTGCT
GCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTGACTATTTTGGTGCGCATACTTATAAGCGTATTGATAAA
GAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

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

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCGATACCC
AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAA
GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA
CTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG
AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCA
TTTGTCGTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATG
ATTGCACGTTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCC
GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGAT
CAGCCGCAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTCGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAACTG
GAACGTACTCAGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCC
GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG
TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA
TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAA
TCTTCCTGCCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA
GGATTTTCCTTGTTTCCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA
ACGCTCGTCACATCATAGGCATGCATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC
CTCTATTAATCAAACTGAGAGCCGCTTATTTCACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGTGAAAATA
CTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTGGTTCAGCTGTAGTTCGTCACATTATAAATAATACGCAGGATAGTGTT
GTTAATGTCGATAAATTAACGTACGCCGGAAACCGGGAATCACTTGCTGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATGTT
TTTGAACATGCGGATATTTGCGATGCACCTGCAATGGCACGGATTTTTGCTCAGCATCAGCCGGATGCAGTGATG
CACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTTGGT
ACTTATGTCCTTTTGGAAGCCGCTCGCAATTACTGGTCTGCTCTTGATAGCGACAAGAAAAATAGCTTCCGTTTT
CATCATATTTCTACTGACGAAGTCTATGGTGATTTGCCTCATCCAGATGAAGTAAATAATACAGAAGAATTACCC
TTATTTACTGAGACGACAGCTTACGCGCCAAGCAGCCCTTATTCCGCATCCAAAGCATCCAGCGATCATTTAGTC
CGCGCGTGGAAACGTACATATGGTTTACCGACAATTGTGACTAATTGCTCGAACAACTATGGTCCTTATCATTTC
CCGGAAAAGCTTATTCCACTGGTTATTCTTAATGCACTGGAAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAAAGGAGAT
CAGATCCGCGACTGGTTGTATGTTGAAGATCATGCGCGTGCGTTATATACCGTCGTAACCGAAGGTAAAGCGGGT
GAAACTTATAACATTGGTGGGCACAACGAAAAGAAAAACATCGATGTAGTGCTCACTATTTGTGATTTGCTGGAT
GAGATTGTACCGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAAATCACTTATGTTGCTGATCGTCCGGGACACGATCGCCGC
TATGCTATTGATGCTGAGAAGATTGGTCGCGCATTGGGATGGAAACCACAGGAAACGTTTGAGAGCGGGATTCGT
AAAACGGTGGAATGGTACCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAATGTGAAAAGTGGTGCCTATCAATCGTGGATT
GAACAGAACTATGAGGGCCGCCAGTAATGAATATCCTCCTTTTTGGCAAAACAGGGCAGGTAGGTTGGGAACTAC
AGCGTGCTCTGGCACCTTTGGGTAATTTGATTGCTTTTGATGTTCACTCTACTGATTATTGCGGTGATTTTAGTA
ATCCTGAAGGTGTAGCTGAAACCGTAAGAAGCATTCGGCCGGATATTATTGTCAATGCAGCCGCTCACACCGCAG
TAGACAAAGCAGAATCAGAACCGGAGTTTGCACAATTAATTAACGCAACAAGTGTCGAAGCGATTGCGAAAGCAG
CAAATGAAGTTGGAGCCTGGGTTATCCATTACTCGACTGATTACGTCTTCCCTGGAAATGGCGATATGCCATGGC

TGGAGACGGATGCAACCGCACCACTAAATGTTTACGGTGAAACCAAGTTAGCCGGAGAAAAAGCGTTACAGGAAT
ATTGCGCGAAGCATCTTATTTTCCGGACCAGCTGGGTCTATGCAGGAAAAGGAAATAACTTCGCCAAAACGATGT
TACGTCTGGCAAAAGAGCGTGAAGAATTAGCGGTTATTAACGATCAGTTTGGTGCGCCAACAGGTGCTGAACTGC
TGGCTGATTGTACAGCACATGCCATTCGTGTCGCACTGAATAAACCGGATGTCGCAGGCTTGTACCATTTGGTAG
CCAGTGGTACCACAACCTGGTACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGCATTCCCCTTG
CACTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAACAACAGCCTATCCTACACCAGCTCGTCGTCCACATAACTCTCGCCTTA
ATACAGAAAAATTTCAGCAGAACTTTGCGCTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTTGGCGTGAAACGAATGCTCAATG
AATTATTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTGATGGTGGAGCAAGATGAATTAAAAGGA
ATGATGAAATGAAAATGCGTAAAGGTATTATTTTAGCGGGTGGTTCTGGTACACGTCTTTATCCTGTGACTATGG
CTGTCAGTAAACAGCTATTACCTATTTATGATAAACCGATGATCTATTACCCGCTCTCTACACTGATGTTGGCGG
GTATTCGCGATATTTTGATTATCAGTACACCTCAGGATACTCCTCGTTTTCAACAATTGCTGGGTGACGGTAGCC
AGTGGGGCCTGAATCTTCAGTACAAAGTGCAACCTAGCCCAGATGGCCTCGCGCAGGCATTTATCATCGGTGAAG
AGTTTATTGGTGGTGATGATTGTGCTTTGGTTCTTGGTGATAATATCTTTTACGGTCACGATCTGCCGAAGCTAA
TGGAGGCCGCTGTTAACAAAGAAAGTGGTGCAACGGTATTTGCCTATCACGTTAATGATCCAGAACGCTATGGTG
TCGTTGAGTTTGATAAAAACGGTACGGCAATCAGTCTGGAAGAAAAACCGTTAGAACCAAAGAGTAATTACGCCG
TTACAGGTCTGTACTTTTATGATAACGACGTGGTTCAGATGGCGAAAAACTTGAAGCCGTCTGCACGTGGTGAGT
TAGAAATTACAGATATTAACCGTATTTATCTTGAGCAGGGACGTCTGTCTGTCGCGATGATGGGGCGTGGCTACG
CGTGGCTGGACACGGGGACTCATCAGAGTCTGATAGAAGCAAGTAATTTTATTGCGACAATTGAAGAGCGCCAGG
GATTGAAGGTTTCCTGTCCTGAAGAGATTGCATTTCGTAAAGGTTTTATTGATGTTGAGCAAGTAAGAAAATTAG
CTGTACCACTAATAAAGAATAATTATGGGCAGTATCTTTATAAAATGACGAAGGATTCAAATTAATGAATGTGAT
TAGAACTGAAATTGAAGATGTGCTAATTCTGGAGCCAAGAGTATTTGGTGATGATAGAGGTTTCTTTTATGAGAG
CTTTAATCAATCAGCATTTGAACATATTCTAGGCTATCCGGTCAGCTTTGTTCAAGACAATCACTCACGTTCATC
AAAAAATGTACTCAGAGGCCTTCACTTTCAACGCGGCGAGTACGCACAAGATAAACTTGTACGCTGCACTCATGG
AGCAGTTTTTGATGTTGCTGTTGATATTCGACCCAATTCGGTATCCTTTGGTAAATGGGTTGGTGTTCTGCTTTC
AGCTGATAATAAGCAGCAGTTGTGGATACCAAAAGGGTTTGCTCATGGCTTTTTGGTTCTGTCTGATATCGCTGA
ATTTCAATATAAAACTACAAACTATTATCATCCTGAAAGCGATTGTGGAATATGTTGGAATGATGAACGCATTGC
AATTGATTGGCCCCAAACATCAGGGTTAATCCTTTCGCCAAAAGATGAAAGGCTCTTTACGTTAGATGAGCTTAT
CAGATTAAAATTAATTGCATGAATACGAATAAATTATCTTTAAGAAGAAACGTTATATATCTGGCTGTCGTTCAA
GGTAGCAATTATCTTTTACCATTGCTTACATTTCCATATCTTGTAAGAACACTTGGTCCTGAAAATTTCGGTATA
TTCGGTTTTTGCCAAGCGACTATGCTATATATGATAATGTTTGTTGAATATGGTTTCAATCTCACAGCAACTCAG
AGTATTGCCAAAGCAGCAGATAGTAAAGATAAAGTAACGTCTATTTTTTGGGCGGTGATATTTTCAAAAATAGTT
CTTATCGTCATTACATTGATTTTCTTAACGTCGATGACCTTGCTTGTTCCTGAATATAACAAGCATGCCGTAATT
ATATGGTCGTTTGTTCCTGCATTAGTCGGGAATTTAATCTACCCTATCTGGCTGTTTCAGGGAAAAGAAAAAATG
AAATGGCTGACTTTAAGTAGTATTTTATCCCGCTTGGCTATTATCCCTCTAACATTTATTTTTGTGAACACAAAG
TCAGATATAGCAATTGCCGGTTTTATTCAGTCAAGTGCAAATCTGGTTGCTGGAATTATTGCACTAGCTATCGTT
GTTCATGAAGGTTGGATTGGTAAAGTTACGCTATCATTACATAATGTGCGTCGATCTTTAGCAGACGGTTTTCAT
GTTTTTATTTCCACATCTGCTATTAGTTTATATTCTACGGGAATAGTTATTATCCTGGGATTTATATCTGGACCA
ACGTCCGTAGGGAATTTTAATGCGGCCAATACTATAAGAAACGCGCTTCAAGGGCTATTAAATCCTATCACCCAA
GCAATATACCCAAGAATATCAAGTACGCTTGTTCTTAATCGTGTGAAGGGTGTGATTTTAATTAAAAAATCATTG
ACCTGCTTGAGTTTGATTGGTGGTGCTTTTTCATTAATTCTGCTCTTGGGTGCATCTATACTAGTAAAAATAAGT
ATAGGGCCGGGATATGATAATGCAGTGATTGTGCTAATGATTATATCGCCTCTGCCTTTTCTTATTTCATTAAGT
AATGTCTATGGCATTCAAGTTATGCTGACCCATAATTATAAGAAAGAATTCAGTAAGATTTTAATCGCTGCGGGT
TTGTTGAGTTTGTTGTTGATTTTTCCGCTAACAACTCTTTTTAAAGAGATTGGTGCAGCAATAACATTGCTTGCA
ACAGAGTGCTTAGTTACGTCACTCATGCTGATGTTCGTAAGAAATAATAAATTACTGGTTTGCTGAGGATTTTAT
GTACGATTATATCATTGTTGGTTCTGGTTTGTTTGGTGCCGTTTGTGCGAATGAGTTAAAAAAGCTAAACAAAAA
AGTTTTAGTGATTGAGAAAAGAAATCATATCGGTGGAAATGCGTACACAGAGGACTGTGAGGGTATCCAGATTCA
TAAATATGGTGCACATATTTTTCATACCAATGATAAATATATATGGGATTACGTTAATGATTTAGTAGAATTTAA
TCGTTTTACTAATTCTCCACTGGCGATTTATAAAGACAAATTATTCAACCTTCCTTTTAATATGAATACTTTCCA
CCAAATGTGGGGAGTTAAAGATCCTCAAGAAGCTCAAAATATCATTAATGCTCAGAAAAAAAAGTATGGTGACAA
GGTACCTGAAAATTTGGAGGAGCAGGCGATTTCATTAGTTGGGGAGGACTTATACCAAGCATTGATAAAGGGTTA
TACGGAGAAGCAGTGGGGAAGAAGTGCAAAAGAATTGCCTGCATTTATTATTAAGCGAATCCCAGTGAGATTTAC
GTTTGATAACAATTATTTTTCCGATCGCTATCAAGGTATTCCGGTGGGAGGCTACACTAAGCTTATTGAAAAAAT
GCTTGAAGGTGTGGACGTAAAATTAGGCATTGATTTTTTGAAAGACAAAGATTCTCTAGCGAGTAAAGCCCATAG
AATCATCTACACTGGACCCATTGATCAGTACTTCGACTATAGGTTTGGAGCGTTAGAATATCGCTCTTTAAAATT
TGAGACGGAACGCCATGAATTTCCAAACTTCCAAGGGAATGCAGTAATAAATTTCACTGATGCTAATGTACCATA
TACCAGAATAATTGAGCATAAACATTTTGACTATGTTGAGACAAAGCATACGGTTGTTACAAAAGAATATCCATT
AGAGTGGAAAGTTGGCGACGAACCCTACTATCCAGTTAATGATAATAAAAACATGGAGCTTTTTAAGAAATATAG
AGAGTTAGCTAGCAGAGAAGACAAGGTTATATTTGGCGGGCGTTTGGCCGAGTATAAATATTATGATATGCATCA
AGTGATATCTGCCGCTCTTTATCAAGTGAAAAATATAATGAGTACGGATTAATGATCTATCTTGTAATTAGTGTC
TTTCTCATTACAGCATTTATCTGTTTATATCTTAAGAAGGATATATTTTATCCAGCCGTATGCGTTAATATCATC

TTCGCACTGGTCTTATTGGGATATGAAATAACGTCAGATATATATGCTTTTCAGTTAAATGACGCTACGTTGATT
TTTCTACTTTGCAATGTTTTGACATTTACCCTGTCATGTTTATTGACGGAAAGTGTATTAGATCTAAATATCAGA
AAAGTCAATAATGCTATTTATAGCATACCATCGAAGAAAGTGCATAATGTAGGCTTGTTAGTTATTTCTTTTTCG
ATGATATATATATGCATGAGGTTAAGTAACTACCAGTTCGGGACTAGCTTACTTAGCTATATGAATTTGATAAGA
GATGCTGATGTTGAAGACACATCAAGAAATTTCTCAGCATACATGCAGCCAATCATTCTAACTACTTTTGCTTTA
TTTATTTGGTCTAAAAAATTTACTAATACAAAGGTAAGTAAAACATTTACTTTACTTGTTTTTATTGTATTCATC
TTTGCAATTATACTGAATACTGGTAAGCAAATTGTCTTTATGGTTATCATCTCTTATGCATTCATCGTAGGTGTT
AATAGAGTAAAACATTATGTTTATCTTATTACAGCTGTAGGTGTTCTATTCTCCTTGTATATGCTCTTTTTACGT
GGACTGCCTGGGGGGATGGCATATTATCTATCCATGTATTTGGTCAGCCCTATAATCGCGTTTCAGGAGTTTTAT
TTTCAGCAAGTATCTAACTCTGCCAGTTCTCATGTCTTTTGGTTTTTTGAAAGGCTGATGGGGCTATTAACAGGT
GGAGTCTCTATGTCGTTGCATAAAGAATTTGTGTGGGTGGGTTTGCCAACAAATGTTTATACTGCTTTTTCGGAT
TATGTTTATATTTCCGCGGAGCTAAGCTATTTGATGATGGTTATTCATGGCTGTATTTCAGGTGTTTTATGGAGA
TTGTCTCGAAATTACATATCTGTGAAAATATTTTATTCATATTTTATTTATACCTTTTCTTTCATTTTTTATCAT
GAAAGCTTCATGACTAATATTAGCAGTTGGATACAAATAACTCTTTGTATCATAGTATTCTCTCAATTTCTTAAG
GCCCAGAAAATAAAGTGAAAATGTATTTTTTGAATGATTTAAATTTCTCTAGACGCGATGCTGGATTTAAAGCAA
GAAAAGATGCACTGGACATTGCTTCAGATTATGAAAACATTTCTGTTGTTAACATTCCTCTATGGGGTGGAGTAG
TCCAGAGAATTATTAGTTCTGTTAAGCTTAGTACATTTCTCTGCGGTCTTGAAAATAAAGATGTTTTAATTTTCA
ATTTCCCGATGGCCAAACCATTTTGGCATATATTGTCATTCTTTCACCGCCTTCTAAAATTTAGAATAGTACCTC
TGATTCATGATATTGATGAATTAAGAGGAGGAGGGGGTAGTGATTCTGTGCGGCTTGCTACCTGTGATATGGTCA
TAAGTCACAATCCACAAATGACAAAGTACCTTAGTAAATATATGTCTCAGGATAAAATCAAAGACATAAAAATAT
TTGATTACCTCGTCTCATCTGATGTGGAGCATCGAGATGTTACGGATAAGCAACGAGGGGTCATATATGCTGGCA
ACCTTTCTAGGCATAAATGTTCTTTCATATATACTGAAGGATGCGATTTTACTCTCTTTGGTGTCAACTATGAAA
ATAAAGATAATCCTAAATATCTTGGAAGTTTTGATGCTCAATCTCCGGAAAAGATTAACCTCCCAGGCATGCAAT
TTGGACTCATTTGGGATGGAGATTCTGTCGAAACCTGTAGTGGTGCCTTTGGCGACTATTTAAAGTTTAATAACC
CTCATAAGACATCTCTTTATCTTTCAATGGAACTTCCAGTATTTATATGGGATAAAGCCGCCCTTGCGGATTTCA
TTGTAGATAATAGAATAGGATATGCAGTGGGATCAATCAAAGAAATGCAAGAGATTGTTGACTCCATGACAATAG
AAACTTATAAGCAAATTAGTGAGAATACAAAAATTATTTCTCAGAAAATTCGAACAGGAAGTTACTTCAGGGATG
TTCTTGAAGAGGTGATCGATGATCTTAAAACTCGCTAAACGATATGGTCTCTGTGGTTTTATTCGGCTTGTTAGA
GATGTCTTATTGACTCGTGTATTTTACCGGAACTGTAGAATTATTCGATTTCCCTGCTATATTCGCAATGATGGT
AGCATTAATTTTGGTGAAAATTTCACAAGTGGAGTCGGTCTCAGGCTGGATGCATTTGGACGTGGCGTGATTTTT
TTTTCCGATAATGTGCAAGTTAACGACTATGTTCATATCGCCTCAATTGAGAGCGTTACGATAGGTCGGGATACG
CTTATTGCAAGTAAAGTATTTATTACCGATCATAATCACGGTTCCTTTAAGCACTCTGATCCAATGAGTTCGCCA
AATATACCTCCAGACATGCGCACGTTGGAATCTTCAGCTGTTGTAATTGGCCAGAGGGTTTGGTTGGGTGAGAAT
GTGACGGTTTTGCCTGGAACAATTATTGGTAATGGAGTCGTAGTCGGCGCCAATTCTGTTGTTAGAGGTTCTATT
CCCGAAAATACTGTCATTGCGGGAGTACCAGCAAAAATCATAAAGAAATACAATCATGAGACCAAATTATGGGAA
AAAGCATAGTCGTTGTTTCTGCGGTCAATTTTACCACTGGCGGTCCATTTACCATTTTGAAAAAATTTTTGGCAG
CAACTAATAATAAAGAAAATGTCAGTTTTATCGCATTAGTCCATTCTGCTAAAGAGTTAAAAGAAAGTTATCCAT
GGGTTAAATTCATTGAGTTTCCTGAGGTTAAAGGGTCGTGGCTAAAACGTTTGCACTTTGAATATGTAGTTTGTA
AAAAACTTTCAAAAGAGCTGAATGCTACGCATTGGATTTGTCTGCATGATATTACGGCCAATGTCGTCACTAAAA
AAAGATATGTGTATTGTCATAACCCTGCCCCTTTTTATAAAGGAATTTTATTCCGTGAAATTCTTATGGAGCCTA
GCTTTTTCTTATTTAAAATGCTATACGGGCTGATATATAAAATAAACATTAAAAAAAATACTGCAGTGTTTGTTC
AACAATTCTGGATGAAAGAAAAATTTATCAAGAAATATTCTATAAATAACATCATTGTCAGTCGGCCAGAAATTA
AATTATCTGATAAAAGCCAACTTACTGATGATGATTCTCAATTTAAGAATAACCCTTCTGAGTTGACAATATTTT
ACCCTGCTGTTCCACGAGTATTTAAAAATTACGAGCTTATTATTAGTGCAGCAAGGAAATTGAAAGAACAATCCA
ATATTAAATTTCTGCTTACTATCAGTGGTACAGAAAATGCGTATGCAAAATATATTATCAGTCTTGCAGAAGGAC
TGGATAATGTTCATTTCCTCGGGTACTTGGATAAAGAAAAAATCGATCATTGTTATAATATTTCAGATATAGTTT
GTTTTCCCTCTAGGTTAGAAACATGGGGATTGCCGTTGTCTGAGGCTAAAGAGCGAGGTAAGTGGGTATTAGCAT
CAGATTTCCCATTTACTAGAGAAACTCTTGGTAGTTATGAAAAGAAAGCTTTTTTTGATTCTAATAACGATGACA
TGTTAGTTAAACTTATTATTGACTTCAAAAAAGGTAACCTCAAAAAAGATATCTCTGATGCAAATTTCATTTATC
GTAATGAAAATGTATTAGTTGGGTTTGATGAACTAGTTAATTTTATTACTGAAGAACATTGAAATGGTATATATA
ATAATCGTTTCCCACGGACATGAAGACTACATCAAAAAATTACTCGAAAATCTTAATGCTGACGATGAGCACTAC
AAGATTATCGTACGCGACAACAAAGACTCTCTATTATTGAAACAAATATGCCAGCATTATGCAGGCCTGGACTAT
ATTAGTGGAGGTGTATACGGCTTTGGTCATAATAATAATATTGCGGTGGCGTATGTAAAGGAAAAATATAGACCC
GCAGATGATGATTACATTTTGTTTTTGAATCCCGATATCATCATGAAGCATGATGATTTGCTGACATATATTAAA
TATGTCGAAAGTAAGCGTTATGCTTTTAGTACATTATGCCTGTTCCGAGATGAAGCGAAATCTTTACATGATTAT
TCCGTAAGAAAATTTCCTGTGCTTTCTGATTTTATTGTGTCATTTATGTTAGGGATTAATAAAACAAAAATTCCT
AAAGAAAGTATCTATTCTGATACGGTTGTTGATTGGTGCGCAGGATCATTTATGCTGGTACGTTTTTCAGATTTT
GTGCGTGTAAATGGCTTCGATCAAGGTTACTTTATGTACTGTGAAGATATTGACCTGTGCTTGAGGCTTAGCCTG
GCTGGTGTCAGACTTCATTATGTTCCCGCTTTTCATGCGATACATTATGCTCATCATGACAATCGAAGTTTTTTT
TCAAAAGCCTTCAGATGGCACTTAAAAAGTACTTTTAGATATTTAGCCAGAAAACGTATTTTATCAAATCGCAAC

TTTGATCGAATTTCATCAGTTTTTCACCCGTAAGAGCTCGGTACCCGGGCCTAGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
GAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATCCGTCGACGGCG
GCCGCCCTGCAGGCATGCAAGCTTGATCCATATGGATCGCTAGCTTAATTAAATAAAGCCGTAAGCATATAAGCA
TGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTCCAGGCCGCGAGCATTCAGCG
CGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGATGGGACG
CAACCTTGCGCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGA
AGTGATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAAACTGGTTCCTTACTATACGGTGAAAGAGTTTGTCGAATCTCTGGAAAC
GCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCCTCAAACCATATCT
CGATAAAGGAGACATCATCATTGATGGTGGTAACACCTTCTTCCAGGACACTATTCGTCGTAATCGTGAGCTTTC
AGCAGAGGGCTTTAACTTCATCGGTACGGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTAT
GCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTGGTAGCACCGATCCTGACCAAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGG
TGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGCCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTGAATA
CGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCAACGAAGAACTGGC
GCAGACCTTTACCGAGTGGAATAACGGTGAACTGAGCAGTTACCTGATCGACATCACCAAAGATATCTTCACCAA
AAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACGGGTAAATGGAC
CAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGCTGTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTTTGCACGTTATATCTCTTC
TCTGAAAGATCAGCGTGTTGCCGCATCTAAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCGACAAGGCTGA
GTTCATCGAAAAAGTTCGTCGTGCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCG
TGCTGCGTCTGAAGAGTACAACTGGGATCTGAACTACGGCGAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCAT
CCGTGCGCAGTTCCTGCAAAAAATCACCGATGCTTATGCCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCC
GTACTTCAAGCAAATTGCCGATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGATGTCGTTGCTTATGCAGTACAGAACGGTAT
TCCGGTTCCGACCTTCTCCGCAGCGGTTGCCTATTACGACAGCTACCGTGCTGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGAT
CCAGGCACAGCGTGACTATTTTGGTGCGCATACTTATAAGCGTATTGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATG
GCTGGATTAA

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

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCGATACCC
AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAA
GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA
CTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG
AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCA
TTTGTCGTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATG
ATTGCACGTTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCC
GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGAT
CAGCCGCAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTCGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAACTG
GAACGTACTCAGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCC
GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG
TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA
TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAA
TCTTCCTGCCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA
GGATTTTCCTTGTTTCCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA
ACGCTCGTCACATCATAGGCATGCATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC
CTCTATTAATCAAACTGAGAGCCGCTTATTTCACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGTGAAAATA
CTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTGGTTCAGCTGTAGTTCGTCACATTATAAATAATACGCAGGATAGTGTT
GTTAATGTCGATAAATTAACGTACGCCGGAAACCGGGAATCACTTGCTGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATGTT
TTTGAACATGCGGATATTTGCGATGCACCTGCAATGGCACGGATTTTTGCTCAGCATCAGCCGGATGCAGTGATG
CACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTTGGT
ACTTATGTCCTTTTGGAAGCCGCTCGCAATTACTGGTCTGCTCTTGATAGCGACAAGAAAAATAGCTTCCGTTTT
CATCATATTTCTACTGACGAAGTCTATGGTGATTTGCCTCATCCAGATGAAGTAAATAATACAGAAGAATTACCC
TTATTTACTGAGACGACAGCTTACGCGCCAAGCAGCCCTTATTCCGCATCCAAAGCATCCAGCGATCATTTAGTC
CGCGCGTGGAAACGTACATATGGTTTACCGACAATTGTGACTAATTGCTCGAACAACTATGGTCCTTATCATTTC
CCGGAAAAGCTTATTCCACTGGTTATTCTTAATGCACTGGAAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAAAGGAGAT
CAGATCCGCGACTGGTTGTATGTTGAAGATCATGCGCGTGCGTTATATACCGTCGTAACCGAAGGTAAAGCGGGT
GAAACTTATAACATTGGTGGGCACAACGAAAAGAAAAACATCGATGTAGTGCTCACTATTTGTGATTTGCTGGAT
GAGATTGTACCGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAAATCACTTATGTTGCTGATCGTCCGGGACACGATCGCCGC
TATGCTATTGATGCTGAGAAGATTGGTCGCGCATTGGGATGGAAACCACAGGAAACGTTTGAGAGCGGGATTCGT
AAAACGGTGGAATGGTACCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAATGTGAAAAGTGGTGCCTATCAATCGTGGATT

GAACAGAACTATGAGGGCCGCCAGTAATGAATATCCTCCTTTTTGGCAAAACAGGGCAGGTAGGTTGGGAACTAC
AGCGTGCTCTGGCACCTTTGGGTAATTTGATTGCTTTTGATGTTCACTCTACTGATTATTGCGGTGATTTTAGTA
ATCCTGAAGGTGTAGCTGAAACCGTAAGAAGCATTCGGCCGGATATTATTGTCAATGCAGCCGCTCACACCGCAG
TAGACAAAGCAGAATCAGAACCGGAGTTTGCACAATTAATTAACGCAACAAGTGTCGAAGCGATTGCGAAAGCAG
CAAATGAAGTTGGAGCCTGGGTTATCCATTACTCGACTGATTACGTCTTCCCTGGAAATGGCGATATGCCATGGC
TGGAGACGGATGCAACCGCACCACTAAATGTTTACGGTGAAACCAAGTTAGCCGGAGAAAAAGCGTTACAGGAAT
ATTGCGCGAAGCATCTTATTTTCCGGACCAGCTGGGTCTATGCAGGAAAAGGAAATAACTTCGCCAAAACGATGT
TACGTCTGGCAAAAGAGCGTGAAGAATTAGCGGTTATTAACGATCAGTTTGGTGCGCCAACAGGTGCTGAACTGC
TGGCTGATTGTACAGCACATGCCATTCGTGTCGCACTGAATAAACCGGATGTCGCAGGCTTGTACCATTTGGTAG
CCAGTGGTACCACAACCTGGTACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGCATTCCCCTTG
CACTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAACAACAGCCTATCCTACACCAGCTCGTCGTCCACATAACTCTCGCCTTA
ATACAGAAAAATTTCAGCAGAACTTTGCGCTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTTGGCGTGAAACGAATGCTCAATG
AATTATTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTGATGGTGGAGCAAGATGAATTAAAAGGA
ATGATGAAATGAAAATGCGTAAAGGTATTATTTTAGCGGGTGGTTCTGGTACACGTCTTTATCCTGTGACTATGG
CTGTCAGTAAACAGCTATTACCTATTTATGATAAACCGATGATCTATTACCCGCTCTCTACACTGATGTTGGCGG
GTATTCGCGATATTTTGATTATCAGTACACCTCAGGATACTCCTCGTTTTCAACAATTGCTGGGTGACGGTAGCC
AGTGGGGCCTGAATCTTCAGTACAAAGTGCAACCTAGCCCAGATGGCCTCGCGCAGGCATTTATCATCGGTGAAG
AGTTTATTGGTGGTGATGATTGTGCTTTGGTTCTTGGTGATAATATCTTTTACGGTCACGATCTGCCGAAGCTAA
TGGAGGCCGCTGTTAACAAAGAAAGTGGTGCAACGGTATTTGCCTATCACGTTAATGATCCAGAACGCTATGGTG
TCGTTGAGTTTGATAAAAACGGTACGGCAATCAGTCTGGAAGAAAAACCGTTAGAACCAAAGAGTAATTACGCCG
TTACAGGTCTGTACTTTTATGATAACGACGTGGTTCAGATGGCGAAAAACTTGAAGCCGTCTGCACGTGGTGAGT
TAGAAATTACAGATATTAACCGTATTTATCTTGAGCAGGGACGTCTGTCTGTCGCGATGATGGGGCGTGGCTACG
CGTGGCTGGACACGGGGACTCATCAGAGTCTGATAGAAGCAAGTAATTTTATTGCGACAATTGAAGAGCGCCAGG
GATTGAAGGTTTCCTGTCCTGAAGAGATTGCATTTCGTAAAGGTTTTATTGATGTTGAGCAAGTAAGAAAATTAG
CTGTACCACTAATAAAGAATAATTATGGGCAGTATCTTTATAAAATGACGAAGGATTCAAATTAATGAATGTGAT
TAGAACTGAAATTGAAGATGTGCTAATTCTGGAGCCAAGAGTATTTGGTGATGATAGAGGTTTCTTTTATGAGAG
CTTTAATCAATCAGCATTTGAACATATTCTAGGCTATCCGGTCAGCTTTGTTCAAGACAATCACTCACGTTCATC
AAAAAATGTACTCAGAGGCCTTCACTTTCAACGCGGCGAGTACGCACAAGATAAACTTGTACGCTGCACTCATGG
AGCAGTTTTTGATGTTGCTGTTGATATTCGACCCAATTCGGTATCCTTTGGTAAATGGGTTGGTGTTCTGCTTTC
AGCTGATAATAAGCAGCAGTTGTGGATACCAAAAGGGTTTGCTCATGGCTTTTTGGTTCTGTCTGATATCGCTGA
ATTTCAATATAAAACTACAAACTATTATCATCCTGAAAGCGATTGTGGAATATGTTGGAATGATGAACGCATTGC
AATTGATTGGCCCCAAACATCAGGGTTAATCCTTTCGCCAAAAGATGAAAGGCTCTTTACGTTAGATGAGCTTAT
CAGATTAAAATTAATTGCATGAGGCCGGCCTTAAGGAGGACTAGTCCCGGCGCGCCATGAGTTTAATCAAAAACA
GTTTTTGGAACCTTTGCGGGTATGTACTTCCAGCTATTGTGACACTACCAGCTTTGGGTATTATGGGGCGAAAAT
TAGGCCCAGAATTATTTGGTGTATTCACTTTGGCATTAGCTGTTGTGGGTTATGCAAGCATTTTTGATGCAGGCC
TTACTCGCGCAGTGATACGAGAAGTCGCAATTGAAAAAGATAATGAAGAAAATAAGTTGAAAATTATTTCTTCAG
CGACAGTTGTAATTATTTATTTGAGTTTGGCCGCCTCACTCTTATTATTTTTTTTAGTGGTCATATCGCATTGC
TACTGAACATTAGTGAGACTTTTTTCATAATGTAAGTGTCTCGCTTAAAATTCTCGCAGCATCCATACCATTAT
TTTTGATTACTCAAATATGGTTGTCAATTTTAGAAGGTGAAGAAAGATTTGGTTTACTTAATATCTACAAATCAA
TTACGGGAGTGATATTAGCAATCTCACCGGCATTATTTATACTTATTAAACCCTCTTTGATGTATGCGATAATAG
GCTTAGTTCTAGCAAGGTTTTTATGTTTTATTTTGGCTTTTATAATTTGTCACGATAAAGTGCTTAAAGCTAAAC
TAACAATCGATATACCAACAATTAAAAGATTGTTTATGTTCGGTGGTTGGATTACAGTAAGTAATATCATCAGCC
CTGTGCTATCATATTTTGATAGGTTTATTGTTTCAAATCAACTTGGGGCTGCTAATGTTGCTTTTTATACTGCAC
CATCAGAAATTATTTCTCGGCTTAGTATAATTCCAGGTGCGTTTTCAAGAGCCTTATTTCCAAGATTAGCTAATG
CAAATAATTCCGCTGAAAGATATAAAACGAAAAGATTAATTACAATTTCACTTTTAATAATCATCACCCCTATTT
TTTGTATTGGCGTGTTATTTTCAGAGAAGATAATGGTTTTATGGATGGGGGCATCATTTTTTGGTGAGCCTGGTT
TGGTATTATCAATATTACTGATTGGCTTTATTTTTAATGGATTGGCACAAGTACCATTTGCCAGTATTCAATCCC
GAGGTCATGCTAAGATAACTGCATTTGTTCATCTCTTAGAGTTGTTTCCTTATTTATTACTTTTATTTTACCTCA
TAAAAGCACATGGGGTTGTTGGCGCGGGTATTGCGTGGTCAGTGAGGATGATAGTAGATTATATAGCATTAAGTC
TTTTGGACGGTAAGTATATTAATAAATAAAATTCAAAATGCAAGTTAATAACTCATGGCTTTATTTGGGTAGGTG
ACAATTTATAATGATATATATATTAACTTTAACTCTTCTTCTAGTTATAGCCATAATGTTTTCTCTTCTCGGCAC
AAAAAGTAGGATCACATCTCCATTACCTTTGCATTTTTTACCATGGTTACTAACTTTAATTGTCGGGATAAGTAA
TTACGATCAATTTTACGAGTTTAATGAAAGAAGCTTTTACTCTTTGTTGATTTGGTTTACAGTTATTTTTATATT
TTATTTCATAGGGGAACTGGTTAATTATAAACGTGAAAATATAAATGTTTATTATGGTCTTTCACATATTAAATA
TGAATGTAAAAAAATATTGGATCATTGTCATCCCAATTTCATTATATACCATTTTCGAAATATATATGGTTGGTAT
GGGGGGAGCAGATGGATTCTTTCTCAATTTACGTCTTGCAAATACATTGGAGGGCTATACGGGTAAAAAATTTAT
CTTAATGCCTGCTGTATATCCTCTAATGATGGCTATGTTCGCAATTGTTTGTCTAACAAAAACTTCCAAATTAAA
TAAATACTCCATTTATTTCTGGATGTTTTTGTATTGTATTGGCACAATGGGAAAATTTTCAATATTAACGCCAAT
ATTGACATATTTAATTATTTATGACTTCAAACATAGATTAAAAGTAAAAAAAACAATAAAGTTTACATTGTTGAT
AATTATATTAGCTTTAACTTTGCATTTTACACGTATGGCTGAGAATGACCACTCAACATTTTTATCTATTTTAGG

GCTCTATATTTATTCACCAATAATTGCTTTAGGCCAGTTGAATGAAGTAAATAGTAGTCATTTTGGTGAGTATAC
GTTTAGATTCATATATGCTATAACTAATAAAATTGGCCTTATTAAAGAATTGCCAGTAAATACTATTCTTGACTA
TTCATACGTTCCTGTACCAACAAATGTATATACTGCACTTCAACCATTTTACCAGGATTTTGGTTATACTGGCAT
CATATTTGGAGCAGTATTATACGGACTAATATATGTGAGTTTATACACGGCCGGTGTTCGTGGAAATAATACACA
GGCATTACTGATTTACGCATTGTTTTCAGTTAGCAGTGCAACGGCTTTCTTCGCTGAAACGCTAGTAACGAATTT
AGCTGGAAATGTGATGTTAGTATTATGTACCATCTTACTATGGCGATTTACAGTAATATGCAAACCAGTACAGTA
ACCATTCTAATGGCCACCTACAATGGCGAGGCCTTCATCAAAAATCAGATTTTGTCACTACAACAACAAACATTT
TCTAACTGGCGGTTATTTATTCAGGATGATGGGTCTACAGACAATACTATATCTATAATAAAAAACTTCCAAAAA
TCTGACTCCAGAATTCGGCTAGTTGATGATAATTTGAAAGGTCAAGGTGCAGGAAAAAATTTTTTATCGCTGATA
AAGTACAGCGAGACAGATTATACAATTTATTGTGACCAAGATGATATTTGGTTAGAAAACAAAATATTTGAATTA
GTAAAGTATGCAAATGAAATTAAATTGAATGTATCAGATGCGCCTTCGCTAGTTTATGCTGATGGCTATGCTTAT
ATGGATGGTGAGGGTACAATCGATTTTTCTGGGATATCTAACAATCATGCTGATCAATTAAAGGATTTTCTTTTT
TTTAATGGTGGATACCAAGGATGTTCTATTATGTTCAATCGTGCAATGACCAAATTTCTTCTGAATTATCGAGGA
TTTGTATATCTACATGACGATATCACAACATTAGCTGCATACGCTCTTGGTAAAGTTTATTTTCTCCCGAAATAC
CTTATGTTATATAGACAGCACACGAATGCGGTAACTGGTATCAAAACATTCCGCAATGGATTGACTTCTAAATTT
AAATCACCAGTAAACTATCTTTTATCACGAAAACATTATCAGGTAAAAAAATCTTTTTTTGAATGTAACAGCTCT
ATCTTATCAGAGACGAATAAAAAAGTTTTTTTGGATTTTATTTCATTTTGTGAATCAAATAATAAATTTACAGAT
TTTTTTAAGTTATGGCGAGGTGGGTTTAGATTAAATAACAGTAGAACTAAATTATTATTAAAATTCTTAATACGG
AGAAAATTTAGCGAATGATTTCAATACTTACACCTACTTTTAATCGGCAACATACTTTATCAAGGCTATTCAATT
CTCTTATATTACAAACTGATAAAGATTTTGAGTGGATAATAATTGATGATGGTAGTATAGATGCAACAGCGGTAC
TTGTAGAAGATTTTAGAAAAAAATGTGATTTTGACTTGATTTATTGCTATCAGGAAAATAATGGTAAGCCCATGG
CTTTAAACGCTGGTGTTAAAGCTTGTAGAGGCGATTATATCTTTATTGTTGACAGTGATGATGCACTAACTCCCG
ATGCCATAAAATTAATTAAAGAATCAATACATGATTGCTTATCTGAGAAGGAAAGTTTCAGCGGAGTCGGTTTTA
GAAAAGCATATATAAAAGGGGGGATTATTGGTAATGATTTAAATAATTCTTCAGAACATATATACTATTTAAATG
CGACTGAGATTAGCAATTTAATAAATGGTGATGTTGCATATTGTTTTAAAAAAGAAAGTTTGGTAAAAAATCCAT
TCCCCCGTATAGAAGATGAAAAATTTGTTCCAGAATTATATATTTGGAATAAAATAACTGACAAGGCGAAGATTC
GATTTAACATAAGCAAAGTTATATATCTTTGTGAGTATCTTGATGATGGTCTTTCTAAAAATTTCCATAACCAGC
TTAAAAAATACCCAAAGGGGTTTAAGATTTATTACAAAGATCAAAGAAAACGAGAGAAAACTTATATAAAAAAAA
CAAAGATGCTAATTAGATATTTGCAATGTTGTTATTATGAGAAAATAAAATGAAAATACTATTTGTCATTACAGG
TTTAGGCCTTGGAGGTGCTGAGAAGCAGGTTTGTCTTTTAGCTGATAAATTAAGTTTAAGCGGGCACCATGTAAA
GATTATTTCACTTGGACATATGTCTAATAATAAAGTCTTTCCTAGCGAAAATAATGTTAATGTCATTAATGTAAA
TATGTCAAAAAACATTTCTGGAGTTATAAAAGGTTGTGTCAGAATTAGAGATGTTATAGCTAATTTCAAACCAGA
CATTGTACACAGTCATATGTTTCATGCAAACATTATCACTAGATTGTCTGTAATTGGAATCAAAAACAGACCTGG
TATTATATCAACTGCACATAATAAAAATGAAGGTGGGTATTTCAGAATGCTCACATATAGAATAACCGATTGTTT
AAGTGATTGTTGTACAAATGTTAGCAAAGAAGCAGTGGATGAGTTTTTACGGATAAAAGCCTTTAATCCCGCTAA
AGCAATTACTATGTATAATGGGATAGATACCAATAAATTTAAATTTGATTTATTGGCAAGGAGGGAAATTCGAGA
CGGTATTAATATAAAAAATGATGATATATTATTACTTGCTGCAGGTCGTTTAACGTTAGCTAAAGATTATCCTAA
TTTATTGAATGCAATGACTCTGCTTCCTGAACACTTTAAACTTATTATTATTGGTGATGGTGAATTGCGTGACGA
AATTAATATGCTTATAAAAAAATTGCAATTATCTAATAGGGTGTCCTTGTTGGGAGTTAAAAAAAATATTGCTCC
CTATTTTTCTGCATGTGATATTTTTGTTCTCTCTTCTCGTTGGGAAGGATTTGGATTAGTCGTGGCAGAAGCTAT
GTCATGTGAGCGAATTGTTGTTGGCACGGATTCAGGGGGAGTAAGAGAAGTTATTGGTGACGATGATTTTCTTGT
ACCCATATCTGATTCAACACAACTTGCAAGCAAAATTGAAAAATTGTCTTTGAGCCAGATACGTGATCACATTGG
TTTTCGGAATCGTGAGCGTATTTTAAAAAATTTCTCAATAGATACTATTATTATGCAGTGGCAAGAACTCTATGG
AACTATAATTTGCTCAAAACATGAAAGGTAGATTTATATTTGGAACGTGTCTTTTGTTTGAATTTAATTCAATCT
CAATTGAGATTTTTGTATTTCAAAAATACCATCATAGCTAACGATGATTGGTATTTATTTTAAGATGCTTTCTAT
AAATATATTGACGTTTTTAATGCGCCGAAACGATTGGGCTGGGAACAGAGAAGTAAAACTGTTTTGAGAATGAAG
AGTTTTTGAGATGTTTATGGATATTAAAAATTGATCCAGTGAATTAATTATTTATAATAAATCAAGATTTAATGT
TAATAAATGATAATCTTTTCTGACACTCATATTAATTATGAGTGGTACGTTTGGTAAACGGTAAACTATTATATG
ACAGCTAGAACAACTAAAGTTTTGCACTTACAATTACTCCCACTCTTAAGTGGCGTTCAAAGGGTAACATTAAAC
GAAATTAGTGCGTTATATACTGATTATGATTATACACTAGTTTGCTCAAAAAAAGGTCCACTAACAAAAGCATTG
CTGGAATATGATGTCGATTGTCATTGTATCCCCGAACTTACGAGAGAAATTACCGTAAAGAATGATTTTAAAGCA
TTGTTCAAGCTTTATAAGTTCATAAAAAAAGAAAAATTTGACATTGTGCATACACATTCTTCAAAAACAGGTATT
TTGGGGCGAGTTGCTGCCAAATTAGCACGTGTTGGAAAGGTGATCCACACTGTACATGGTTTTTCTTTTCCAGCC
GCATCTAGTAAAAAAAGTTATTACCTTTATTTTTTCATGGAATGGATAGCAAAGTTCTTTACGGATAAGTTAATC
GTCTTGAATGTAGATGATGAATATATAGCAATAAACAAATTAAAATTCAAGCGGGATAAAGTTTTTTTAATTCCT
AATGGAGTAGACACTGATAAGTTTTCTCCTTTAGAAAATAAAATTTATAGTAGCACCTTGAATCTAGTAATGGTT
GGTAGATTATCCAAGCAAAAAGATCCTGAGACATTATTGCTTGCTGTTGAAAAACTGCTGAATGAAAATGTTAAT
GTTAAGCTGACACTTGTAGGAGATGGTGAACTAAAAGAACAGTTAGAAAGCAGGTTCAAACGGCAAGATGGACGT
ATAATTTTTCATGGATGGTCAGATAACATTGTTAATATTTTAAAAGTTAATGATCTTTTTATATTACCTTCTCTT
TGGGAGGGTATGCCATTAGCAATTTTAGAAGCATTGAGCTGTGGACTTCCATGTATAGTCACTAATATTCCAGGT

AATAATAGCTTAATAGAAGATGGCTATAATGGTTGTTTGTTTGAAATTAGAGATTGTCAGTTATTATCTCAAAAA
ATCATGTCATATGTTGGTAAGCCAGAACTGATTGCACAGCAATCTACCAATGCACGATCATTTATTCTGAAAAAT
TATGGATTAGTTAAAAGAAATAATAAGGTCAGACAGCTATATGATAATTAAGAGCTCGGTACCCGGGCCTAGGGT
GTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATAT
TCATATCCGTCGACGGCGGCCGCCCTGCAGGCATGCAAGCTTGATCCATATGGATCGCTAGCTTAATTAAATAAA
GCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTCCA
GGCCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGG
TATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCGCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTC
CCGTGAGAAGACGGAAGAAGTGATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAAACTGGTTCCTTACTATACGGTGAAAGAGTT
TGTCGAATCTCTGGAAACGCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGA
TTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATTGATGGTGGTAACACCTTCTTCCAGGACACTATTCG
TCGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTTAACTTCATCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCT
GAAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTGGTAGCACCGATCCTGACCAAAATCGC
CGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGCCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGT
TCACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCT
CACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGAATAACGGTGAACTGAGCAGTTACCTGATCGACATCAC
CAAAGATATCTTCACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAA
AGGTACGGGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGCTGTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTT
TGCACGTTATATCTCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTTGCCGCATCTAAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCC
AGCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTCGTGCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCCA
GGGCTTCTCTCAGCTGCGTGCTGCGTCTGAAGAGTACAACTGGGATCTGAACTACGGCGAAATCGCGAAGATTTT
CCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCTGCAAAAAATCACCGATGCTTATGCCGAAAATCCACAGATCGC
TAACCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAATTGCCGATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGATGTCGTTGCTTA
TGCAGTACAGAACGGTATTCCGGTTCCGACCTTCTCCGCAGCGGTTGCCTATTACGACAGCTACCGTGCTGCTGT
TCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTGACTATTTTGGTGCGCATACTTATAAGCGTATTGATAAAGAAGG
TGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

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

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCGATACCC
AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAA
GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA
CTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG
AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCA
TTTGTCGTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATG
ATTGCACGTTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCC
GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGAT
CAGCCGCAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTCGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAACTG
GAACGTACTCAGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCC
GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG
TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA
TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAA
TCTTCCTGCCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA
GGATTTTCCTTGTTTCCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA
ACGCTCGTCACATCATAGGCATGCATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC
CTCTATTAATCAAACTGAGAGCCGCTTATTTCACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGCTAGCAGT
GAAGATACTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTGGTTCTGCTGTTGTTCGTCACATAATAAATAATACGCAAGA
TAGTGTTGTTAATGTCGATAAATTAACATACGCCGGAAACCTGGAATCACTTGCAGATGTTTCTGATTCTGAACG
CTATTTCTTTGAACATGCGGATATTTGTGATGCAGCTGCAATGGCACGGATTTTTGCTCAGCATCAGCCGGATGC
AGTGATGCACCTGGCAGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATAT
TGTGGGTACTTATGTCCTTTTAGAAGCGGCTCGGAATTATTGGTCTGGTCTGGATGATGAAAAGAAAAAAAACTT
CCGTTTTCATCATATTTCTACTGATGAGGTGTATGGTGACTTACCCCATCCGGATGAAGTAAATAGCAATGAAAC
GTTGCCGCTATTTACGGAAACGACAGCATACGCGCCAAGTAGTCCATATTCTGCTTCTAAAGCTTCCAGCGATCA
TTTGGTTCGCGCATGGAAACGTACTTATGGTTTACCGACCATTGTGACTAATTGCTCGAACAACTATGGTCCTTA
TCATTTCCCGGAAAAGCTTATTCCACTGGTTATTCTTAATTCACTGGAAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAA
AGGAGATCAGATCCGCGACTGGTTGTATGTAGAGGATCATGCTCGAGCGTTATATACCGTCGTAACCGAAGGTAA
AGCGGGCGAAACTTATAACATTGGTGGACACAACGAAAAGAAAAACATCGACGTAGTGTTCACTATTTGTGATTT
GTTGGATGAGATAGTCCCGAAAGAGAAATCTTACCGCGAGCAAATTACTTATGTTACCGATCGTCCGGGACACGA

TCGCCGTTATGCGATTGATGCTGAGAAGATTGGTCGCGAATTGGGATGGAAACCACAGGAAACGTTTGAGAGTGG
GATTCGTAAAACGGTGGAATGGTACCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAATGTGAAAAGTGGTGCCTATCAATC
GTGGATTGAACAGAACTATGAGGGCCGCCAGTAATGAATATCCTCCTTTTTGGCAAAACAGGGCAGGTAGGTTGG
GAACTACAGCGTGCTCTGGCACCTCTGGGTAATTTGATTGCTCTTGATGTTCACTCCACTGATTACTGTGGTGAT
TTTAGTAATCCTGAAGGTGTAGCTGAAACCGTAAGAAGCATTCGGCCTGATATTATTGTCAACGCAGCCGCTCAC
ACCGCAGTAGACAAAGCAGAATCAGAACCGAAGTTTGCACAATTACTGAACGCGACGAGTGTCGAAGCGATCGCG
AAAGCAGCCAATGAAGTCGGCGCCTGGGTTATTCACTACTCTACTGACTACGTATTTCCGGGGACCGGTGAAATA
CCATGGCAGGAGGAGGATGCAACCGCACCGCTAAATGTTTACGGTGAAACCAAGTTAGCGGGAGAAAAAGCATTA
CAAGAGCATTGTGCGAAGCACCTTATTTTCCGGACCAGCTGGGTCTATGCAGGTAAAGGAAATAACTTCGCCAAA
ACAATGTTGCGTCTGGCAAAAGAGCGTGAAGAATTAGCCGTTATTAATGATCAGTTTGGTGCGCCAACTGGCGCA
GAGTTACTGGCTGATTGTACGGCACATGCTATTCGTGTGGCACTGAATAAACCGGAAGTCGCAGGCTTGTACCAT
CTGGTAGCTAGTGGTACCACAACGTGGCACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGCATT
CCCCTTGCACTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAACAACAGCCTATCCTACACCAGCTCGTCGTCCACATAACTCT
CGCCTTAATACAGAAAAATTTCAGCAGAACTTTGCGCTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTTGGCGTGAAACGAATG
CTTAACGAATTATTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTAATGGTGGAGCAAGATGTATT
AAAAGGAATGATGAAATGAAAACGCGTAAAGGTATTATTTTGGCGGGTGGTTCTGGTACTCGTCTTTATCCTGTG
ACGATGGCCGTCAGTAAACAGCTGTTACCGATTTATGATAAACCGATGATCTATTACCCGCTCTCTACACTGATG
TTAGCGGGTATTCGCGATATTCTGATTATCAGTACACCACAGGATACTCCTCGTTTTCAACAACTGCTGGGTGAC
GGGAGCCAGTGGGGCCTGAATCTTCAGTACAAAGTGCAACCGAGTCCGGATGGTCTTGCGCAGGCGTTTATTATC
GGTGAAGAGTTTATTGGTGGTGATGATTGTGCTTTGGTACTTGGTGATAATATCTTCTACGGCCACGACCTGCCG
AAGTTAATGGACGTAGCTGTTAACAAAGAAAGTGGTGCAACGGTATTTGCCTATCACGTTAATGATCCTGAACGT
TATGGTGTCGTGGAGTTTGATAATAACGGTACTGCAATTAGCCTGGAAGAAAAACCGCTGGAACCAAAAAGTAAC
TATGCGGTTACTGGGCTTTATTTCTATGACAATGACGTTGTGGAAATGGCGAAAAACCTTAAGCCTTCTGCCCGA
GGTGAACTGGAAATTACCGATATTAACCGTATTTATATGGAACAAGGACGTTTGTCTGTCGCTATGATGGGGCGT
GGCTATGCATGGCTGGATACAGGGACGCATCAAAGTCTTATTGAAGCAAGCAACTTCATTGCCACCATTGAAGAG
CGCCAGGGACTAAAGGTTTCCTGTCCGGAAGAAATTGCTTATCGTAAAGGGTTTATTGATGCTGAGCAGGTAAAA
GTATTAGCCGAACCGTTGAAGAAAAATGCTTATGGTCAGTATCTGCTCAAAATGATTAAAGGTTATTAATAAGAT
GAACGTAATTAAAACTGAAATTCCTGATGTGCTGATTTTTGAACCAAAAGTTTTTGGGGATGAACGTGGCTTCTT
TTTTGAGAGTTTTAATCAGAGGATTTTTGAAGAAGCAGTAGGTCGTAAGGTTGAGTTTGTTCAGGATAACCATTC
TAAGTCCAGTAAAGGTGTTTTACGTGGTCTTCATTATCAGTTAGAACCTTATGCTCAAGGAAAACTGGTGCGCTG
TGTTGTTGGCGAGGTTTTTGATGTTGCGGTTGATATTCGTAAATCGTCACCTACATTTGGGAAATGGGTTGGGGT
GAATTTGTCTGCTGAGAATAAGCGTCAGTTGTGGATTCCTGAGGGATTTGCACATGGTTTTTTGGTGCTGAGTGA
TTTAGCAGAAGTTTTATATAAAACGAATCAATATTATGCTCCATCACATGAAAAAAATATTATATGGAATGACCT
CTTGCTTAATATTAAATGGCCGAGCACAGCACTGATCACTCTGTCTGATAAGGATGCAAATGGGGAAAGATTTGA
ACTAAGTGAGTTTTGAAATGTCTCTCTTAAAACATAGTATATGGAATGTTGCGGGCTACTTTATACCAACATTAA
TTGCAATTCCCGCCTTTGGATTAATTGCGAGGAAAATTGGTGTAGAACTATTTGGTTTGTATACGTTAGCAATGA
TTTTTATAGGGTATGCAAGTATATTTGATGCTGGGTTAACAAGAGCTGTTGTGCGTGAAATAGCATTACTAAAAA
ACAGAGTGGACGATTGTAATACGATAATAGTAACTTCTATTATCGCTGTGATATTTTTAGGGTTTATCGGAGGCG
GGGGAGTGTTTCTGCTTAAAGGCGATATTATTGAACTGTTAAATATCTCACCAATATATTACGCCGATTCGATAA
AGTCTCTAGTATTATTATCATCTCTGATACCTGTATTCTTAGTCACGCAAATACTATTAGCAGAGCTTGAGGGTC
GGGAATATTTTGGGATTCTAAATATACAAAAAAGTGTAGGGAATTCTTTAATTGCAGGGTTACCTGCATTATTTG
TTTTAATTAATCAAACGCTTTTTTCTGCAATTATTGGTGTAGCGATTGCAAGAGTTATATGCTTGTGGTTAAGCT
ACATTATGAGCAGGGAAAGAATAACTATCGATATCTCATTTTTTTCAATAACTGTTTTAAAGCGGTTATTTAGAT
ATGGCGGGTGGGTAACTATAAGTAACATAATATCTCCTATATTAGCGAGTATGGATAGATTTATTCTATCCCATA
TCCAGGGAGCATCAAAAATATCATTCTATACAGTCCCTAATGAGCTGGTAACTAGGCTTGGAATAGTTCCAGGCT
CTCTTGGGAAAGCTGTTTTTCCAAAATTAAGTCATGCAAGGAATTTTACAGCGTCATATGCAGAGCAAAAAAAAG
CTTATATATTAATGACTGTCATTGTAATGCCTTTGGTTTTATTTGTATATTATTACGCAAAGTTTATTTTAACAT
TGTGGATGGGGGCTGAGTATGCAGGGATTTCGGTCGAAATATTACGGATTATGCTTATAGGGTATATTTTTAACT
GTTATTCACAAATCTCTTTTGCCAACATACAGGCCTTTGGAAAAGCAAAATACACTGCATACATCCATATGATGG
AATTTATTCCTTATTTGATAATGTTATATATAATTTCAAAGGAATATGGGGTTATTGGTGTTGCGTGGTTATGGA
CAATTCGAGTAATAATTGATTTTTTGATGCTTTTATATATGAGTTATCGTTGTAATAATCTTATGAAAAAAGGGT
AGCCTGATGATATATATTGTGGTATTAAATTGGAATGGGGCTATAGATACCATTAATTGTGTTAAAAGTTTAATG
GATTTAAATGTTAGCGATTATAAAATTATCATTGTTGATAACTGTTCTATGGATAACTCATATGATACTATAAAA
GAAAATCTTAATTCATTATATATTGCTGATAAAAGTATCATTGAGGTGAAGTATGAGGATAGAAATAAATATAAA
ACCTTAGAAAACGATAAAATCATATTAATACAATCTCCGCAAAATAATGGGTACGCAAGTGGTAATAATATTGGC
ATAGAGTTCGCTCTTAATCAGGAGAATATGAAATACGTCTGGGTTCTGAATAATGATACTGAAGTGGATAAAGAG
GCTTTAACTCATTTAATTAGTAAATGTGATTCAGATAAAAGTATAGGGATTTGCGGTTCTCGTTTAGTCTATTTT
GCCGACAGAGAGATGCAGCAAGGACTAGGTGGGGTGCATAACAAATGGTTATGCACTACAAAAAATTATGAAATG
GGAAGATTAGTTTCCAAAAAATATGATGATGAAGTCATTAGTAATGATATAGATTATATAATTGGCGCATCGATG
TTTTTCTCTAGAGAATGTTTGGAAACAGTTGGATTGATGAATGAAGAATATTTTTTATACTATGAAGAGTTAGAT

ATTTGCCTCAGAGCAAAAGCAAAGAACTTTAAATTAGGTATTTGCTCAGAAAGTTTGGTTTATCATAAAATAGGT
GCAAGTACTGATGGGGGAAAGAGCATGATGGCTGATCTTTGCTCAATAAAAAATAGGCTGGTCATTACAGAAAGG
TTTTATCCCCAATATTATTGGACGGTATGGTTGTCACTTTTTGTTGTAGCATTTAACCGTGCTAGAAGAGGTGAG
TTTAATAAGATGAAAAGATGTTTGAATGTTATGTTTAACTTCAAACGAAACAAAGGTAGCAAATGCCATTAGAAT
ATGCACTTAATCATGGTGTTAATAAATCTATAGTTTGATATGTTATTAAAGGGTATTTAATGAAAGTGGCTTTTT
TATCTGCTTATGATCCACTATCTACATCCAGTTGGTCTGGCACACCTTATTATATGCTAAAGGCATTATCGAAGA
GAAATATTTCCATTGAAATATTAGGACCGGTAAATAGCTATATGATATACATGTTAAAAGTATATAAATTAATAT
TAAGGTGTTTCGGAAAAGAATATGATTATAGTCATTCGAAGTTGCTTTCCAGGTATTACGGTAGAATATTCGGTA
GGAAATTAAAAAAAATTGATGGTTTGGATTTTATTATCGCACCTGCAGGTTCCTCACAAATTGCTTTTTTAAAAA
CAACCATACCAATAATATATCTATCGGATACAACATATGATCAATTAAAAAGCTATTATCCGAATTTAAATAAAA
AAACAATTATAAATGATGAGGATGCAAGTTTAATCGAACGCAAGGCTATTGAAAAAGCAACAGTAGTATCTTTCC
CATCTAAATGGGCAATGGATTTTTGCAGGAATTATTACAGATTAGATTTTGATAAATTAGTTGAAATACCATGGG
GGGCTAATTTATTTGATGATATTCACTTTGCTAATAAAAATATAATTCAAAAGAATAGTTATACTTGTCTTTTCT
TGGGAGTTGATTGGGAAAGAAAAGGTGGGAAAACAGCCTTGAAAGCAATTGAATATGTAAGGCAGTTATATGGGA
TCGATGTTAGACTAAAAATTTGTGGATGTACTCCGAATCAAAAGATTTTACCTACTTGGGTTGAATTAATTGATA
AAGTAGATAAAAATAACGTTGACGAATATCAGAAATTCATCGATGTGTTATCTAACGCTGATATACTTCTTTTAC
CAACCATTGCTGAATGTTATGGAATGGTATTTTGTGAAGCTGCTGCTTTTGGATTGCCTGTTGTCGCTACAGATA
CAGGTGGAGTCAGTTCTATAGTTATCAACGAAAGGACGGGGATATTAATTAAAGACCCGTTAGACTATAAGCACT
TTGGAAATGCAATTCATAAAATAATTAGTTCCGTAGAGACTTATCAAAACTACTCCCAAAACGCAAGAATTAGAT
ATAATAATATATTGCATTGGGACAATTGGGCTAAAAAGATAATTGAGATTATGTATGAGCATAAGAATAGAAGAA
TCAAATAGCACAAAAAGAATTATATGTTTATTTATACTTTTTCTTGTTTTCCCTGATTTTTTGTTTTATACATTA
GGGGTTGATAATTTTAGCATTTCAACGATAATCTCAATTACATTGCTTTTTGTTTTTTTAAGAGCTAAAAATATT
TGCAAAGATAATTTTCTAATAATAGTAGCGTTATTCATATTGTTGTGTTTTAACTGTTTGTTAAGTATGCTATTT
AATATTGAACAGGCTTTAACATTTAAAGTTGTACTTTCAATATATAGCATCTTAATAATGGCATACGTCTCCTCT
TGTTATGCACAGACGTTGTGGTTATGTTCTGAAGAAATACTTAAGAGATCCGTCTTTTATTTGTTCGCATTTCTT
TGCCTTATTGGCATTATAAGTATTCTTTTACAGAAGACTGAGATTATACATGATAAAAGTATGATTCTTTTTCCT
GAACCATCAGCATTTGCATTGGTTTTTATACCTATCTTTTCATTTTGTTTATACTATACAAGAGGGGGGGGGCTA
CTATTGCTCTATATATTATCTTTGGGTATTGCGTTAGGTATCCAGAATTTAACAATGTTGGTAGGCATTGTGATT
AGTGTTTTTGTGATGAAAAAAATAACTATAAGGCAAACTATTGTTATACTTTTGGGGGCATGGATTTTTTCCATG
ATATTAAGTGATTTAGACATTTCTTACTATACATCGCGGCTTGATTTTAAAAATACTACGAACCTATCAGTGCTT
GTATATCTTTCAGGAATTGAAAGAGCTTTCTTGAATTTTATTACAAGTTATGGTCTTGGTATTGGTTTTCAACAA
ATGGGAGTGAATGGGGAGATAGGAATATATCAACAAATTTTAGCTGAACTTGATGCCCCTATGTTAAATATATAC
GATGGCTCATTTATTTCTTCTAAGTTAATATCTGAGTTTGGGGTTATTGGTGCATTAATGTGTATTTTCTATTTT
TTTTATTTTTCCCGATTTTATCTGCGTTTCAAAAAAAGTAAGAGATATTCACCGCAGTATATTTTAGCATATAGC
TTCTACATGTGTTTCTTCATCCCTCTTTTTATACGTGGTGCTGGTTATATAAACCCCTATGTGTTTATGTTATTT
TCATCAATATTTTTGTGCAAATATCACGCTAAAAATATCTTGATGAAATCTAATGTCCAGATAGCTATATAATAG
TAGATTATATTATCATTATCACGTAAATTACATATTAATAGCATATATGATAACTAGGACATAAATAATGTGCAT
TAAAAAAAAACTTAAGTTAATTAAACGATATGGCCTTTATGGTGGTCTTAGGCTTCTTAAAGATATATTCTTAAC
AAAATTTTTATTTTGTTCAAATGTTAGGATTATTAGATTTCCATGTTATATTAGAAAAGATGGAAGTGTTAGTTT
TGGAAAAGGTTTTACATCAGGTGTAGGATTACGAGTTGATGCATTTATGGATGCCGTAGTTTCCATTGGAGAAAA
TGTTCAAATTAATGACTATGTTCACATCGCGGCTATTAATAATGTCATTATTGGTAGAGATACATTAATAGCAAG
TAAAGTATTTATTAGTGATCATAATCATGGTATTTTTTCTAAATCCGATATCCATAGTTCACCAACTATTATTCC
TTCGTCTAGGCCCCTTGAATCTGCACCTGTGTATATTGGAGAGCGTGTGTGGATTGGCGAAAATGTGACAATATT
ACCAGGTGCGTGTATAGGTAATGGTGTAGTTATTGGCGCAAACAGTGTTGTTCGTGGTGAGATTCCTAATAATGT
GATCATTGCTGGTGTTCCAGCTAAAATTGTTAAAAAAATATAACTATGAGCGTATGCAATGGGAAAGAATATAGTT
GTAATATCGGCTGTTAATTTTACAACCGGAGGCCCCTTTACCGTACTAAAAAATGTGCTTACAGCAACTAAAGAT
AGAGCCGAATGTAAATTTATTGCACTGGTTCATAGCTCTGCTGAACTAATGGAATTATTTCCGTGGGTTGAATTT
ATAGAGTATCCAGAAGTCAAGTCTTCGTGGGTTAAAAGATTATATTTCGAATATATAACTTGCAATAGATTATCT
AAGGTGATTAAGGCAACTCATTGGGTATGCTTACATGATATTACAGCAAATGTTAGTGTACCCTATAGATTTGTT
TATTGCCACAATCCTGCACCGTTCTATAAATATTTAAGCTATCGAGATATTATAGGAGAACCTAAATTTTATCTT
TTTTATCTTTTTTATGGGCTTTTATACAATATCAATATAAAAAAGAACACAGCAGTTTTTGTTCAGCAGCAGTGG
CTAAAAAAAGAATTCGAAAAAAAATATAAGTTAAAGAATGTTGTTGTTAGTCGCCCTGAAGATATTTGCCCTTTT
GAAAGTGATGGTTTGGTAAGAAATAATAATAAAAAGGATGTGAGGATATTTTACCCAGCAGTGCCCCGTATATTT
AAAAACTTTGAAGTTATCATACGTGCTGCACAAATATTACAAGATAAAAATATTCATTTTTATCTTACTTTTGAT
GGTACTGAAAATAAGTATGCAAAAAGAATATATAAATTAGCTTCCGAACTGAAAAATGTACATTTCCTCGGTTAC
CTTAATGCAACCGAGATGGTTAACTTTTATCAAGATTCAGATATTATTTGTTTCCCATCGAAACTAGAAACGTGG
GGATTACCATTATCAGAAGCTAAAACATACAAAAAAATGGATATTTGCGGCAGACTTACCTTATGCTCATGAAGTT
TTATATAACTATTCAAAAACTAGATATTTTCCATTTGACGATGAGAAAATACTTGTTCGCTACATATTAGAGTAC
ACAAGTAAAAATATGCATGAAGATATAAAAAATAGTAGGGTGAATTTTAATAATGATGCATTGACTGGTTTTGAA
CAGTTTATTGAATATATCCTCAAGGGGAACTGACGTGGTTTATATTATAATCGTTTCACATGGCCATGATGACTA

TATAGAAAATCTTTTATTAAATTTAAAGTTGCCCTCTGGAAGATTTAAAATAATAGTTCGTGATAACAAAAGTTC
AATGGTTTTAAAAAAAACATGCGAAAAAAATTGCGTAACCTATTTGCATGGAGGGCAATATGGATTTGGACATAA
TAATAACATAGCAGTGTCATATATAATTAATAACTTCATGATTATGAATAATGATTATTTTCTCTTTCTTAACCC
CGATGTATTCATAACCAGTGAAAGTTTGATTAATTATGTTGATTATATAATTAGTAATGATTATAAGTTTAGCAC
ATTATGTCTTTATCGAGATTTTACTAAAAGCAAACATGATTATTCAATACGGAGTTTTCCAACTTTATATGATTT
TCTTTGTTCTTTTTTATTGGGGGTGAATAAAAGTAAAATTAAGAAGGAAAATATACTTTCTGATACTGTAGTTGA
TTGGTGTGCTGGCTCATTTATGCTTATTCATGCTTTAAGTTTCTTAAATGTGAATGGTTTTGATCAAAAATATTT
TATGTATTGTGAAGATATTGACCTTTGTATGCGTTTAAAATTAAGTGGAGTAGATCTTTACTATACTCCCCATTT
TGATGCTATTCATTATGCGCAGCATGAAAATAGAAGAATATTTACTAAAGCATTTCGATGGCATATAAGGAGTAT
TACGCGCTACATATTACGGAAACCAATTCTTTCTTATAAAAACTATAGAAAAATTACATCCGAACTGGTAAAGTG
ATTAAGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAA
CTAAGGAGGATATTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACT
TTGTATACTTATTTGCGAACATTCCAGGCCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATG
TCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCGCTCAACATCGAAAGCCGTGGT
TATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGAAGTGATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAAACTG
GTTCCTTACTATACGGTGAAAGAGTTTGTCGAATCTCTGGAAACGCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCA
GGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATTGATGGTGGT
AACACCTTCTTCCAGGACACTATTCGTCGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTTAACTTCATCGGTACCGGT
GTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTG
GTAGCACCGATCCTGACCAAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGCCGAT
GGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTAT
TCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGAATAACGGTGAA
CTGAGCAGTTACCTGATCGACATCACCAAAGATATCTTCACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGAT
GTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACCGGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCG
CTGTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTTTGCACGTTATATCTCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTTGCCGCATCTAAA
GTTCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTCGTGCGCTGTAT
CTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGCTGCGTCTGAAGAGTACAACTGGGATCTG
AACTACGGCGAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCTGCAGAAAATCACCGAT
GCTTATGCCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAATTGCCGATGACTACCAG
CAGGCGCTGCGTGATGTCGTTGCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCCGGTTCCGACCTTCTCCGCAGCGGTTGCC
TATTACGACAGCTACCGTGCTGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTGACTATTTTGGTGCGCAT
ACTTATAAGCGTATTGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

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

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCGATACCC
AAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAA
GAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAATCA
CTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG
AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCA
TTTGTCGTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATG
ATTGCACGTTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCC
GTCATCCAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGAT
CAGCCGCAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTCGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAACTG
GAACGTACTCAGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCC
GTTGATGCAATGCTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAG
TATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAA
TCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAA
TCTTCCTGCCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCA
GGATTTTCCTTGTTTCCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTA
ACGCTCGTCACATCATAGGCATGCATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATAC
CTCTATTAATCAAACTGAGAGCCGCTTATTTCACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGCTAGCAGT
GAAGATACTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTGGTTCTGCTGTTGTTCGTCACATAATAAATAATACGCAAGA
TAGTGTTGTTAATGTCGATAAATTAACATACGCCGGAAACCTGGAATCGCTCGCTGAAATTTCTGATTCTGAACG
TTATTCATTTGAGCATGCAGATATCTGCGATGCCGAAGCGATGGCTCGTATTTTCGCACAGCACCAGCCAGACGC
GGTGATGCACCTGGCAGCAGAGAGCCACGTTGACCGCTCAATAACTGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATAT
TGTGGGTACTTATGTTCTTTTAGAAGCGGCGCGCAATTATTGGTCTGGTCTGGATGATGAAAAGAAAAAAAACTT
CCGCTTTCATCATATTTCTACTGATGAGGTGTATGGTGACTTACCCCATCCGGATGAAGTAAATAGCAATGAAAC

GTTGCCGCTATTTACGGAAATGACAGCATACGCGCCAAGTAGTCCATATTCTGCTTCTAAAGCTTCCAGCGATCA
TTTGGTTCGCGCATGGAAACGTACTTATGGTTTACCGACCATTGTGACTAATTGCTCGAACAACTATGGTCCTTA
TCATTTCCCGGAAAAGCTTATTCCACTGGTTATTCTTAATGCACTGGAAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAA
AGGAGATCAGATCCGCGACTGGTTGTATGTAGAGGATCATGCTCGAGCGTTATATACCGTCGTAACCGAAGGTAA
AGCGGGCGAAACTTATAACATTGGTGGACACAACGAAAAGAAAAACATCGACGTAGTGTTCACTATTTGTGATTT
GTTGGATGAGATAGTCCCGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAAATTACCTATGTTGCTGATCGCCCAGGGCATGA
TCGCCGTTATGCAATTGATGCCGATAAAATTAGCCGCGAATTGGGCTGGAAACCACAGGAAACGTTTGAGAGCGG
GATTCGTAAAACTGTGGAATGGTATCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAATGTGAAAAGTGGTGCCTATCAATC
GTGGATTGAACAGAACTATGGGGGCCGCCACTAATGAATATCCTCCTTTTTGGCAAAACAGGGCAGGTTGGTTGG
GAACTACAGCGTGCTCTGGCACCTCTGGGTAATTTGATTGCTCTTGATGTTCACTCCACTGATTACTGTGGTGAT
TTTAGTAACCCTGAAGGTGTGGCTGAAACCGTTAGAAGCATTCGGCCTGATATTATTGTCAACGCAGCCGCTCAC
ACCGCAGTAGACAAAGCAGAATCAGAACCGGAGTTTGCACAATTACTGAACGCGACGAGTGTCGAAGCGATCGCG
AAAGCAGCCAATGAAGTCGGCGCTTGGGTTATTCACTACTCTACTGACTACGTATTTCCGGGGACCGGTGAAATA
CCATGGCAGGAGGAGGATGCAACCGCACCGCTAAATGTTTACGGTGAAACCAAGTTAGCAGGAGAAAAAGCATTA
CAAGAGCATTGTGCGAAGCACCTTATTTTCCGGACCAGCTGGGTCTATGCAGGTAAAGGAAATAACTTCGCCAAA
ACGATGTTGCGTCTGGCAAAAGAGCGTGAAGAATTAGCCGTTATTAATGATCAGTTTGGTGCGCCAACTGGCGCA
GAGTTGCTGGCTGATTGTACGGCACATGCCATTCGTGTGGCACTGAATAAACCGGAAGTCGCAGGTTTGTACCAT
CTGGTAGCCAGTGGTACCACAACCTGGCACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGCATT
CCCCTTGCACTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAACAACAGTCTATCCTACACCAGCTCGTCGTCCACATAACTCT
CGCCTTAATACAGAAAAATTTCAGCAGAACTTTGCGCTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTTGGTGTGAAACGCATG
CTCAACGAATTATTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTGATGGTGGAACAAGATGAATT
AAAAGGAATGATGGAATGAATACGCGTAAAGGTATTATTTTAGCGGGTGGTTCTGGTACACGTCTTTATCCTGTG
ACTATGGCTGTCAGTAAACAGCTGTTACCGATTTATGATAAACCGATGATCTATTACCCGCTCTCTACACTGATG
TTGGCGGGTATTCGCGATATTTTGATTATCAGCACGCCACAGGATACTCCTCGTTTTCAACAACTGCTGGGTGAT
GGGAGCCAGTGGGGGCTAAATCTTCACTACAAAGTGCAACCGAGTCCGGATGGTCTTGCGCAGGCATTTATCATC
GGTGAAGAGTTTATCGGTGGTGATGATTGTGCTTTGGTACTTGGTGATAATATCTTCTACGGTCACGACCTGCCT
AAGTTAATGGATGCCGCTGTTAACAAAGAAAGTGGTGCAACGGTATTTGCCTATCACGTTAATGATCCTGAACGC
TATGGTGTCGTTGAGTTTGATAAAAACGGTACTGCAATCAGCCTGGAAGAAAAACCGTTACAACCAAAAAGTAAT
TATGCGGTAACCGGGCTTTATTTCTATGATAACTACGTTGTGGAAATGGCGAAAAATCTTAAGCCTTCTGCCCGC
GGTGAACTGGAAATTACCGATATTAACCGTATCTATATGGAACAGGGGCATTTATCTGTTGCCATGATGGGACGT
GGATATGCCTGGCTGGACACGGGGACACATCAAAGTCTTATTGAAGCAAGCAACTTCATTGCCACCATTGAAGAG
CGCCAGGGCTTGAAAGTTTCCTGCCCGGAAGAAATTGCTTACCGTAAAGGGTTTATTGATGCTGAGCAGGTGAAA
GTATTAGCTAAACCGCTGAAAAAAAATGCTTATGGTCAGTATCTGCTAAAAATGATTAAAGGTTATTAATAAAAT
GAATGTTATTAAAACAGAAATTCCAGATGTACTGATTTTTGAACCGAAAGTTTTTGGTGATGAGCGTGGTTTCTT
TATGGAAAGCTTTAATCAGAAAGTTTTCGAAGAGGCTGTAGGGCGGAAGGTTGAATTTGTTCAGGATAATCATTC
TAAATCGTGTAAAGGTGTACTTAGAGGTTTACACTTTCAGCTTCCTCCCTTTGAGCAGGCAAAATTAGTAAGGTG
TATAGTTGGCGAGGTATTTGATGTTGCAGTAGACATTAGACCTAATTCTGAAACATTTGGTTCATGGGTTGGAGT
AACTCTTTCGTCAGAAAATAAAAGGCAGCTATGGATTCCAGAAGGATTCGCCCATGGTTTTTTAACTTTAAGTGA
TATTGCAGAGTTTGTTTATAAAACTAACAACTATTATTCTTTAAATCATGAAAGGGGAGTCATTTGGAACGATGA
GGAAATTAACATTGCCTGGCCCTCTCAATCAGAGAAGATTCTGTCACAGAAAGATATTAATTTACCATCATTTAG
ATTTGTTCAAATGTTTAGCAAGTAGTGTTATCTTTACACTGCACATAGTCATCATTTTTTATGCTTTAAGTAAAT
TATATTGCACATCTATAACACAAAGCGCAATAATATTTCGACCTGATGAAGGTTTGTGGTTATTTATCTTTCTAG
GCGTTTTTTATGACTAAAATAGTTGTGGTTTCTACAGCTCCAATATTCCCGACAAATAATGGGTACAAAAGTTCT
GTATTAGGAAGAATTGATGAGTTATTAAATGAGGATAATGAGGTCGTTTTGATTGAAATAAACCTTGAAAATGTT
ACGGAAAAGAAAGATGAATTAATACCAACAAGATTTAATAATATTCAAAGATATGAAGTAAAAAAAATATCTAGA
TCATTTATTGCCGAGTTACAAATATTATTTGATATCAGAACTCGGTATGAACAATTATTTTCTTCTGCTGACATT
AGAGATAACATAAAAAAGATAATTGATTTAGAAAAACCTTCTATTATTATTGCTGAGTCTATATGGGCGTTGCAA
GCATTGCCTATTGAAATTAGTGCGAGAATACACTGTGTTATTCATGATGTGGCAACTGATTTCTTTAAAGAAATG
TTTGTATCTCATAATGAGGTTGTACGAAAAATTTTGTTTTTTAATGATTACCTAAAGTTGAAAATTACTGAAGAA
AATATTATCAAACGTTTGAGAGTTGAGCAATTTATCTTTCTGACAGAAGAAGATAAATGTTGGTATAAAACAAGA
TACAATATTGATGAGGGTTGTTGTTCCTTAGCGAGCAATCATCTTTATGTAGAAAAGATTAAGAGAACTATCAAT
TTCCAAACCCCTTTCCTGCTTATTCCCGGTAGCATTGAATTTTCACAAAATTTTTACGGCTTAAATTGGTTTATA
AAAAATATATATCCTGGATTAAATAGGAAAATAAGAATAGTTGTAACAGGAAAGGCATCAGATAAAAAAATAAAG
ATGTTAAACTGTGGAGAGGAAATTACCTTTACGGGAGAGCTTGACTTTTCCACATATAATAAACTTAGCTCAACA
TGCTTGTGTGTTATTGCACCGATTACAACGGGCACTGGAATTAAAATAAAAATATTAGAAGCTGTACAAAAAGGT
ATTCCTGTACTTACAACAAAATTTGCTTCAAAAGGAATATGTTCCGATTTATGTTTTTATTGCGAGGAGGATACT
GACACAAACTTTGTCAATTTAATTAACAGTTTTCTTGAAACGACATTAAGAGTCCAAGAATGAATTTATTGCTTT
TTTCAGTCCTTGCGTTTGGTTTAATATTGGCTTTGGCCCATAATAATAAAAGTGGAGATATTAACGCATACTTAA
TGTTTTTTCTCGTGGTCCTAATGGTATTAATATCAGGGCTGCGTATGAATGATAGTGATTATATCGAATACAGGA
AAATGTATAATGAAGTGCCTATTTTATGTGACTTTAGTCTCGCATCTATAAGAGATATACATGGGGAGGTAGGCT

ATCTATTCTTATCATCAATCTTTAAAACTTTATGCTTGCCATTTCAATTATTTCTTTTTTTTATTGCTTTTTTAT
CACTCCTGCTTACATATTTTTCATTCAGAAAAATAAGTTTAATACCGATACTATCGTTAGTTTTTATTTAAGCC
ATGCTTTTATAGTTAGAGATTTGATTCAAATTAGGGCAGGATTAGCTGTTAGCATATCATTATATTCAATAATTA
AATTTAAAGGAAATAAAAGTATAATTACAGGAGTTTTATTTGCTTCTTTGATTCATTCTGGGGCGCTTATTATTG
CTCTTTGTTATCCTTTTTTCAAAAAAAAAATACATAACATTAAAAATGATGTTGTTTTTATTTTTAGTGTCAATTA
TTTTTTCTTATTTGAATGGGCTTAATTTATCGATACAACTCTTATCTCAATATAGTTTGCTTCCAACTGCAATTT
CGAATTATGTTGGTTGGGAAGAATATGATTATCGGGTGAGTATATTTACTAATCCGGTTTTTATTAAAGGTGTTT
TTTTAATTGTCTTAATGCACAAATATGTACTTTCAGATATTAAAAATGAGAAAATTATAGTGCTTTATAACTTAT
ATGTTTTAGGTGTATTAGCTATGGTTGCATTGAGTGGGATGGCTATTCTTTCAGGCCGTCTTTCATCCTTTCTGA
CACTAGGTGAAAGCATTTTAATTGTATATGCTCTGTTCTACAAAAGAAATACACCTCTGGCGTTTCTAATTTTTT
CTTTTTTAACAATTGTGCAATTAGGATATGATCTATTTATTTCTAATGTGCATCCTGAGCTTACTCTGATTATAT
TTGGGTGAATCTAAGTGAAAAATAATAAAATAGGCATACTTATCTCTAAAATACAAAATCTTGGACCTGTGAATG
TAGTACGAGGATTGATAAAAGAAAATAAAAAATATGCTTTTACTGTTTTTGTTTAACAAATAGCGTAGATAAAA
ATATATATGATGAGTTATGCTGTTTAGGAGCCAAGGTTATATTAATACCAGATGGTACTTGGTTCAGCAAAATTT
TATTTGTGAGAAGTTTTTTAAAGGAACATCCACATAATATCTTACATTCACATGGGATCACGGCCGATATGTTTT
CTTACTTTCTGAATGGCGTGAAAATATCTACTATTCACAATAGACTAGATGAGGATTATATCCCATTATTTGGCG
CGGTTAAAGGGAATGCTATATATTATCTTCATCGTTTTATATTACGAAGATTTAATCATATCGTTGCTTGCTCAG
CAGCGGTCCAATCAAAACTGAAACAATCGAAAGTAAAAACTAAAATAACCACCATCCAGAATGGGATTGATATAA
CTAGGTTTAAGACACTTGAGTCTGATAAAAAAAAATTATTGAGGGAAAAACACGGATTTGATAGTGAAAAAAGAA
TATTTATATATTGTGGCTCGTTATCATTAAGGAAAAATATTGCTTACCTCTTGGAACACTTAGCCATCGAAGAAA
ATGATATATTTTTAATTCTAGGTGATGGTGAACTTTTTAGATATTGTAAGGATAAATATTCTAAAGATTTACGGT
ATATATTTATGGGGAAAGTTGAATGCCCTCTTGAATATTATCAATTATCAGATATTTTTGTTTCCGCTTCTTTAT
CGGAAGGGCTCCCCTTGGCACTATTAGAAGCTGCCTCTACTGGGTGCTATTTATATGTTAGCGATATAGAGCCCC
ATAGAGAAATTGCATCTCTATTAGGAGAGGAAAATATTTCTATGTTTAAAATTAAGGATGGATCATATAATTATT
TGCAACCTAAAATAAAAAAAGCTGACTATAACGCTCTTTCTGACGATAAACTTTACAATATATCCGATAAAAAAA
TGTCAAATCTTTATGACAAACTTTTTGTTTCTTTATTAGAGCAGAGGCACTAATATAATGATTTATGTTTCGGTA
ATTTCTCATGGTCATTTCAAAACTCTTAAGGAATTAGGAGCAGTATCAAAATTAAATAATCACAGCAGAATTAAA
GTTATCATCAAAGATAATTTAGGAGAGAGCGAGCTTTTGGATTTTTGTCAGGAAAACAAAATAACTTATTTAAGG
TCTAAAGAGAAAAAAGGATTTGGAGAGAATAATAATGAAGTTTTTTCCTCTATATCCTCCTTAATTACTAAGGAA
GATTTTTTTGTGGTTATGAATCCTGATATATATATTGAGTGCTCTGATCTATTAGATGTCGTAGATGAGTGTGGT
TCAGCGAATGTTAATCTAGCAACGATAAATTTATACAGGGATTTTGATAAAAAAACATATGATAACTCAGTAAGG
AAATTTCCCTCGGCAATTGATTTTTTTATGTCATTTTTATTTAAGAAAAATGACTGTGTAGTAAATAAGAACAAA
ATAACGAAACCAACATATGTTGATTGGGCTGCAGGTTCTTTTCTAATATTTAATGCCTTCTTTTATTCAAAACTC
AACGGATTCAACGAAAAGTATTTTATGTATTGCGAAGATATTGATATATGTTGGCGAGCTAAAAAACACTTCAAT
ACTTCAGTTTTATACTATCCATGCTATGCAGCAATTCATTTGGCACAATTTAACAATCGTAGGATTTTTAGTAGA
CATTTCATTTGGCATATAAAAAGTATTATCCTTTTTTTATTATATAAAAATGGTATGCTGCGTTCTAGTAAGTTG
CTTTAATGCTAATATTCTTTTAAGAGGTGAGAATGATACCTGTTATTTTGGCTGGTGGTTCGGGAAGTCGCTTGT
GGCCACTTTCACGAGAAAAGTTCCCCAAGCAGTTTTTAAAGTTGACTGGCAGTTTGACAATGTTGCAGTCAACAT
TGTCACGTCTTAATAATTTAAATGCTGATGATTCAATAGTTATATGCAACGAAGAGCATAGATTTATTGTTGCAG
AACAATTAAGAGAGTTAGGCAAACTTTCAAATAACATTATTCTTGAACCCAAAGGTCGTAATACAGCCCCTGCTA
TAACACTCGCAGCATTAGCAGCAAAAAGAAAATTCGCTGATGAAGATCCATTGATTCTTATTTTAGCTGCAGATC
ACAACATCCAAGACGAACATGTTTTCTGTGAGGCAATTAATAAGGCGTCATCTTTAGCTAGTTATGGAAAACTAG
TGACTTTTGGTATCGTTCCATTCAAACCTGAAACTGGGTATGGCTATATTCGTCGCGGTGATGAAGTGCCTGTAG
ATGAGCAGCATGCGGTGGCCTTTGAAGTGGCGCAGTTTGTCGAAAAACCGAATCTGGAAACCGCGCAGGCCTATG
TGGCAAGCGGCGAATATTACTGGAACAGCGGTATGTTCCTGTTCCGTGCCGGACGCTATCTCGAAGAACTGAAAA
AGTATCGTCCGGATATTCTCGATGCCTGTGAAAAAGCGATGAGCGCCGTCGATCCGGATCTCGATTTTATTCGTG
TGGATGAAGAGGCGTTTCTCGCTTGTCCGGAAGAGTCGGTGGATTACGCGGTCATGGAATGCACGGCAGATGCCG
TTGTGGTGCCGATGGATGCGGGCTGGAGCGATGTCGGTTCCTGGTCTTCATTATGGGAGATCAGCGCCCACACCG
CCGAGGGCAACGTTTGCCACGGCGATGTGATTAATCACAAAACTGAAAACAGCTATGTGTACGCCGAATCTGGCC
TGGTCACCACCGTCGGGGTGAAAGATTTGGTGGTAGTGCAGACCAAAGATGCAGTGCTGATTGCCGACCGTAATG
CGGTGCAGGATGTGAAGAAAGTGGTCGAGCAGATCAAAGCTGATGGTCGCCATGAGCATCGGGTGCATCGCGAAG
TGTATCGTCCGTGGGGCAAATATGACTCTATCGACGCGGGCGACCGCTACCAGGTGAAACGCATCACCGTGAAAC
CGGGCGAAGGTTTGTCGGTACAGATGCATTATCATCGCGCGGAACACTGGGTGGTTGTCGCGGGAACGGCAAAAG
TCACTATCAACGGTGATATCAAACTGCTTGGTGAAAACGAGTCCATTTATATTCCGCTGGGGGCGATGCACTGCC
TGGAAAACCCGGGGAAAATAGATTTAGAATTAATTGAAGTTCGCTCTGGTGCATATCTTGAAGAAGATGATGTTA
TTAGATGTTATGATCGCTATGGACGAAAGTAATATATAATAATTATTTCAGAATTAGAAATGATAATTATAAGTT
TTCGTCTGGATAAACAATAGATAGTATGGGTTGGAAAATATGAGTTCTTTAACTTGTTTTAAAGCTTACGACATT
CGCGGGAAATTAGGTGAAGAACTGAATGAAGATATCGCCTGGCGCATTGGTCGCGCCTATGGCGAATTTCTCAAA
CCGAAAACCATTGTGTTAGGCGGTGATGTCCGTCTCACCAGCGAAACCTTAAAACTGGCGCTGGCAAAAGGTTTA
CAGGATGCGGGCGTCGATGTGCTGGATATTGGCATGTCCGGCACCGAAGAGATTTATTTCGCCACGTTCCATCTC

GGCGTGGATGGCGGCATTGAAGTTACCGCCAGCCATAATCCGATGGATTACAACGGCATGAAGCTGGTGCGCGAA
GGGGCTCGCCCGATCAGCGGTGATACCGGACTGCGCGACGTCCAGCGTCTGGCAGAAGCTAACGACTTTCCTCCC
GTCGATGAAACCAAACGCGGTCGCTATCAGCAAATCAATCTGCGTGACGCTTACGTTGATCACCTGTTCGGTTAT
ATCAATGTCAAAAACCTTACGCCGCTCAAGCTGGTGATCAACTCCGGGAATGGCGCAGCGGGTCCGGTGGTGGAC
GCTATCGAAGCCCGCTTTAAAGCCCTCGGCGCACCGGTGGAGTTAATCAAAGTGCATAACACGCCGGACGGCAAT
TTCCCCAACGGTATTCCTAACCCGTTGCTGCCGGAATGTCGCGACGACACCCGCAATGCGGTCATCAAACACGGC
GCGGATATGGGCATTGCCTTTGATGGCGATTTTGACCGCTGTTTCCTGTTTGACGAAAAAGGGCAGTTTATTGAG
GGCTACTACATTGTCGGCCTGCTGGCAGAAGCGTTCCTCGAAAAAAATCCCGGCGCGAAGATCATCCACGATCCA
CGTCTCTCCTGGAACACCATTGATGTGGTGACGGCCGCGGGCGGCACGCCGGTGATGTCGAAAACAGGACACGCC
TTTATTAAAGAACGTATGCGCAAGGAAGACGCCATCTACGGTGGCGAAATGAGCGCTCACCATTACTTCCGCGAT
TTCGCTTACTGTGACAGCGGCATGATCCCGTGGCTGCTGGTCGCCGAACTGGTGTGCCTGAAAGGAAAAACGCTG
GGCGAACTGGTGCGCGACCGGATGGCGGCGTTTCCGGCAAGCGGTGAGATCAACAGAAAACTGGCGCACCCTGTT
GAGGCGATTAACCGCGTGGAACAGCATTTTAGCCGTGAGGTGCTGGCGGTGGATCGCACCGATGGCATCAGCATG
ACCTTTGCCGACTGGCGCTTTAACCTGCGCTCTTCCAACACCGAACCGGTGGTGCGCCTGAATGTGGAATCTCGC
GGTGATGTTCAGGTTATGGTAATCCATACTCAAGAAATATTATCAATTTTGACGTCATAAAGAATAAGCCCTGAC
AAGTTAGGGCTTAATTAATATATATTTTTTTTGAATTGGGGATTTGTGGTAAGATTTTTAATATGTTATTTAATG
TGGTTGAATTAATGTTGACTGGAAAATAATAATGAGAACGAAAAAAGCATTACACAACTTTAAAGTTGATTTATT
AATTACTTTTTTATTGGTTTTGCTAGGGTTTTATATTCGAACTGTTTTTGTTTCAAAAATGGGAAGTGATATTAC
TGGAGTGATGTTACTATTCACACAGTTGACAGCATATCTCAATTTGGCAGAATTAGGTATTGGAATTGCAGCTGC
CAGCGTATTATATAAACCGCTCAGCGAGAATGAATACAATAAAATAACTTACATAATATCTTTGCTCTCAGTCAT
ATACAAATATATATTTGTGTTTGTTTTGATTCTTGGCGTTGTTATAGGTATCTGTATTTATTACTTTATTGATTC
TGTAAAGGTTGTAAATGGCGTTTTTTTATATTGGGCTTTGTTCGTTTTTAATACATCGTTGACATATAGTTATGC
TAAATACTCCACATTATTAACTGCTAATCAGCGGTACTCAGCAGTAAGAAAAATTCAAGGTGGCGGAAAAGTTAT
AATAATTGTATTTCAGATATTAATTTTGTGCTTTACGCAAAGTTTCATACTTTATTTGTTAGTTGAGACTTTAGG
TATTTTTTCTCAATATTTGATTTTTAAAAAAATAATTGGGAACGGAAATCAATATCTCAGTAATGAGGTTTTACT
TATTGAAAGCGATAAACTTTTGATAAAAAAAGAATTAAAAATAAGAATAAAAAATATGTTCTTCCATAAAATAGG
TGCTGTGCTTGTCCTTAATACAGACTACCTGCTTGTATCAAAGTTTCTGACATTAAGTTATGTGACAATTTTTGG
CAGCTATATGATGGTATTTCAGATAGTAACTGTTTTGATGTCAAGTTTTGTTAATGCTATTACTGCAGGAATGGG
TAATTACTTAATTAATAAAAGTAATTTAGAAATTAAGGAAATTACACGTCAATTTTATGTGATATTTATCGCCTT
TGCAACATTCATATCACTAAATATGTTTTTTCTTGTTAATGATTTTATCGCAAAATGGATAGGTGTTAATTATAC
ATTAAGTAACACCCTAGTTGCATTAATGATTGTTAACGTATTCATTAGTGTTGTCAGGGTACCTTCTGATATATT
AAAAAACGCAAGTGGACATTTTGGTGATATTTATTATCCATTATTAGAAGGTGTGCTGAATATTACGATATCCAT
CATTTTGGCTATCATTATTGGATTACCTGGCATTATTATAGGGACAATAGTATCTAACTTAATAGTAATAATGCT
TGCGAAACCATTATATCTTTACTCTAAGTTATTTAATCTTAGAAATCCGACGAGGGTTTATTTTGAATTTATTTC
TCGGCCTATGTTATATTCATTATGTGTGATTGGGGTGAGCTATTTATTGCGCGATGAAATATATTCATTTAAAGT
AAGTACATGGTTGGATTTTATTAACAAGCTACTCTTAGTCTCTACTCCTAGCATATTGGTAATATGTGCTATTTT
CTCTACGGATAGTGACTTTAGATTATTTTTCAGAAAAATTATATATGTGATTATGAAGAAATAAAAATTTCGAAA
ATGTATTAATCGAAATTATGCAACGAGCTTTATTTTTATAAATGATATGTGATCTTTTCGCGAATAGGAGTAAGG
ATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGA
GGATATTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATA
CTTATTTGCGAACATTCCAGGCCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGC
AACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCGCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCG
TCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGAAGTGATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAAACTGGTTCCTT
ACTATACGGTGAAAGAGTTTGTCGAATCTCTGGAAACGCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCAGGTGCAG
GCACGGATGCTGCTATTGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATTGATGGTGGTAACACCT
TCTTCCAGGACACTATTCGTCGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTTAACTTCATCGGTACCGGTGTTTCTG
GCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTGGTAGCAC
CGATCCTGACCAAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGCCGATGGCGCAG
GTCACTATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTCTCTGC
TTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGAATAACGGTGAACTGAGCA
GTTACCTGATCGACATCACCAAAGATATCTTCACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCC
TGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACCGGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGCTGTCGC
TGATTACCGAGTCTGTGTTTGCACGTTATATCTCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTTGCCGCATCTAAAGTTCTCT
CTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTCGTGCGCTGTATCTGGGCA
AAATCGTTTCTTACGCCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGCTGCGTCTGAAGAGTACAACTGGGATCTGAACTACG
GCGAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCTGCAGAAAATCACCGATGCTTATG
CCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAATTGCCGATGACTACCAGCAGGCGC
TGCGTGATGTCGTTGCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCCGGTTCCGACCTTCTCCGCAGCGGTTGCCTATTACG
ACAGCTACCGTGCTGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTGACTATTTTGGTGCGCATACTTATA
AGCGTATTGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

## ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

**(по Статье 34)**

**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 *rfb* 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), предпочтительно 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), 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 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 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):

[→3)-α-L-Rhap-(1→3)-α-L-Rhap-(1→3)-β-L-Rhap-(1→4)-β-D-GlcpNAc-(1→]$_n$
2
↑
1
β-D-ManpNAc

(O4-Glc+):

α-D-Glcp
1
↓
3
[→2)-α-L-Rhap-(1→6)-α-D-Glcp-(1→3)-α-L-FucpNAc-(1→3)-β-D-GlcpNAc-(1→]$_n$

(O6A):

[→4)-α-D-GalpNAc-(1→3)-β-D-Manp-(1→4)-β-D-Manp-(1→3)-α-D-GlcpNAc-(1→]$_n$
2
↑
1
β-D-Glcp

(O8):

α-D-Manp3Me-(1→[3)-β-D-Manp-(1→2)-α-D-Manp-(1→2)-α-D-Manp-(1→]$_n$

(O15):

[→2)-β-D-Galp-(1→3)-α-L-FucpNAc-(1→3)-β-D-GlcpNAc-(1→]$_n$

(O16):

[→2)-β-D-Gal*f*-(1→6)-α-D-Glc*p*-(1→3)-α-L-Rha*p*-(1→3)-α-D-Glc*p*NAc-(1→]$_n$
2
↑
Ac

(O18A):

[→2)-α-L-Rha*p*-(1→6)-α-D-Glc*p*-(1→4)-α-D-Gal*p*-(1→3)-α-D-Glc*p*NAc-(1→]$_n$
3
↑
1
β-D-Glc*p*NAc
, и

(O75):

β-D-Man*p*
1
↓
4
[→3)-α-D-Gal*p*-(1→4)-α-L-Rha*p*-(1→3)-β-D-Glc*p*NAc-(1→]$_n$

соответственно, 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.

**2.** Способ по п. 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.

**3.** Способ по п. 2, где рекомбинантная прокариотическая 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.

**4.** 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 *rfb* 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), предпочтительно 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), 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 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 гликзилировать бактопренол, и

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

(O1A):

[→3)-α-L-Rha*p*-(1→3)-α-L-Rha*p*-(1→3)-β-L-Rha*p*-(1→4)-β-D-Glc*p*NAc-(1→]*n*
2
↑
1
β-D-Man*p*NAc

,

(O4-Glc+):

$$\begin{array}{l} \alpha\text{-D-Glc}p \\ \quad\ 1 \\ \quad\ \downarrow \\ \quad\ 3 \\ [\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rha}p\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glc}p\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fuc}p\text{NAc-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glc}p\text{NAc-}(1\rightarrow]_n \end{array}$$

,

(O6A):

$$\begin{array}{c} [\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Gal}p\text{NAc-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Man}p\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Man}p\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Glc}p\text{NAc-}(1\rightarrow]_n \\ 2 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta\text{-D-Glc}p \end{array}$$

,

(O15):

$$[\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Gal}p\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fuc}p\text{NAc-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glc}p\text{NAc-}(1\rightarrow]_n$$

,

(O16):

$$\begin{array}{c} [\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Gal}f\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glc}p\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rha}p\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Glc}p\text{NAc-}(1\rightarrow]_n \\ 2 \\ \uparrow \\ \text{Ac} \end{array}$$

, и

(O75):

$$\begin{array}{l} \beta\text{-D-Man}p \\ \quad\ 1 \\ \quad\ \downarrow \\ \quad\ 4 \\ [\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Gal}p\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rha}p\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glc}p\text{NAc-}(1\rightarrow]_n \end{array}$$

,

соответственно, 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.

**5.** Способ по любому из пп. 1-4, дополнительно включающий выделение биоконъюгата из рекомбинантной прокариотической клетки-хозяина.

**6.** Способ по любому из пп. 1 - 5, 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.* предпочтительно где белок-носитель представляет собой обезвреженный экзотоксин A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA), предпочтительно где белок-носитель EPA содержит 1-10, предпочтительно 2-4, более предпочтительно 4 сайта гликозилирования, предпочтительно где каждый сайт гликозилирования содержит консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 2, предпочтительно где белок-носитель EPA содержит SEQ ID NO: 3.

**7.** Способ по любому из пп. 1-6, где рекомбинантная прокариотическая клетка-хозяин представляет собой клетку *E. coli*, например штамм *E. coli* K-12, такой как штамм W3110.

**8.** 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 *rfb* 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), предпочтительно 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), 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 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):

```
[→3)-α-L-Rhap-(1→3)-α-L-Rhap-(1→3)-β-L-Rhap-(1→4)-β-D-GlcpNAc-(1→]n
              2
              ↑
              1
     β-D-ManpNAc
```

,

(O4-Glc+):

α-D-Glcp
1
↓
3
[→2)-α-L-Rhap-(1→6)-α-D-Glcp-(1→3)-α-L-FucpNAc-(1→3)-β-D-GlcpNAc-(1→]$_n$,

(O6A):

[→4)-α-D-GalpNAc-(1→3)-β-D-Manp-(1→4)-β-D-Manp-(1→3)-α-D-GlcpNAc-(1→]$_n$
2
↑
1
β-D-Glcp
,

(O8):

α-D-Manp3Me-(1→[3)-β-D-Manp-(1→2)-α-D-Manp-(1→2)-α-D-Manp-(1→]$_n$

(O15):

[→2)-β-D-Galp-(1→3)-α-L-FucpNAc-(1→3)-β-D-GlcpNAc-(1→]$_n$,

(O16):

[→2)-β-D-Galf-(1→6)-α-D-Glcp-(1→3)-α-L-Rhap-(1→3)-α-D-GlcpNAc-(1→]$_n$
2
↑
Ac
,

(O18A)

[→2)-α-L-Rhap-(1→6)-α-D-Glcp-(1→4)-α-D-Galp-(1→3)-α-D-GlcpNAc-(1→]$_n$
3
↑
1
β-D-GlcpNAc
и

(O75):

β-D-Manp
1
↓
4
[→3)-α-D-Galp-(1→4)-α-L-Rhap-(1→3)-β-D-GlcpNAc-(1→]$_n$ соответственно, 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.

**9.** Рекомбинантная прокариотическая клетка-хозяин по п. 8, 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.

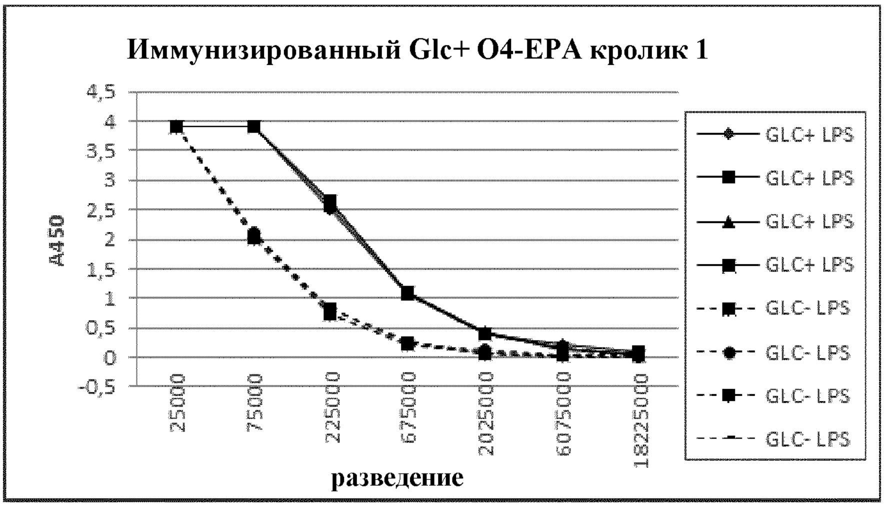
**10.** Рекомбинантная прокариотическая клетка-хозяин по п. 9, где рекомбинантная клетка-хозяин дополнительно содержит последовательность, кодирующую GtrS, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и нуклеотидную последовательность, кодирующую GtrA и GtrB, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7 и 8 соответственно.

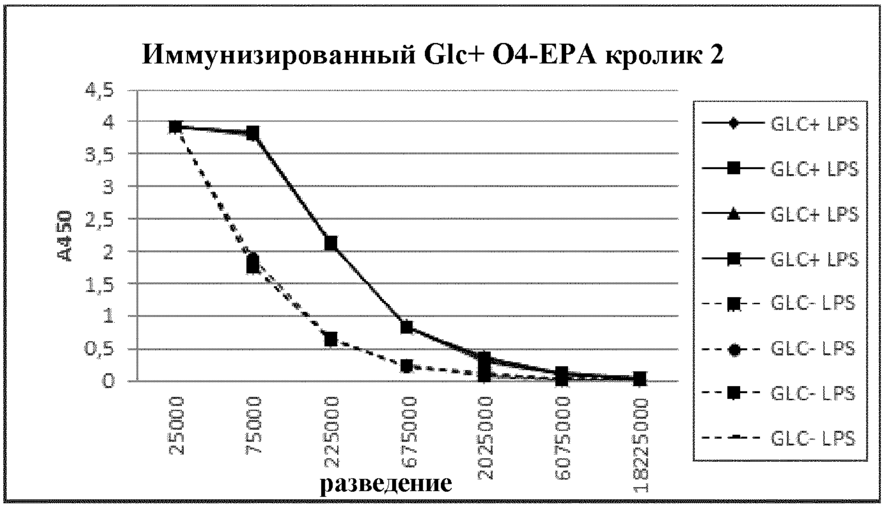
**11.** Рекомбинантная прокариотическая клетка-хозяин по любому из пп. 8 - 10, где белок-носитель выбран из группы, состоящей из обезвреженного экзотоксина A *P. aeruginosa* (EPA), флагеллина *E. coli* (FliC), CRM197, мальтозосвязывающего белка (MBP), дифтерийного анатоксина, столбнячного анатоксина, 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,*

предпочтительно где белок-носитель представляет собой обезвреженный экзотоксин A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA), предпочтительно где белок-носитель EPA содержит 1-10, предпочтительно 2-4, более предпочтительно 4 сайта гликозилирования, предпочтительно где каждый сайт гликозилирования содержит консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 2, предпочтительно где белок-носитель EPA содержит SEQ ID NO: 3.

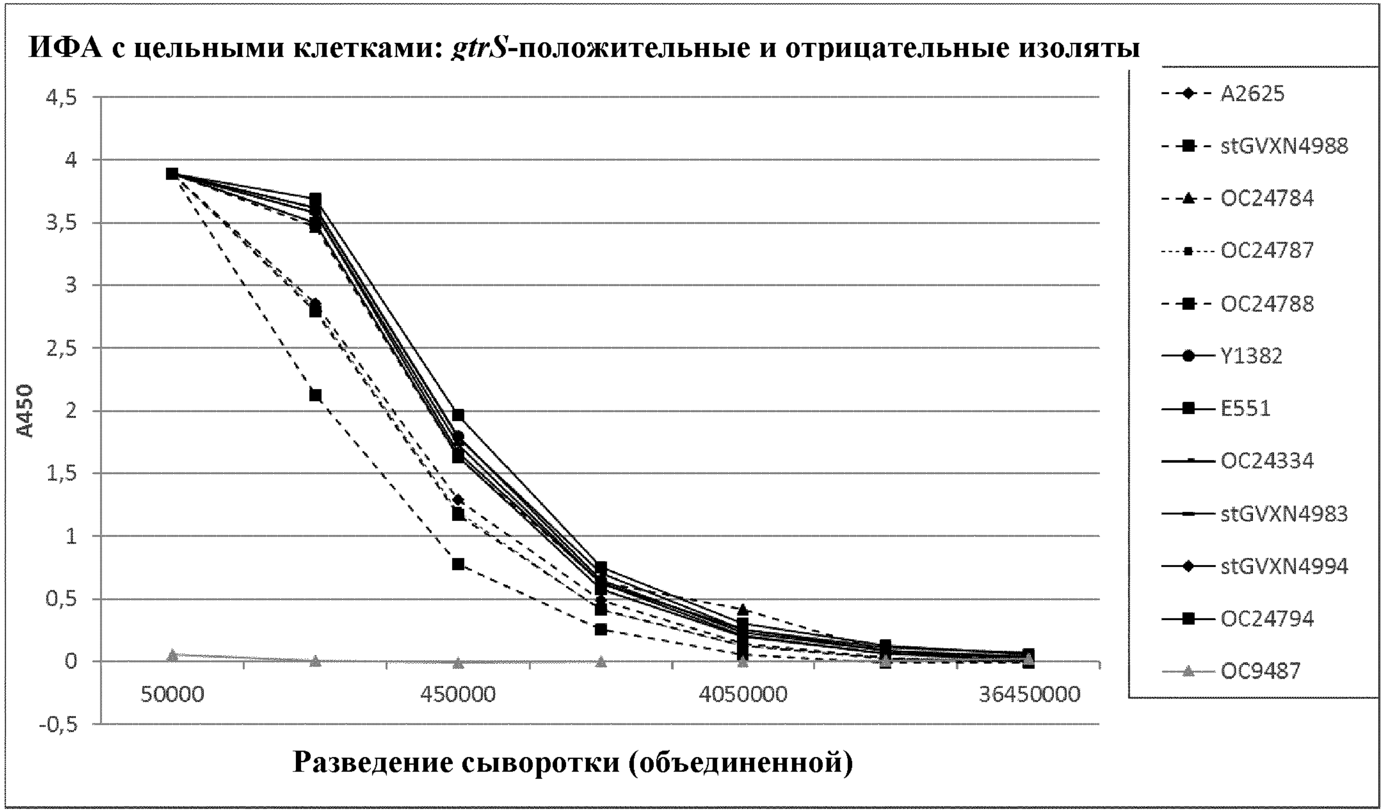
**12.** Рекомбинантная прокариотическая клетка-хозяин по любому из пп. 8-11, которая представляет собой клетку *E. coli*, например штамм *E. coli* K-12, такой как штамм W3110.

**СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ БИОКОНЪЮГАТОВ ПОЛИСАХАРИДНЫХ О-АНТИГЕНОВ *E. COLI*, ИХ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**



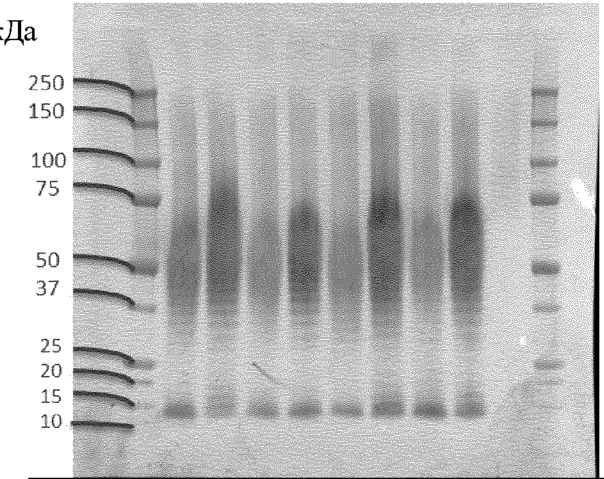




**Фиг. 1**


ИФА с цельными клетками: *gtrS*-положительные и отрицательные изоляты
A450
4,5
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
-0,5
50000
450000
4050000
36450000
Разведение сыворотки (объединенной)
A2625
stGVXN4988
OC24784
OC24787
OC24788
Y1382
E551
OC24334
stGVXN4983
stGVXN4994
OC24794
OC9487

**Фиг. 2**

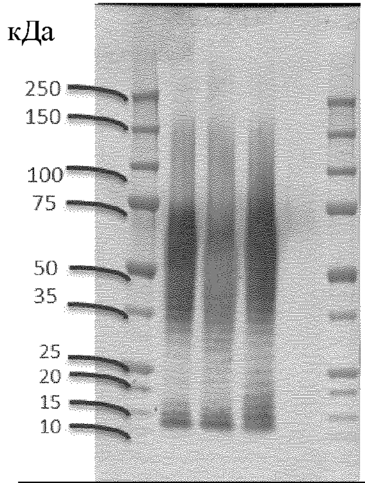
**Гель 1**




дорожка 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

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

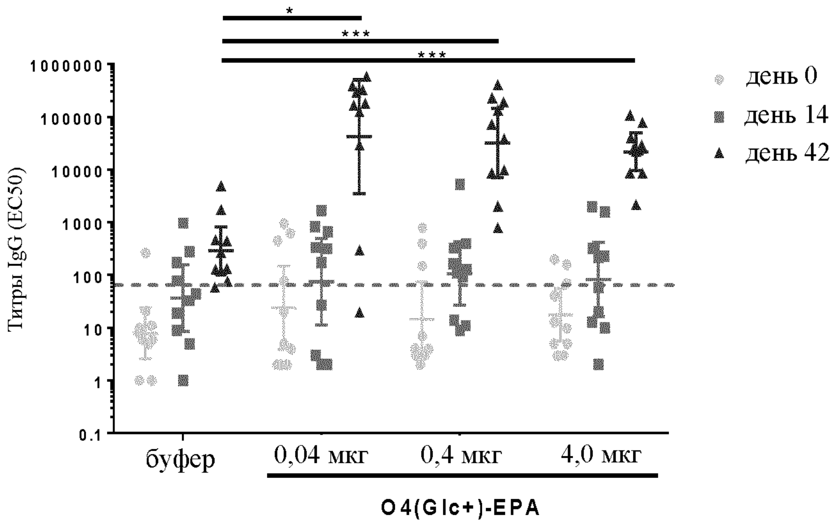
**Гель 2**



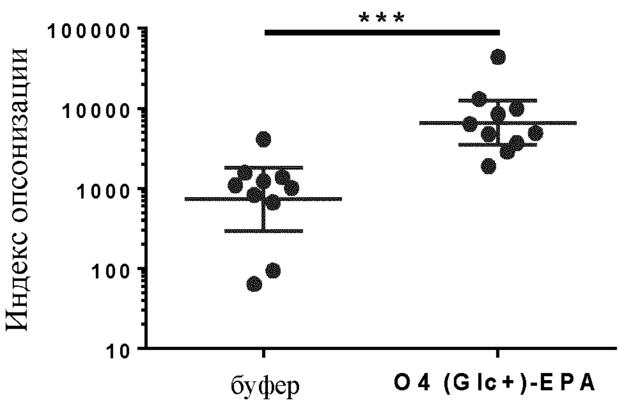

дорожка 1 2 3 4 5 6

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

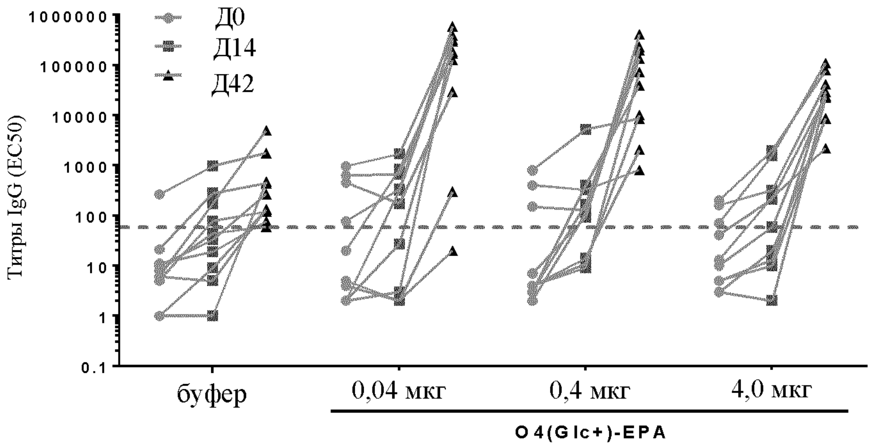
**Фиг. 3**


*
***
***
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0.1
Титры IgG (EC50)
день 0
день 14
день 42
буфер
0,04 мкг
0,4 мкг
4,0 мкг
O4(Glc+)-EPA

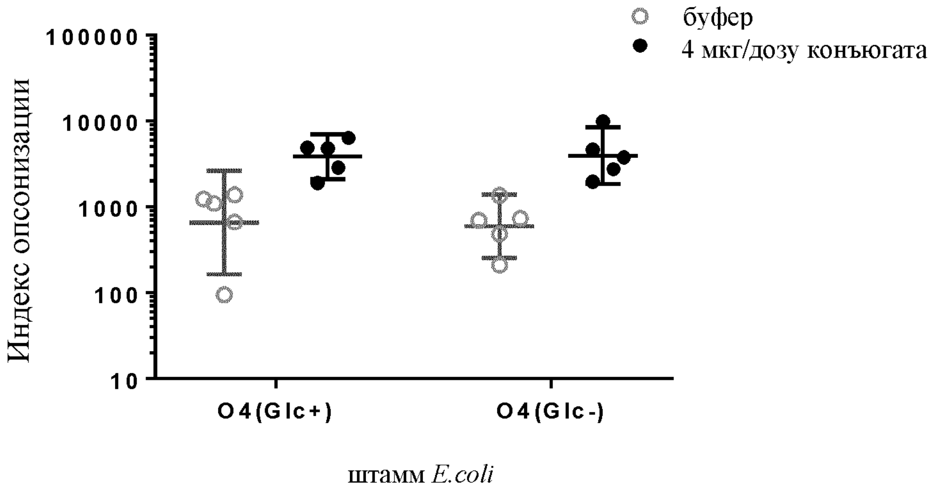
**Фиг. 4А**


***
100000
10000
1000
100
10
Индекс опсонизации
буфер
O4 (Glc+)-EPA

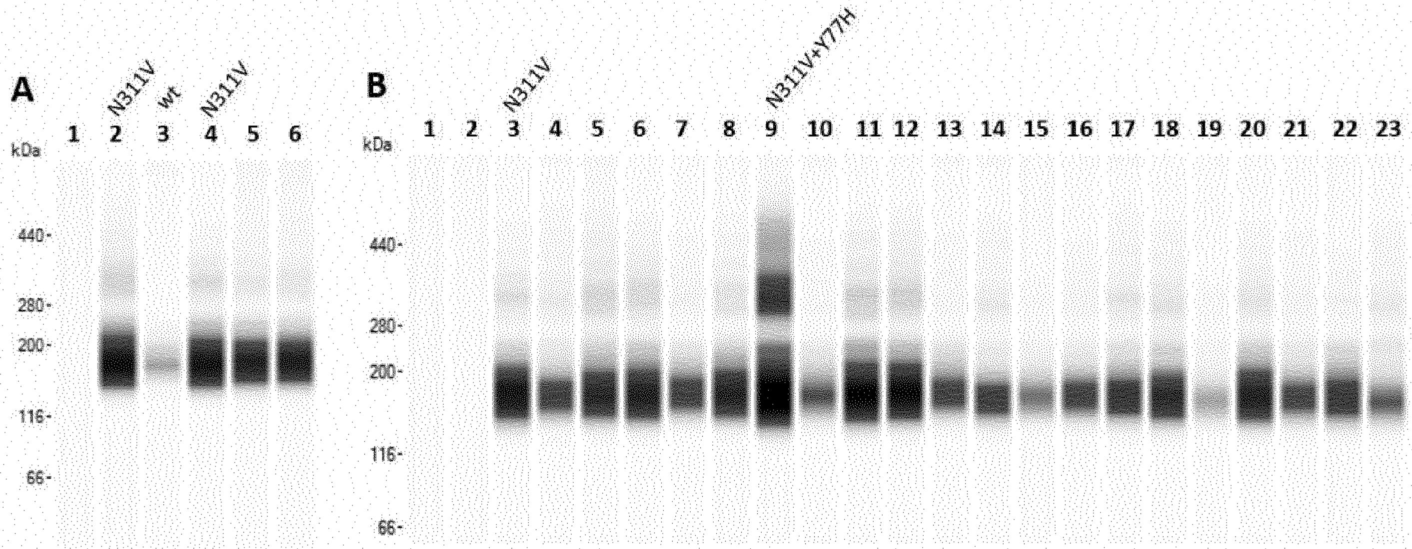
**Фиг. 4В**


1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0.1
Д0
Д14
Д42
Титры IgG (EC50)
буфер
0,04 мкг
0,4 мкг
4,0 мкг
O4(Glc+)-EPA

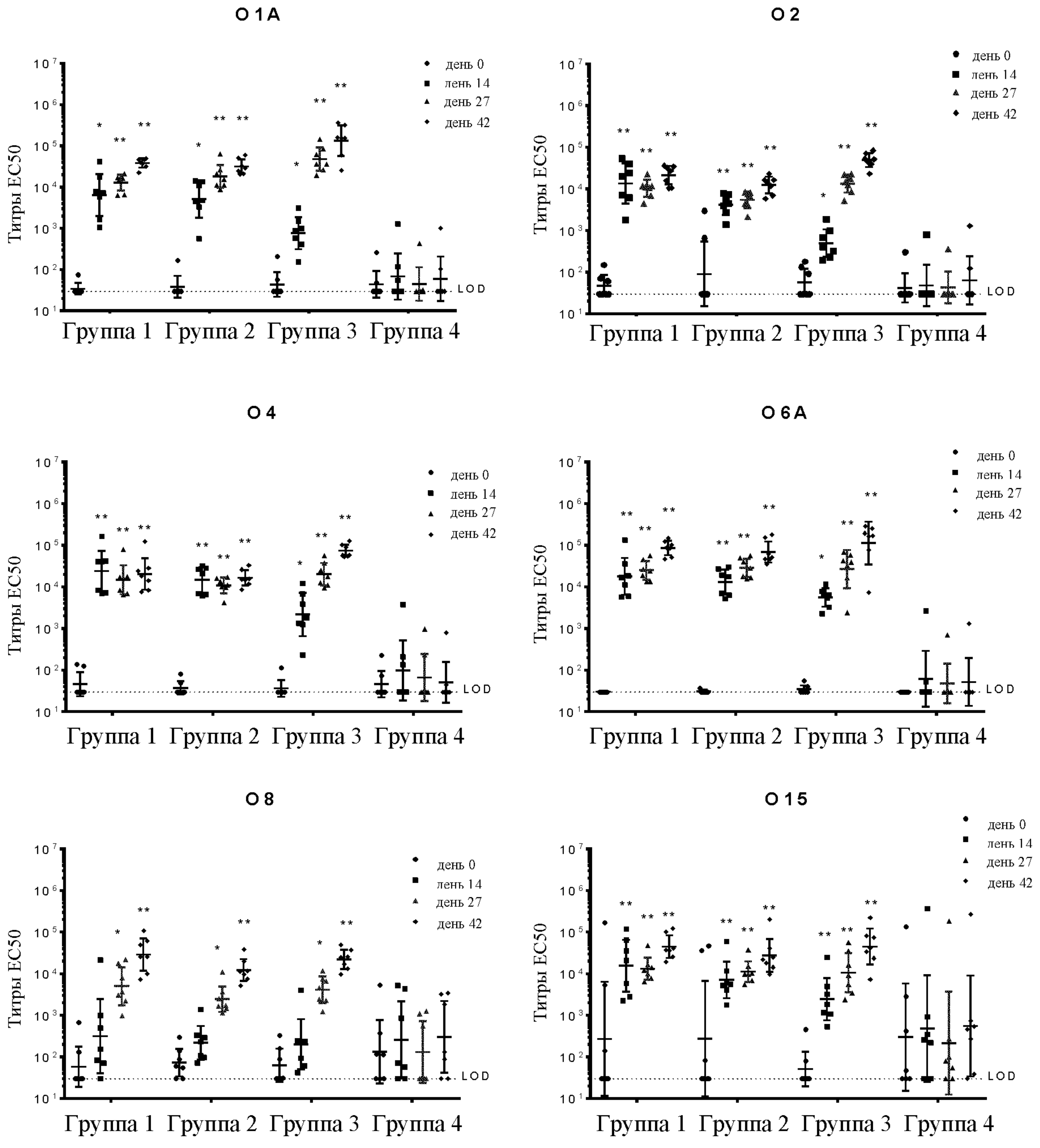
**Фиг. 5**


буфер
4 мкг/дозу конъюгата
100000
10000
1000
100
10
Индекс опсонизации
O4(Glc+)
O4(Glc-)
штамм *E.coli*

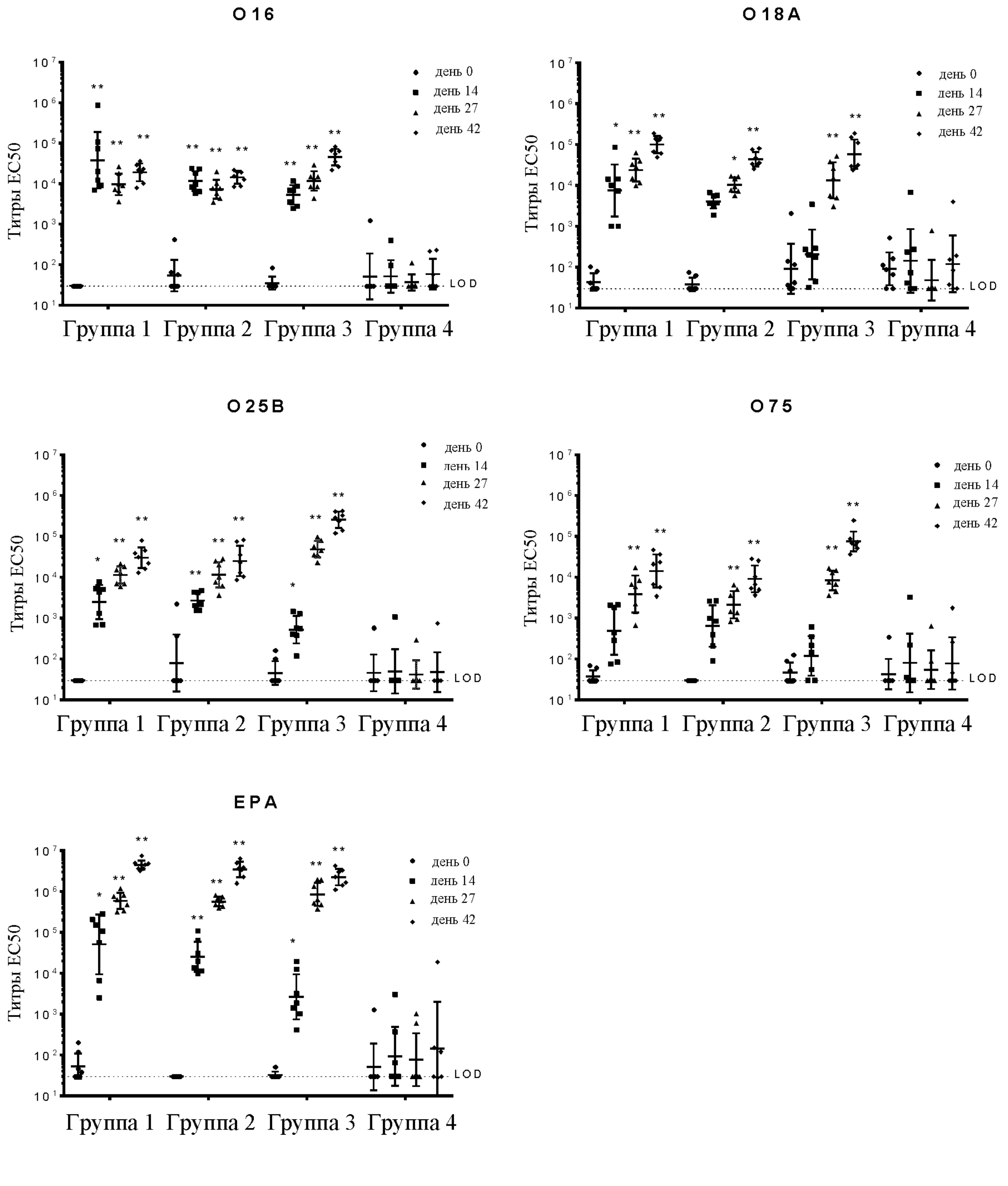
**Фиг. 6**


A
N311V
wt
N311V
1 2 3 4 5 6
kDa
440
280
200
116
66
B
N311V
N311V+Y77H
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23
kDa
440
280
200
116
66

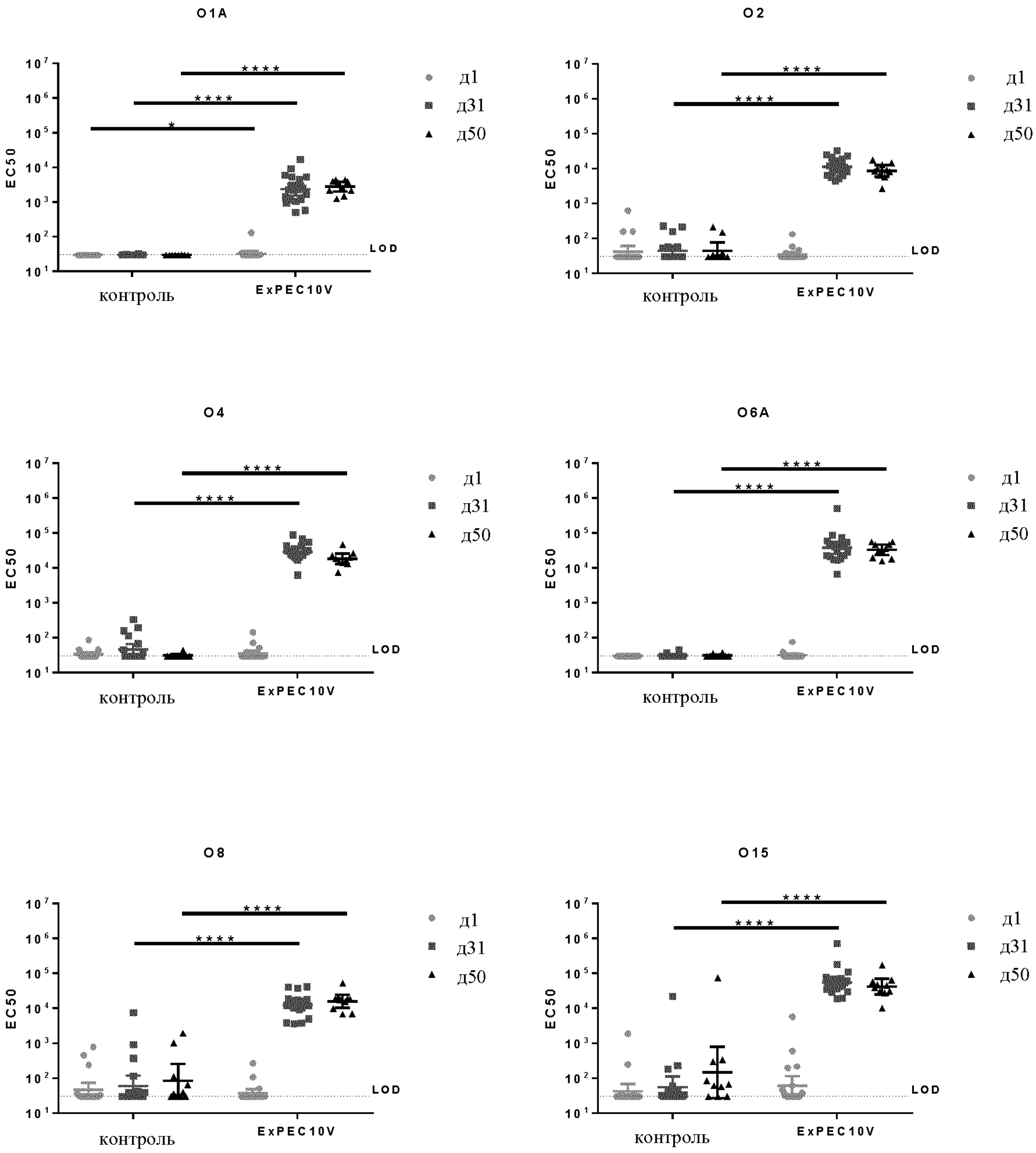
Фиг. 7


O1A
O2
O4
O6A
O8
O15
день 0
лень 14
день 27
день 42
Титры EC50
LOD
Группа 1
Группа 2
Группа 3
Группа 4

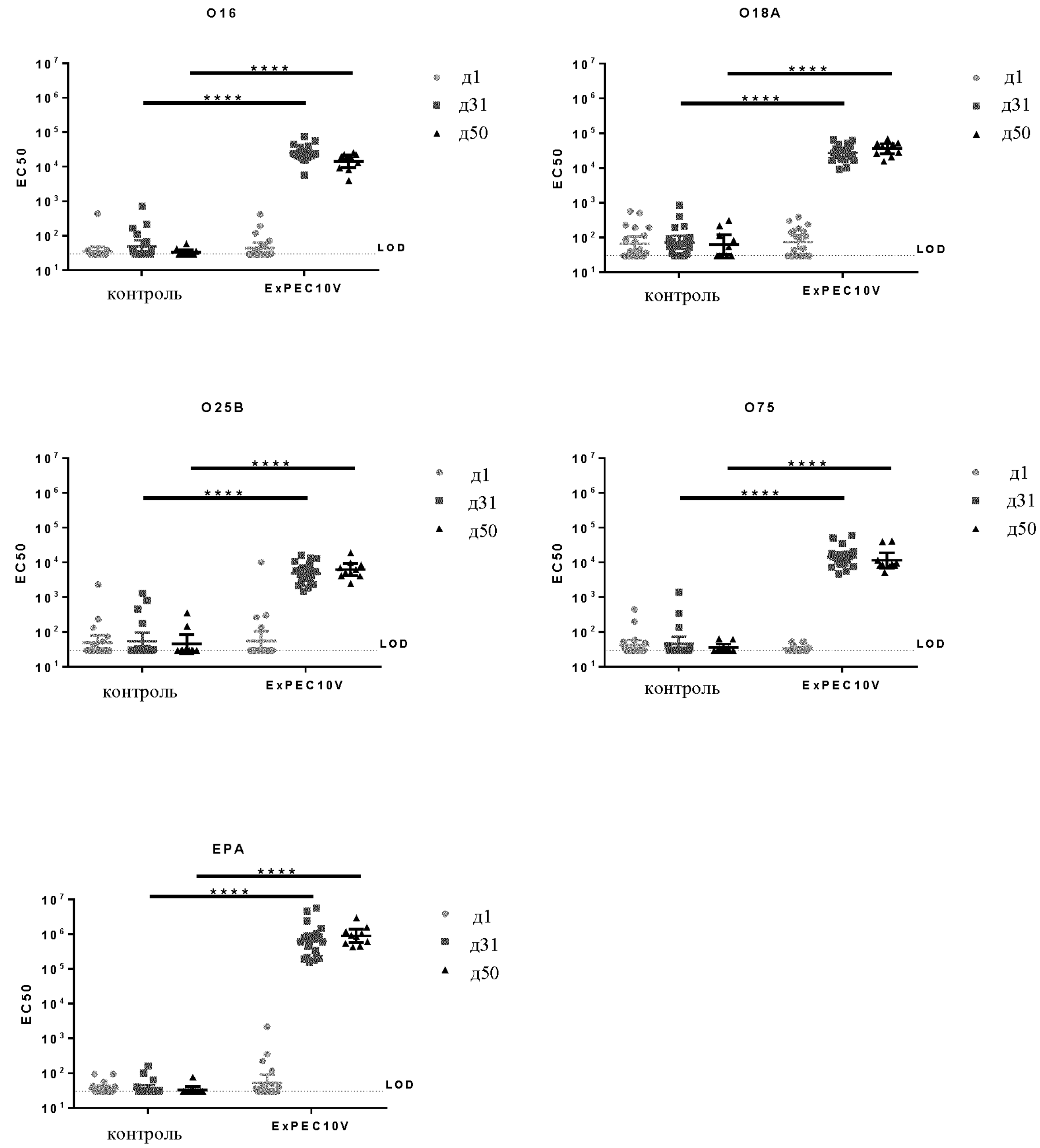
**Фиг. 8**



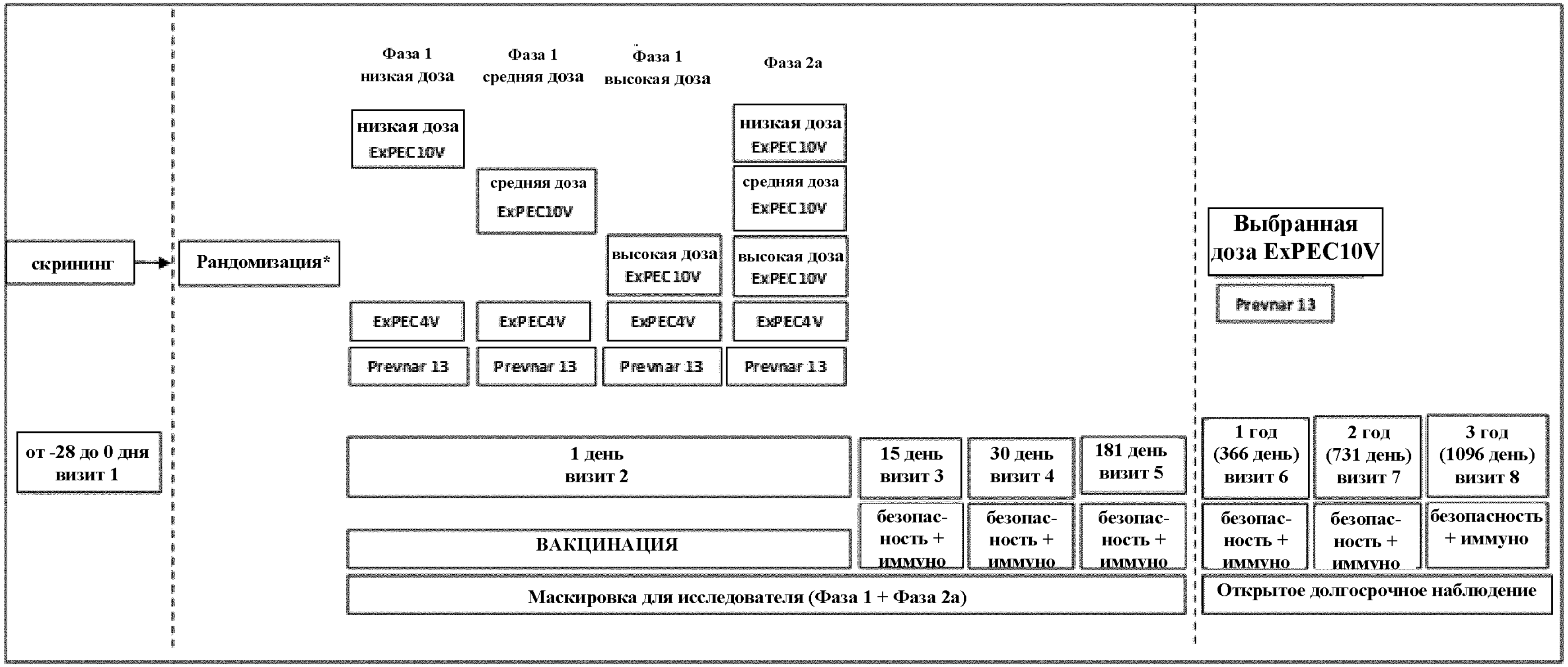

**Фиг. 8 – продолж.**



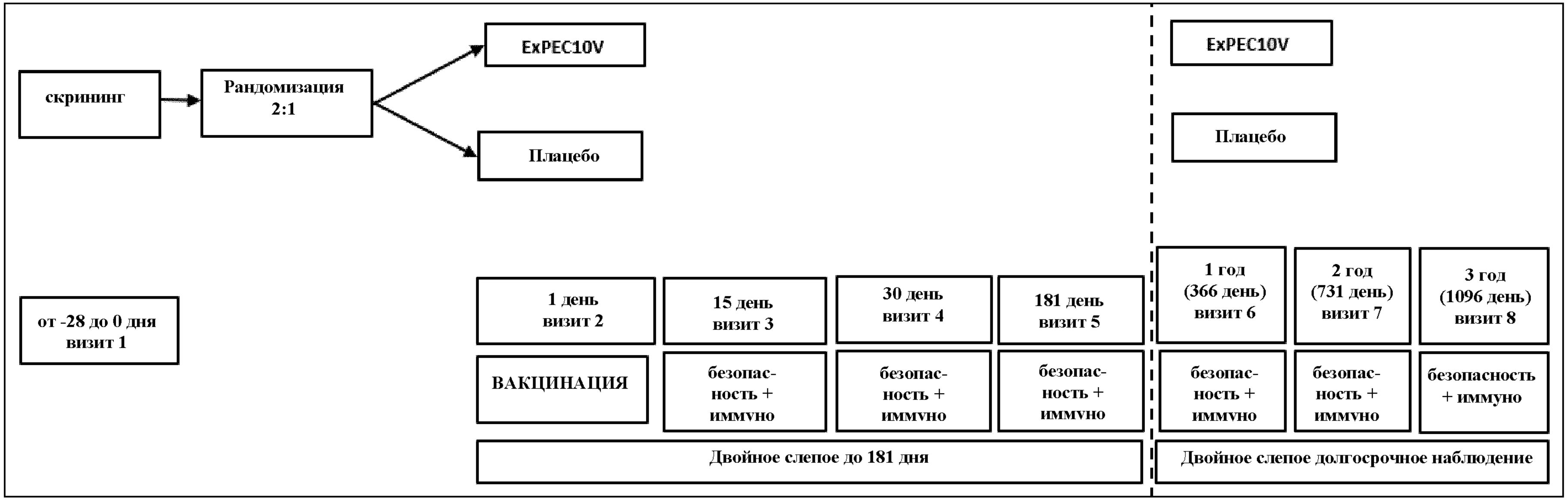

**Фиг. 9**




**Фиг. 9 – продолж.**


скрининг
Рандомизация*
Фаза 1 низкая доза
Фаза 1 средняя доза
Фаза 1 высокая доза
Фаза 2а
низкая доза ExPEC10V
средняя доза ExPEC10V
высокая доза ExPEC10V
низкая доза ExPEC10V
средняя доза ExPEC10V
высокая доза ExPEC10V
ExPEC4V
ExPEC4V
ExPEC4V
ExPEC4V
Prevnar 13
Prevnar 13
Prevnar 13
Prevnar 13
Выбранная доза ExPEC10V
Prevnar 13
от -28 до 0 дня визит 1
1 день визит 2
15 день визит 3
30 день визит 4
181 день визит 5
1 год (366 день) визит 6
2 год (731 день) визит 7
3 год (1096 день) визит 8
ВАКЦИНАЦИЯ
безопас-ность + иммуно
безопас-ность + иммуно
безопас-ность + иммуно
безопас-ность + иммуно
безопас-ность + иммуно
безопасность + иммуно
Маскировка для исследователя (Фаза 1 + Фаза 2а)
Открытое долгосрочное наблюдение

Фиг. 10А


скрининг
Рандомизация 2:1
ExPEC10V
Плацебо
ExPEC10V
Плацебо
от -28 до 0 дня визит 1
1 день визит 2
15 день визит 3
30 день визит 4
181 день визит 5
1 год (366 день) визит 6
2 год (731 день) визит 7
3 год (1096 день) визит 8
ВАКЦИНАЦИЯ
безопас-ность + иммуно
безопас-ность + иммуно
безопас-ность + иммуно
безопас-ность + иммуно
безопас-ность + иммуно
безопасность + иммуно
Двойное слепое до 181 дня
Двойное слепое долгосрочное наблюдение

**Фиг. 10B**