(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202390874 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.08.02

(22) Дата подачи заявки
2021.09.17

(51) Int. Cl. *A61K 39/108* (2006.01)
A61P 13/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(54) ПОЛИВАЛЕНТНЫЕ ВАКЦИННЫЕ КОМПОЗИЦИИ И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **63/079,734; 21154782.3; 63/191,471**
(32) **2020.09.17; 2021.02.02; 2021.05.21**
(33) **US; EP; US**
(86) **PCT/IB2021/058485**
(87) **WO 2022/058945 2022.03.24**

(71) Заявитель:
ЯНССЕН ФАРМАСЬЮТИКЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Полман Ян Тёнис, Фаэ Келлен Кристина (NL), Сарнецкий Михал (CH), Гёртсен Йерун, Аббана Даррен Роберт (NL), Списсенс Барт Густаф М., Стрёйф Франк Жермен Ф. (BE)

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

(57) Описаны композиции и способы для индуцирования иммунного ответа против внекишечной патогенной Escherichia coli (ExPEC), за счет чего обеспечивается иммунная защита от заболеваний, ассоциированных с ExPEC. В частности, описаны композиции и способы для применения конъюгатов полисахаридного антигена O75 E. coli, ковалентно связанного с белком-переносчиком, для предупреждения инвазивного заболевания, вызываемого ExPEC.

202390874 A1

202390874 A1

НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

ПОЛИВАЛЕНТНЫЕ ВАКЦИННЫЕ КОМПОЗИЦИИ И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0001] Внекишечные патогенные *Escherichia coli* (ExPEC) обычно являются безвредными обитателями кишечника человека наряду с комменсальными штаммами *E. coli*. Однако штаммы ExPEC могут обладать факторами вирулентности для колонизации и инфицирования участков за пределами желудочно-кишечного тракта, вызывая разнообразные и серьезные инвазивные заболевания, приводящие к значительной заболеваемости, смертности и расходам ежегодно (см., например, Johnson et al., *J Lab Clin Med.* 2002; 139(3):155-162; Kohler et al., *Int J Med Microbiol.* 2011; 301(8):642-647; Foxman, *Am J Med.* 2002; 113 Suppl 1A:5S-13S и Russo et al., *Microbes Infect.* 2003, 5(5):449-456). Штаммы ExPEC являются наиболее частой причиной инфекции мочевыводящих путей (UTI). Они также являются причиной инфекций в участке хирургического вмешательства и неонатального менингита (Johnson et al., 2002 и Russo et al., 2003), ассоциированных с абдоминальными и тазовыми инфекциями и внутрибольничной пневмонией, а иногда и других внекишечных инфекций, таких как остеомиелит, целлюлит и раневые инфекции. Все эти первичные очаги инфекции могут привести к бактериемии ExPEC (Russo et al., 2003). Новорожденные, пожилые люди и пациенты с ослабленным иммунитетом особенно восприимчивы к инфекции, вызываемой ExPEC, включая инвазивное заболевание, вызываемое ExPEC (IED).

[0002] Устойчивость бактерий к антибиотикам является серьезной проблемой в борьбе с бактериальной инфекцией, и штаммы E. coli с множественной устойчивостью к лекарственным средствам (MDR) становятся все более и более преобладающими (см., например, Schito et al., 2009, Int. J. Antimicrob. Agents 34(5):407-413 и Pitout et al., 2012, Expert Rev. Anti. Infect. Ther. 10(10):1165-1176). Появление и быстрое глобальное распространение последовательности ExPEC типа 131 (ST131) считается основным фактором повышенной устойчивости к лекарственным средствам, включая множественную устойчивость к лекарственным средствам (Johnson et al., Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(1):546-550; Rogers et al., J Antimicrob Chemother. 2011; 66(1):1-14). Этот клон обнаруживается у 12,5-30% всех клинических изолятов ExPEC, в основном проявляет серотип O25B:H4 и демонстрирует высокие уровни устойчивости

к фторхинолонам, что часто сопровождается устойчивостью к триметоприму/сульфаметоксазолу и приданием бета-лактамазами расширенного спектра действия устойчивости к цефалоспоринам (Rogers et al, 2011, and Banerjee et al., Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58(9):4997-5004).

[0003] Серотип О-антигена основан на химической структуре полисахаридного О-антигена, части наружной мембраны липополисахарида (LPS) грамотрицательной бактерии. Сообщалось о более чем 180 серологически уникальных О-антигенах *E. coli* (Stenutz et al., FEMS Microbial Rev. 2006; 30: 382-403), хотя подавляющее большинство изолятов ExPEC классифицируются в пределах менее чем 20 серотипов О-антигенов. Полноразмерные О-антигены *E. coli*, как правило, состоят из приблизительно 10-25 повторяющихся сахарных звеньев, присоединенных к высококонсервативной сердцевинной структуре LPS, при этом каждый компонент синтезируется отдельно ферментами, кодируемыми преимущественно в кластерах генов *rfb* и *rfa* соответственно. После полимеризации О-антигена полисахаридный остов О-антигена может быть модифицирован, как правило, посредством добавления остатков ацетила или глюкозы. Эти модификации эффективно увеличивают разнообразие серотипов за счет создания антигенно различающихся серотипов, которые имеют общий полисахаридный остов, но отличаются боковыми ответвлениями. Гены, кодирующие ферменты, модифицирующие О-антиген, как правило, находятся за пределами кластера *rfb* в хромосоме, а в некоторых случаях эти гены обнаруживаются внутри лизогенных бактериофагов.

[0004] Инфекция, вызываемая ExPEC, может быть вызвана любым серотипом. Несмотря на чрезмерное представительство некоторых серотипов при инфекции, вызываемой ExPEC, поверхностные полисахариды из изолятов ExPEC, тем не менее, демонстрируют значительное разнообразие антигенов, что делает разработку вакцины против ExPEC на основе поверхностных полисахаридов чрезвычайно сложной задачей (Russo et al., Vaccine. 2007; 25: 3859-3870). Также определенные О-антигены могут быть слабоиммуногенными. Кроме того, исходя из исследований пневмококковых конъюгированных вакцин, когда несколько серотипов могут вызывать заболевание, вакцинная композиция, как, например, выбор серотипов для включения в вакцину и уровни доз включенных серотипов, может иметь решающее значение, поскольку применение вакцины против определенных серотипов может потенциально усиливать носительство серотипов, не включенных в вакцину, или даже серотипа, который включен в вакцину, однако является лишь слабоэффективным в осуществлении

иммунизации против серотипа (Lipsitch, Emerging Infectious Diseases; 1999, 5:336-345), и заболеваемость ими. В идеале вакцина должна максимизировать свои полезные эффекты в отношении предупреждения заболевания, вызванного серотипами, включенными в вакцину, сводя при этом к минимуму риск дополнительного заболевания из-за повышенного носительства невакцинных серотипов.

[0005] Усилия по разработке вакцины для предупреждения инфекций, вызываемых ExPEC, были сосредоточены на конъюгатах полисахаридных О-антигенов. 12-валентная конъюгированная вакцина на основе О-антигенов была синтезирована путем экстракции и очистки полисахаридного О-антигена и химической конъюгации с детоксифицированным экзотоксином А *Pseudomonas aeruginosa* и протестирована в отношении безопасности и иммуногенности в клиническом исследовании фазы 1 (Cross et al., *J. Infect. Dis.* (1994), том 170, стр. 834-40). Эта кандидатная вакцина никогда не была лицензирована для клинического применения. Недавно была разработана система для биоконъюгации в *E. coli*, в которой полисахаридный антиген и белок-переносчик 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), том 103, стр. 7088-93). Эта система N-связанного гликозилирования белков способна переносить различные полисахариды на белок-переносчик, что дает возможность применять простые способы очистки конъюгата.

[0006] Биоконъюгация успешно использовалась для получения конъюгированного полисахарида для четырехвалентной кандидатной вакцины на основе О-антигенов *E. coli* (Poolman and Wacker, *J. Infect. Dis.* (2016), том 213(1), стр. 6-13). Однако разработка успешной вакцины против ExPEC требует охвата преобладающих серотипов, а наличие дополнительных модификаций О-антигена в подмножествах изолятов ExPEC представляет дополнительную проблему при охвате изолятов, содержащих немодифицированный и модифицированный LPS. Более того, иммунные ответы на вакцинные композиции, содержащие О-антигены из нескольких серотипов, могут различаться между серотипами. Соответственно, в данной области техники существует постоянная потребность в вакцинах против ExPEC. В частности, существует потребность в вакцине против ExPEC на основе поверхностных полисахаридов, которую можно применять для обеспечения эффективной иммунной защиты против серотипа ExPEC O75 и других серотипов, преобладающих среди ExPEC.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Неожиданно было обнаружено, что антиген O75 *E. coli* оказался менее иммуногенным, чем другие O-антигены *E. coli* (например, O1, O2 и O6) при тестировании в виде конъюгатов O-антигенов, каждый из которых ковалентно связан с белком-переносчиком в композиции с другими такими O-антигенами в таких же концентрациях в клиническом испытании. Вакцинация с помощью композиции, содержащей конъюгаты антигена O75 *E. coli* и конъюгаты одного или нескольких дополнительных O-антигенов *E. coli* в соответствующих дозе и соотношении, обеспечивает улучшенный иммунный ответ против серотипа O75 ExPEC и одного или нескольких дополнительных O-серотипов ExPEC.

[0008] Соответственно, в первом общем аспекте в данном документе предусмотрена композиция, содержащая полисахаридные антигены O1, O2, O4, O15, O16, O18, O25, O75 и O6 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, и где концентрация каждого из полисахаридных антигенов O75 и O25 независимо увеличена по сравнению с концентрацией каждого из полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O15, O16, O18 и O6.

[0009] В определенных вариантах осуществления весовое отношение концентраций полисахаридного антигена O75 независимо к каждому из полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O15, O16, O18 и O6 составляет от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 2,5:1.

[00010] В определенных вариантах осуществления весовое отношение концентраций полисахаридного антигена O75 независимо к каждому из полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O15, O16, O18 и O6 составляет приблизительно 2:1.

[00011] Во втором общем аспекте в данном документе предусмотрена композиция, содержащая полисахаридные антигены O1, O2, O4, O15, O16, O18, O25, O75 и O6 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, и где весовое отношение концентраций полисахаридного антигена O75 к полисахаридным антигенам O1, O2 и/или O6 составляет от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1. Предпочтительно при этом весовое отношение концентраций полисахаридного антигена O75 к O1, O2 и/или O6 составляет приблизительно 2:1.

[00012] В определенных вариантах осуществления весовое отношение концентраций полисахаридного антигена O75 к полисахаридным антигенам O4, O15, O16 и/или O18 составляет от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1. Предпочтительно весовое

отношение концентраций полисахаридного антигена O75 к полисахаридным антигенам O4, O15, O16 и/или O18 составляет приблизительно 2:1.

[00013] В третьем общем аспекте в данном документе предусмотрена композиция, содержащая полисахаридные антигены O1, O2, O4, O15, O16, O18, O25, O75 и O6 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, и где концентрация каждого из полисахаридных антигенов O75 и O25 независимо увеличена по сравнению с концентрацией каждого из полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O15, O16, O18 и O6, где весовое отношение концентраций полисахаридного антигена O75 к полисахаридному антигену O1, O2 и/или O6 составляет от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1. Предпочтительно при этом весовое отношение концентраций полисахаридного антигена O75 к полисахаридному антигену O1, O2 и/или O6 составляет приблизительно 2:1.

[00014] Ниже описаны определенные варианты осуществления первого, второго и третьего общих аспектов.

[00015] В определенных вариантах осуществления весовое отношение концентраций полисахаридного антигена O75 к полисахаридному антигену O25 в композиции составляет приблизительно 1:1.

[00016] В определенных вариантах осуществления весовое отношение концентраций полисахаридных антигенов O1:O2:O4:O6:O15:O16:O18:O25:O75 *E. coli* составляет 1:1:1:1:1:1:1:2:2.

[00017] В определенных вариантах осуществления антиген O1 представляет собой O1A, O4 является глюкозилированным, антиген O6 представляет собой O6A, антиген O18 представляет собой O18A, и антиген O25 представляет собой O25B, где:

(i) полисахаридный антиген O1 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O1A), показанной в таблице 1,

(ii) полисахаридный антиген O2 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O2), показанной в таблице 1,

(iii) полисахаридный антиген O4 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O4-Glc+), показанной в таблице 1,

(iv) полисахаридный антиген O6 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O6A), показанной в таблице 1,

(v) полисахаридный антиген O15 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O15), показанной в таблице 1,

(vi) полисахаридный антиген O16 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O16), показанной в таблице 1,

(vii) полисахаридный антиген O18 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O18A), показанной в таблице 1,

(viii) полисахаридный антиген O25 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O25B), показанной в таблице 1, и

(ix) полисахаридный антиген O75 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O75), показанной в таблице 1,

где каждое n независимо представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20.

[00018] В определенных вариантах осуществления концентрация полисахаридного антигена O75 составляет от приблизительно 8 до приблизительно 64 мкг/мл, предпочтительно от приблизительно 8 до приблизительно 50 мкг/мл, предпочтительно от приблизительно 12 до приблизительно 40 мкг/мл, предпочтительно от приблизительно 16 до приблизительно 32 мкг/мл, предпочтительно от приблизительно 28 до приблизительно 36 мкг/мл, предпочтительно приблизительно 32 мкг/мл.

[00019] В определенных вариантах осуществления полисахаридные O-антигены *E. coli*, присутствующие в композиции, состоят из O1, O2, O4, O15, O16, O18, O25, O75 и O6.

[00020] В определенных вариантах осуществления композиция дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный полисахаридный антиген *E. coli*, ковалентно связанный с белком-переносчиком, где предпочтительно по меньшей мере один дополнительный полисахаридный антиген *E. coli* включает в себя полисахаридный антиген O8 с формулой (O8), показанной в таблице 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20.

[00021] В определенных вариантах осуществления белок-переносчик представляет собой детоксифицированный экзотоксин A (EPA) *Pseudomonas aeruginosa* или CRM_{197}, предпочтительно EPA. Предпочтительно белок-переносчик содержит от 1 до 20, как, например, от 1 до 10 или от 2 до 4, консенсусных последовательностей гликозилирования, имеющих аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, таких как консенсусные последовательности, имеющие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2. Более предпочтительно белок-переносчик

содержит четыре консенсусные последовательности гликозилирования. Наиболее предпочтительно каждый белок-переносчик представляет собой EPA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3.

[00022] В определенных вариантах осуществления полисахаридные антигены *E. coli* ковалентно связаны с белком-переносчиком посредством биоконъюгации или посредством химической конъюгации, предпочтительно полисахаридные антигены *E. coli* ковалентно связаны с белком-переносчиком посредством биоконъюгации, предпочтительно полисахарид ковалентно связан с остатком Asn в участке гликозилирования в белке-переносчике.

[00023] В другом аспекте предусмотрен способ индуцирования иммунного ответа на *E. coli*, предпочтительно внекишечную патогенную *E. coli* (ExPEC), у субъекта, включающий введение субъекту композиции по настоящему изобретению.

[00024] В дополнительном аспекте предусмотрен способ индуцирования иммунного ответа на *E. coli*, предпочтительно внекишечную патогенную *E. coli* (ExPEC), у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества каждого из полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O15, O16, O18, O25, O75 и O6 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, где эффективное количество каждого из полисахаридных антигенов O75 и O25 независимо увеличено по сравнению с каждым из полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O15, O16, O18 и O6.

[00025] В определенных вариантах осуществления в соответствии со способом по настоящему изобретению эффективное количество полисахаридного антигена O75 вводят в весовом отношении, независимо составляющем от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 2,5:1, предпочтительно приблизительно 2:1, к каждому из полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O15, O16, O18 и O6.

[00026] В определенных вариантах осуществления в соответствии со способом по настоящему изобретению эффективное количество полисахаридного антигена O75 вводят в весовом отношении, независимо составляющем от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, предпочтительно приблизительно 2:1, к полисахаридным антигенам O1, O2 и/или O6, где дополнительно предпочтительно эффективное количество полисахаридного антигена O75 вводят в весовом отношении приблизительно 1:1 к полисахаридному антигену O25.

[00027] В другом аспекте предусмотрен способ индуцирования иммунного ответа на *E. coli*, предпочтительно внекишечную патогенную *E. coli* (ExPEC), у субъекта,

включающий введение субъекту эффективного количества каждого из полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O15, O16, O18, O25, O75 и O6 *E.coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, при этом эффективное количество полисахаридного антигена O75 вводят в весовом отношении, независимо составляющем от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, к полисахаридным антигенам O1, O2 и/или O6. Эффективное количество полисахаридного антигена O75 можно предпочтительно вводить в весовом отношении приблизительно 1:1 к полисахаридному антигену O25. Предпочтительно эффективное количество полисахаридного антигена O75 вводят в весовом отношении, независимо составляющем приблизительно 2:1, к полисахаридным антигенам O1, O2 и/или O6.

[00028] Ниже представлены варианты осуществления любого аспекта способа по настоящему изобретению.

[00029] В определенных вариантах осуществления в соответствии со способом по настоящему изобретению иммунный ответ ограничивает тяжесть инвазивного заболевания, вызываемого ExPEC, у субъекта или предупреждает его, где предпочтительно инвазивное заболевание, вызываемое ExPEC, включает сепсис и/или бактериемию.

[00030] В определенных вариантах осуществления в соответствии со способом по настоящему изобретению антиген O1 представляет собой O1A, O4 является глюкозилированным, антиген O6 представляет собой O6A, антиген O18 представляет собой O18A, и антиген O25 представляет собой O25B. Предпочтительно полисахаридные антигены O1A, O2, глюкозилированный O4, O6A, O15, O16, O18A, O25B и O75 характеризуются структурами формул (O1A), (O2), (O4-Glc+), (O6A), (O15), (O16), (O18A), (O25B) и (O75) соответственно, как показано в таблице 1, где каждое n независимо представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20, где весовое отношение полисахаридного антигена O75 к полисахаридному антигену O6 составляет от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, более предпочтительно приблизительно 2:1.

[00031] В определенных вариантах осуществления в соответствии со способом по настоящему изобретению полисахаридные O-антигены *E. coli*, вводимые субъекту, состоят из O1, O2, O4, O15, O16, O18, O25, O75 и O6.

[00032] В определенных вариантах осуществления в соответствии со способом по настоящему изобретению полисахаридные O-антигены *E. coli*, вводимые субъекту,

дополнительно содержат от 1 до 15 дополнительных полисахаридных О-антигенов *E. coli*, при этом каждый из них независимо ковалентно связан с белком-переносчиком.

[00033] В определенных вариантах осуществления в соответствии со способом по настоящему изобретению субъект является человеком, у которого имеется инфекция, вызываемая *E. coli* (предпочтительно ExPEC), предпочтительно инвазивное заболевание, вызываемое ExPEC, или который подвержен риску их наличия.

[00034] В определенных вариантах осуществления в соответствии со способом по настоящему изобретению за одно введение вводят 8-16 мкг, предпочтительно приблизительно 16 мкг, полисахаридного антигена O75.

[00035] В определенных вариантах осуществления в соответствии со способом по настоящему изобретению эффективное количество вводимых полисахаридных антигенов O1:O2:O4:O6:O15:O16:O18:O25:O75 *E. coli* вводят в весовом отношении 1:1:1:1:1:1:1:2:2.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0036] Вышеизложенное краткое описание, а также нижеследующее подробное описание настоящего изобретения будут более понятны при их рассмотрении в сочетании с прилагаемыми графическими материалами. Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными вариантами осуществления, показанными на графических материалах.

[0037] На фиг. 1 показаны ответы с образованием антител, индуцированные вакциной против ExPEC10V у новозеландских белых кроликов. Животные получали 3 внутримышечные иммунизации ExPEC10V или физиологический раствор, вводимый с интервалом в 2 недели. Вакцину против ExPEC10V вводили при 3 различных концентрациях (группа 1: высокая доза, группа 2: средняя доза и группа 3: низкая доза, таблица 11), а контрольная группа получала только физиологический раствор (группа 4, 0,9% (вес/об.) хлорида натрия) Уровни антител измеряли посредством ELISA в день 0 (до вакцинации) и дни 14, 27 и 42 (после вакцинации). Показаны индивидуальные титры (титр EC50) и средние геометрические титры (GMT) ± 95% CI. Критерий суммы рангов Уилкоксона с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. Сравнения животных, вакцинированных с помощью ExPEC10V (группы 1, 2 и 3), и контрольных животных, получавших физиологический раствор (группа 4). *$p \leq 0,05$, **$p \leq 0,01$; ***$p \leq 0,001$; ****$p \leq 0,0001$. LOD: предел выявления.

[0038] На фиг. 2 показаны ответы с образованием антител, индуцированные ExPEC10V. Новозеландские белые кролики получали 3 внутримышечные иммунизации ExPEC10V (всего 105,6 мкг полисахарида) или 0,9% вес./об. раствор хлорида натрия (контроль). Титры IgG определяли посредством ELISA в день 1 (до иммунизации, n = 20/группа), день 31 (после иммунизации, n = 20/группа) и день 50 (после иммунизации, n = 10/группа). Графики показывают индивидуальные титры и среднее геометрическое ± 95% доверительный интервал для каждой группы. Различия в титрах IgG между ExPEC10V и контрольной группой анализировали с использованием тобит-модели с критерием отношения правдоподобия. Значения $P \leq 0,05$ считались свидетельствующими о значимости. *$P \leq 0,05$, ****$P \leq 0,0001$.

[0039] На фиг. 3A – фиг. 3B показан общий план исследования фазы 1/2a клинического испытания вакцины против ExPEC10V у людей. На фиг. 3A показан общий план исследования для когорты 1, а на фиг. 3B показан общий план исследования для когорты 2. Подробности см. в примере 7.

[0040] На фиг. 4 показан процент участников с по меньшей мере 2-кратным увеличением титров специфичных к O-антигену антител в сыворотке крови в день 15 после вакцинации, как измерено по сравнению с исходным уровнем (день 1) в клиническом испытании BAC1001 (подробности см. в примере 7). Титры специфичных к O-антигену антител в сыворотке крови измеряли посредством иммуноанализа на основе ECL.

[0041] На фиг. 5 показан процент участников с по меньшей мере 2-кратным увеличением титров опсонофагоцитарных антител в сыворотке крови в день 15 после вакцинации, как измерено по сравнению с исходным уровнем (день 1) в клиническом испытании BAC1001 (подробности см. в примере 7). Уровни опсонофагоцитарных антител в сыворотке крови измеряли посредством MOPA.

[0042] На фиг. 6 показаны уровни антител в сыворотке крови (общий IgG), индуцированные различными композициями вакцины против ExPEC у новозеландских белых кроликов. Подробности см. в примере 8. На графиках показаны индивидуальные титры (титр EC50) и средние геометрические титры (GMT) ± 95% доверительные интервалы. Сравнение между вакцинированными группами и контролем с физиологическим раствором оценивали статистически с использованием тобит-модели с критерием отношения правдоподобия, и при этом использовали поправку Бонферрони для множественных сравнений. Значения $p \leq 0,05$ считались свидетельствующими о статистической значимости. ****$p \leq 0,0001$.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0043] Различные публикации, статьи и патенты цитируются или описываются в разделе "Предпосылки изобретения" и на протяжении всего описания; при этом каждый из этих литературных источников включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий и т. п., которое было включено в настоящее описание, предназначено для обеспечения контекста настоящего изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что любые или все из этих материалов являются частью предшествующего уровня техники относительно любых раскрытых или заявленных изобретений.

[0044] Если не определено иное, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое общеизвестно специалисту средней квалификации в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В иных случаях определенные термины, цитируемые в данном документе, имеют значения, изложенные в настоящем описании. Следует отметить, что используемые в данном документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылку на множественное число, если из контекста явно не следует иное.

[0045] Если не указано иное, то термин "по меньшей мере", предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в ряду.

[0046] Термин "приблизительно" при использовании в сочетании с числом относится к любому числу в пределах ± 10%, например, ± 5% или ± 1% от указанного числа.

[0047] Специалистам в данной области будут известны или же они смогут установить с помощью постановки стандартного эксперимента многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления описанного в данном документе настоящего изобретения. Такие эквиваленты подразумеваются как охватываемые настоящим изобретением.

[0048] На всем протяжении данного описания и в нижеследующей формуле изобретения, если контекст не требует иного, слово "содержать" и его варианты, такие как "содержит" и "содержащий", будут пониматься как подразумевающие включение указанного целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий, но без исключения любого другого целого числа или стадии или группы целых чисел или

стадий. При использовании в данном документе термин "содержащий" может быть заменен термином "содержащий в себе" или "включающий", или иногда при использовании в данном документе заменен термином "имеющий".

[0049] При использовании в данном документе "состоящий из" исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанные в элементе пункта формулы изобретения. При использовании в данном документе "состоящий по сути из" не исключает материалы или стадии, которые не влияют существенным образом на основные и новые характеристики пункта формулы изобретения. Любой из вышеупомянутых терминов "содержащий", "содержащий в себе", "включающий" и "имеющий", всякий раз, когда они используются в данном документе в контексте аспекта или варианта осуществления настоящего изобретения, может быть заменен термином "состоящий из" или "состоящий по сути из" для изменения объемов настоящего изобретения.

[0050] Используемый в данном документе соединяющий термин "и/или" между несколькими перечисленными элементами понимают как охватывающий как индивидуальные, так и объединенные варианты. Например, если два элемента соединены с помощью "и/или", первый вариант относится к возможности применения первого элемента без второго. Второй вариант относится к возможности применения второго элемента без первого. Третий вариант относится к возможности применения первого и второго элементов совместно. Любой из этих вариантов понимают как подпадающий под данное значение и, следовательно, удовлетворяющий требованию используемого в данном документе термина "и/или". Понятно, что возможность одновременного применения более чем одного из вариантов понимают как подпадающую под данное значение и, следовательно, удовлетворяющую требованию термина "и/или".

[0051] Используемые в данном документе термины "О-полисахарид", "О-антиген", "О-антигенный", "полисахаридный О-антиген", "О-полисахаридный антиген" и сокращение "OPS" относятся к О-антигену грамотрицательных бактерий, который является компонентом липополисахарида (LPS) и является специфичным для каждого серотипа или серо(под)типа грамотрицательных бактерий. О-антиген обычно содержит повторяющиеся звенья (RU) из двух-семи остатков сахара. В данном контексте RU приравнивается к биологическому повторяющемуся звену (BRU). BRU описывает RU О-антигена в том виде, в котором оно синтезируется *in vivo*. Различные серотипы *E. coli* экспрессируют различные О-антигены. В *E. coli* продукты генов, участвующих в

биогенезе О-антигена, кодируются кластером генов *rfb*. Всякий раз, когда в данном документе упоминается полисахаридный О-антиген, подразумевается полисахаридный О-антиген соответствующего серотипа *E. coli* и любые существующие его подсеротипы, если не указано иное, например, когда речь идет о полисахаридном антигене O1, он может представлять собой полисахаридный О-антиген *E. coli* подсеротипов O1A, O1A1, O1B или O1C, тогда как полисахаридный антиген O25 может представлять собой полисахаридный антиген O25A или O25B и т. д. Многие серотипы и подсеротипы *E. coli*, а также соответствующая структура RU (структура фрагмента или О-звено) их полисахаридных О-антигенов представлены в таблице 1 из WO 2020/039359, включенной в данный документ посредством ссылки.

[0052] Как используется в данном документе, термины "кластер *rfb*" и "кластер генов *rfb*" относятся к кластеру генов, который кодирует ферментативный аппарат, способный синтезировать структуру остова О-антигена. Термин "кластер *rfb*" может использоваться в отношении любого кластера биосинтеза О-антигена и предпочтительно относится к кластеру генов из рода *Escherichia*, в частности *E. coli*.

[0053] Как используется в данном документе, термин "O1A" относится к антигену O1A *E. coli* (подсеротипу серотипа O1 *E. coli*). Термин "O2" относится к антигену O2 *E. coli* (серотипу O2 *E. coli*). Термин "O4" относится к антигену O4 *E. coli* (серотипу O4 *E. coli*). Термин "O6A" относится к антигену O6A *E. coli* (подсеротипу серотипа O6 *E. coli*). Термин "O8" относится к антигену O8 *E. coli* (серотипу O8 *E. coli*). Термин "O15" относится к антигену O15 *E. coli* (серотипу O15 *E. coli*). Термин "O16" относится к антигену O16 *E. coli* (серотипу O16 *E. coli*). Термин "O18A" относится к антигену O18A *E. coli* (подсеротипу серотипа O18 *E. coli*). Термин "O25B" относится к антигену O25B из *E. coli* (подсеротипу серотипа O25 *E. coli*). Термин "O75" относится к антигену O75 *E. coli* (серотипу O75 *E. coli*). Как используется в данном документе, термины "глюкозилированный O4", "O4 с глюкозными ответвлениями", "Glc+ O4" и "O4 Glc+" О-антиген относятся к О-антигену O4 *E. coli* (серотипу O4 *E. coli*) с боковыми глюкозными ответвлениями, тогда как термины "неглюкозилированный O4", "Glc- O4" и "O4 Glc-" относятся к антигену O4 без бокового глюкозного ответвления.

[0054] Структуры нескольких полисахаридных О-антигенов *E. coli*, упоминаемых в настоящей заявке, показаны ниже в таблице 1. Показано одно повторяющееся звено для каждого полисахаридного О-антигена *E. coli*.

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

Полисахаридный О-антиген *E. coli*	**Структура повторяющегося звена**[1]
Полисахаридный антиген О1А (О1А)	[→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
Полисахаридный антиген О2 (О2)	[→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→]$_n$ 2 ↑ 1 α-D-Fuc*p*3NAc
Неглюкозилированный Полисахаридный антиген О4 (О4-Glc-)	[→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→]$_n$
Глюкозилированный полисахаридный антиген О4 (О4-Glc+)	α-D-Glc*p* 1 ↓ 3 [→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 О6А (О6А)	[→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→]$_n$ 2 ↑ 1 β-D-Glc*p*
Полисахаридный антиген О8 (О8)	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 О15 (О15)	[→2)-β-D-Gal*p*-(1→3)-α-L-Fuc*p*NAc-(1→3)-β-D-Glc*p*NAc-(1→]$_n$
Полисахаридный антиген О16 (О16)	[→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
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→]$_n$ 3 ↑ 1 β-D-Glc*p*NAc
Полисахаридный антиген O25B (O25B)	β-D-Glc*p* 1 ↓ 6 [→4)-α-D-Glc*p*-(1→3)-α-L-Rha*p*-(1→3)-β-D-Glc*p*NAc-(1→]$_n$ 3 2 ↑ ↑ 1 Ac α-L-Rha*p*
Полисахаридный антиген O75 (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→]$_n$

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

[0055] Все описанные в данном документе моносахариды имеют общепринятое значение, известное из уровня техники. Моносахариды могут иметь D- или L-конфигурацию. Если D или L не указаны, то считается, что сахар имеет D-конфигурацию. Как правило, моносахариды обозначают общеизвестными и используемыми в данной области техники сокращениями. Например, Glc относится к глюкозе; D-Glc относится к D-глюкозе; и L-Glc относится к L-глюкозе. Другие распространенные сокращения для моносахаридов включают: Rha — рамноза; GlcNAc — N-ацетилглюкозамин; GalNAc — N-ацетилгалактозамин; Fuc — фукоза; Man — манноза; Man3Me — 3-O-метилманноза; Gal — галактоза; FucNAc — N-ацетилфукозамин и Rib — рибоза. Суффикс "f" относится к фуранозе, а суффикс "p" относится к пиранозе.

[0056] Термины "RU", "повторяющееся звено" и "повторное звено", используемые в отношении O-антигена, относятся к биологическому повторяющемуся звену (BRU) O-антигена, поскольку оно синтезируется *in vivo* с помощью клеточного аппарата (например, гликозилтрансфераз). Число RU O-антигена может варьироваться в зависимости от серотипа и в вариантах осуществления настоящего изобретения, как

правило, варьируется от приблизительно 1 до 100 RU, предпочтительно от приблизительно 1 до 50 RU, как, 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, как, например, 3-50 RU, предпочтительно 5-40 RU, предпочтительно 5-30 RU, например, 7-25 RU, например, 10-20 RU. Однако в некоторых случаях число RU О-антигена может составлять 1-2. Показана структура каждого О-антигена, конкретно описанного в данном документе, содержащего одно RU с переменной "n", обозначающей число RU. В каждом полисахаридном О-антигене в биоконъюгате по настоящему изобретению n независимо представляет собой целое число, равное 1-100, как, например, 1-50, 1-40, 1-30, 1-20, 1-10, предпочтительно по меньшей мере 3, более предпочтительно по меньшей мере 5, как, 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), более предпочтительно 5-30, но в некоторых случаях может равняться 1-2. В некоторых вариантах осуществления n независимо представляет собой целое число, равное приблизительно 7-25, например, приблизительно 10-20. Значения могут варьироваться между отдельными полисахаридными О-антигенами в композиции и представлены в данном документе как средние значения, т. е. если биоконъюгат описан в данном документе как имеющий n, которое независимо представляет собой целое число, равное 5-40, то композиция содержит большую часть полисахаридных О-антигенов с 5-40 повторяющимися звеньями, но может также содержать некоторые полисахаридные О-антигены, которые имеют менее чем 5 повторяющихся звеньев или более чем 40 повторяющихся звеньев.

[0057] Как используется в данном документе, термины "конъюгат" и "гликоконъюгат" относятся к конъюгату сахарного или сахаридного антигена (например, олиго- и полисахарида) и белка, связанного с другими химическими соединениями, в том числе без ограничения белки, пептиды, липиды и т. д. Гликоконъюгаты могут быть получены химическим путем, например, посредством химического (синтетического) связывания белка и сахарного или сахаридного антигена. Термин "гликоконъюгат" также включает биоконъюгаты.

[0058] Как используется в данном документе, термин "эффективное количество" в контексте введения О-антигена субъекту в способах в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения относится к количеству О-антигена, достаточному для индукции у субъекта требуемого иммунного эффекта или

иммунного ответа. В определенных вариантах осуществления "эффективное количество" относится к количеству О-антигена, достаточному для выработки иммунитета у субъекта с достижением у субъекта одного или нескольких из следующих эффектов: (i) предупреждения развития или начала проявления инфекции, вызываемой ExPEC, предпочтительно инвазивного заболевания, вызываемого ExPEC, или ассоциированных с ним симптомов; (ii) предупреждения рецидива инфекции, вызываемой ExPEC, предпочтительно инвазивного заболевания, вызываемого ExPEC, или ассоциированных с ним симптомов; (iii) предупреждения, уменьшения или облегчения тяжести инфекции, вызываемой ExPEC, предпочтительно инвазивного заболевания, вызываемого ExPEC, или ассоциированных с ним симптомов; (iv) уменьшения продолжительности инфекции, вызываемой ExPEC, предпочтительно инвазивного заболевания, вызываемого ExPEC, или ассоциированных с ним симптомов; (v) предупреждения прогрессирования инфекции, вызываемой ExPEC, предпочтительно инвазивного заболевания, вызываемого ExPEC, или ассоциированных с ним симптомов; (vi) обеспечения ремиссии инфекции, вызываемой ExPEC, или связанных с ней симптомов; (vii) предупреждения или уменьшения органной недостаточности, ассоциированной с инфекцией, вызываемой ExPEC; (viii) уменьшения вероятности или частоты госпитализации субъекта, у которого имеется инфекция, вызываемая ExPEC; (ix) уменьшения продолжительности госпитализации субъекта, у которого имеется инфекция, вызываемая ExPEC; (x) повышения выживаемости субъекта с инфекцией, вызываемой ExPEC, предпочтительно с инвазивным заболеванием, вызываемым ExPEC; (xi) устранения инфекции, вызываемой ExPEC, предпочтительно инвазивного заболевания, вызываемого ExPEC; (xii) ингибирования или снижения репликации ExPEC и/или (xiii) усиления или улучшения профилактического(профилактических) или терапевтического(терапевтических) эффекта(эффектов) от другой терапии.

[0059] "Эффективное количество" может варьироваться в зависимости от ряда факторов, таких как физическое состояние субъекта, возраст, вес, состояние здоровья и т. д.; пути введения, такого как пероральный или парентеральный; вводимой композиции, как, например, целевого О-антигена, других совместно вводимых О-антигенов, адъюванта и т. д.; а также конкретного заболевания, к которому требуется иммунитет. В случае, если О-антиген ковалентно связан с белком-переносчиком, эффективное количество О-антигена рассчитывается только в пересчете на фрагмент в виде полисахаридного О-антигена в конъюгате. Все концентрации, количества и

соотношения конъюгатов, включая биоконъюгаты, как описано в данном документе, также рассчитываются в пересчете только на вес фрагментов в виде полисахаридных О-антигенов в конъюгатах, независимо от концентрации, количества или соотношения любых конъюгированных белков-носителей, если не указано иное. Например, введение 16 мкг конкретного биоконъюгата означает, что введенный биоконъюгат содержит 16 мкг конкретного полисахаридного О-антигена, и при этом количество конъюгированного белка-переносчика не включено в это число. В другом примере, если композиция содержит конъюгаты полисахаридных О-антигенов из серотипов А и В в отношении 2:1, то это означает, что концентрация или количество конъюгированного полисахаридного О-антигена А в два раза больше, чем у конъюгированного полисахаридного О-антигена В в пересчете на вес конъюгированных полисахаридных О-антигенов без учета веса конъюгированных белков-переносчиков в композиции.

[0060] Термин "инвазивное заболевание, вызываемое внекишечной патогенной *Escherichia coli* (ExPEC) (IED)", используемый в данном документе, означает острую болезнь, указывающую на системную бактериальную инфекцию, которая микробиологически подтверждается путем выделения и идентификацией *E. coli* из крови или других в норме стерильных сред организма или путем выделения и идентификации *E. coli* из мочи у пациента с наличием признаков и симптомов инвазивного заболевания (синдрома системного воспалительного ответа (SIRS), сепсиса или септического шока) и отсутствием другого идентифицируемого источника инфекции. В определенных вариантах осуществления IED представляет собой острую болезнь, связанную с системной бактериальной инфекцией, которая микробиологически подтверждается либо с помощью (i) выделения и идентификации *E. coli* из крови или других в норме стерильных сред организма, либо с помощью (ii) выделения и идентификации *E. coli* из мочи пациента с угрожающей жизни функциональной недостаточностью органа вследствие нарушенной регуляции ответа организма-хозяина на инфекцию, происходящую из мочевыводящих путей и/или мужских половых органов, и отсутствием другого идентифицируемого источника инфекции.

[0061] IED может включать, но не обязательно ограничиваться ими, инфекцию мочевыводящих путей (UTI), инфекцию в участке хирургического вмешательства, абдоминальную или тазовую инфекцию, пневмонию, остеомиелит, целлюлит, сепсис, бактериемию, раневую инфекцию, пиелонефрит, инфекцию, связанную с биопсией

предстательной железы (например, инфекцию, связанную с трансректальной пункционной биопсией предстательной железы под ультразвуковым контролем [TRUS-PNB]), уросепсис, менингит, перитонит, холангит, инфекции мягких тканей, пиомиозит, септический артрит, эндофтальмит, гнойный тиреоидит, синусит, эндокардит, нейтропеническую лихорадку и простатит (в том числе без ограничения острый бактериальный простатит [ABP]).

[0062] В определенных предпочтительных вариантах осуществления IED предусматривает сепсис. В определенных предпочтительных вариантах осуществления IED предусматривает бактериемию. Настоящее изобретение в определенных вариантах осуществления предусматривает композицию в соответствии с настоящим изобретением для предупреждения сепсиса, вызываемого *E. coli*. Настоящее изобретение в определенных вариантах осуществления предусматривает композицию в соответствии с настоящим изобретением для предупреждения бактериемии, вызываемой *E. coli*.

[0063] Термин "явление, связанное с IED, отвечающее критериям сепсиса" указывает на случай IED, включающий свидетельство угрожающей жизни функциональной недостаточности органа вследствие нарушенной регуляции ответа организма-хозяина на инфекцию. Случай IED соответствует критериям сепсиса, если имеется резкое изменение общего показателя по шкале оценки динамической оценки органной недостаточности (SOFA) на 2 балла или больше по сравнению с исходным уровнем и оно считается вторичным по отношению к IED. Настоящее изобретение в определенных вариантах осуществления предусматривает композицию в соответствии с настоящим изобретением для предупреждения IED, отвечающего критериям сепсиса. Термин "уросепсис", используемый в данном документе, означает сепсис, вызванный инфекцией, происходящей из мочеполового тракта и/или мужских половых органов.

[0064] Термин "бактериемическое IED" относится к случаю IED, который включает выделение и идентификацию *E. coli* из крови. Настоящее изобретение в определенных вариантах осуществления предусматривает композицию в соответствии с настоящим изобретением для предупреждения бактериемии, вызываемой IED.

[0065] Как используется в данном документе, термины "иммунологический ответ" или "иммунный ответ" на антиген или композицию относятся к развитию у субъекта гуморального и/или клеточного иммунного ответа на антиген или антиген, присутствующий в композиции.

[0066] Как используется в данном документе, термин "композиция", содержащая более чем один полисахаридный антиген *E. coli*, может означать единую фармацевтическую композицию, которая содержит более чем один полисахаридный антиген *E. coli* в одной и той же фармацевтической композиции или комбинацию из более чем одной фармацевтической композиции, которая содержит более чем один полисахаридный антиген *E. coli* в отдельных фармацевтических композициях. В предпочтительных вариантах осуществления композиция представляет собой единую фармацевтическую композицию. В способе индуцирования иммунного ответа на *E. coli* "композиция", содержащая более чем один полисахаридный антиген *E. coli*, может вводиться субъекту, нуждающемуся в этом, вместе в единой фармацевтической композиции, которая содержит более чем один полисахаридный антиген *E. coli*, или может вводиться субъекту в комбинации в виде отдельных фармацевтических композиций. В предпочтительных вариантах осуществления субъекту вводят единую фармацевтическую композицию.

[0067] Как используется в данном документе, термины "в комбинации" или "комбинация из" в контексте введения субъекту двух или более О-антигенов или композиций не ограничивают порядок, в котором субъекту вводятся О-антигены или композиции. Например, первая композиция может вводиться до введения (например, за 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель), одновременно с введением или после введения (например, через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) субъекту второй композиции. Предпочтительно два или более О-антигена вводят субъекту по сути одновременно, например, в пределах пяти минут друг от друга, и более предпочтительно два или более О-антигена вводят одновременно посредством введения по меньшей мере двух композиций в одно и то же время, наиболее предпочтительно посредством введения одной композиции, которая содержит два или более О-антигена.

[0068] В данном контексте "субъект" означает любой животный организм, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека, которого будут вакцинировать или который был вакцинирован посредством способа или композиции в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

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, обезьян, людей и т. п., наиболее предпочтительно человека. Термины "субъект" и "пациент" могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо.

[0069] Термин "процентная (%) идентичность последовательностей" или "% идентичности" описывает число совпадений ("хитов") идентичных аминокислот в двух или более выровненных аминокислотных последовательностях по сравнению с числом аминокислотных остатков, составляющих общую длину аминокислотных последовательностей. Другими словами, при использовании выравнивания в двух или более последовательностях можно определить процентную долю аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми (например, 90%, 95%, 97% или 98% идентичность), когда последовательности сравнивают и выравнивают для достижения максимального соответствия согласно измерению с применением алгоритма сравнения последовательностей, известного из уровня техники, или когда их выравнивают вручную и осматривают визуально. Таким образом, последовательности, сравниваемые для определения идентичности последовательностей, могут отличаться по замене(заменам), добавлению(добавлениям) или делеции(делециям) аминокислот. Подходящие программы для выравнивания последовательностей белков известны специалисту в данной области. Процентное значение идентичности последовательностей для последовательностей белков можно определять, например, с использованием программ, таких как CLUSTALW, Clustal Omega, FASTA или BLAST, например, с применением алгоритма BLAST NCBI (Altschul SF, et al (1997), Nucleic Acids Res. 25:3389-3402).

[0070] Например, для аминокислотных последовательностей идентичность и/или сходство последовательностей можно определять путем применения стандартных методик, известных из уровня техники, в том числе без ограничения алгоритма нахождения локальной идентичности последовательностей Смита-Уотермана, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, алгоритма выравнивания для нахождения идентичности последовательностей Нидлмана-Вунша, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, метода поиска сходства Пирсона-Липмана, 1988, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, компьютеризованных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Мэдисон, Висконсин, США), программы для анализа

последовательностей BestFit, описанной Devereux et al, 1984, Nucl. Acid Res. 12:387-395, предпочтительно с использованием параметров по умолчанию, или путем осмотра. В определенных вариантах осуществления процентную идентичность рассчитывают с помощью FastDB с использованием следующих параметров: штраф за несовпадение 1; штраф за гэп 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, стр. 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

[0071] Другим примером применимого алгоритма является алгоритм BLAST, описанный в:

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 применимой программой BLAST является программа WU-BLAST-2, которая была получена из Altschul et al, 1996, Methods in Enzymology 266:460-480. В WU-BLAST-2 используется несколько параметров поиска, для большинства из которых установлены значения по умолчанию.

[0072] Дополнительным применимым алгоритмом является BLAST с гэпами, о котором сообщают Altschul et al,1993, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402.

О-антигены *E. coli*

[0073] В настоящем изобретении неожиданно было обнаружено, что антиген O75 *E. coli*, конъюгированный с белком-переносчиком, оказался менее иммуногенным, чем другие О-антигены (например, O1A, O2, O4, O6A, O15, O16 и O18A) *E. coli*, конъюгированные с белком-переносчиком при такой же концентрации полисахарида в поливалентной вакцинной композиции. Это обнаружение привело к дальнейшему исследованию доз антигена O75 *E. coli* и соотношений доз различных О-антигенов *E. coli* в поливалентной вакцине, что привело к разработке поливалентных вакцин и способов иммунизации на основе О-антигенов *E. coli* для улучшения иммунных ответов против серотипа O75 и других серотипов ExPEC.

[0074] Варианты осуществления настоящего изобретения относятся к композициям и способам, относящимся к полисахаридному антигену O75 *E. coli* и одному или нескольким дополнительным полисахаридным О-антигенам *E. coli*. Предпочтительно один или несколько дополнительных О-антигенов преобладают среди клинических изолятов *E. coli*. Примеры таких антигенов *E. coli*, которые можно применять в настоящем изобретении, включают без ограничения антигены O1, O2, O4, O6, O8, O15, O16, O18 и O25 *E. coli*. В зависимости от необходимости композиция может содержать

более чем один дополнительный О-антиген *E. coli*, например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать дополнительных О-антигенов *E. coli*, для обеспечения иммунной защиты против нескольких серотипов *E. coli* в дополнение к серотипу О75 *E. coli*. В некоторых вариантах осуществления дополнительный О-антиген *E. coli* выбран из группы, состоящей из антигенов О1, О2, О4, О6, О15, О16, О18 и О25 *E. coli*. В предпочтительных вариантах осуществления дополнительный О-антиген *E. coli* выбран из группы, состоящей из О1А, О2, глюкозилированного О4, О6А, О15, О16, О18А и О25В. Более предпочтительно композиция содержит все из О-антигена О1А, О2, глюкозилированного О4, О6А, О15, О16, О18А и О25В *E. coli*. В конкретном варианте осуществления О-антигены *E. coli* содержат структуры, показанные в таблице 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20.

[0075] В одном варианте осуществления композиция по настоящему изобретению содержит полисахаридные антигены О75 и О6 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, и где отношение концентраций полисахаридного антигена О75 к полисахаридному антигену О6 составляет от приблизительно 1,2:1 до приблизительно 8:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, более предпочтительно приблизительно 2:1, например, приблизительно 1:5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1, 2,0:1, 2,1:1, 2,2:1, 2,3:1, 2,4:1 или 2,5:1. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит один или несколько, предпочтительно все, из полисахаридных антигенов О1, О2, О4, О15, О16, О18, О25 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, при этом предпочтительно антиген О1 представляет собой О1А, О4 является глюкозилированным, антиген О6 представляет собой О6А, антиген О18 представляет собой О18А, и антиген О25 представляет собой О25В.

[0076] О-антиген *E. coli*, применимый в настоящем изобретении, может быть получен посредством известных из уровня техники способов с учетом настоящего изобретения. Например, их можно получать из клетки, предпочтительно рекомбинантной клетки, оптимизированной для биосинтеза О-антигена. См., например, соответствующее раскрытие в отношении нуклеиновых кислот, белков, клеток-хозяев, способов получения и т. д. для биосинтеза О-антигена *E. coli* в

WO 2006/119987, WO 2009/104074, международной заявке на патент № PCT/EP2015/053739, Ihssen et al., 2010, *Microbial Cell Factories* 9, 61, описание которых включено в данный документ посредством ссылки в их полном объеме.

Белки-переносчики

[0077] В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения каждый О-антиген *E. coli* ковалентно связан с белком-переносчиком, предпочтительно посредством гликозидной связи. Можно использовать любой белок-переносчик, известный специалистам в данной области, принимая во внимание настоящее изобретение. Подходящие белки-переносчики включают без ограничения детоксифицированный экзотоксин А *P. aeruginosa* (EPA), CRM_{197}, флагеллин (FliC) *E. coli*, мальтоза-связывающий белок (MBP), дифтерийный анатоксин, столбнячный анатоксин, детоксифицированный гемолизин А *S. aureus*, фактор слипания А, фактор слипания В, термолабильный энтеротоксин *E. coli*, детоксифицированные варианты термолабильного энтеротоксина *E. coli*, субъединицу В холерного токсина (CTB), холерный токсин, детоксифицированные варианты холерного токсина, белок Sat *E. coli*, домен-пассажир белка Sat *E. coli*, пневмолизин *Streptococcus pneumoniae*, гемоцианин лимфы улитки (KLH), PcrV *P. aeruginosa*, белок наружной мембраны *Neisseria meningitidis* (OMPC) и белок D из нетипируемой *Haemophilus influenzae*. Описана биоконъюгация с различными белками-переносчиками, содержащими требуемую консенсусную последовательность гликозилирования, демонстрирующая, что с применением данной 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-переносчиков, которые успешно использовались в биоконъюгации).

[0078] В определенных вариантах осуществления белок-переносчик является модифицированным, например, модифицированным таким образом, что белок становится менее токсичным и/или более восприимчивым к гликозилированию. В конкретном варианте осуществления белки-переносчики, используемые в данном документе, модифицированы таким образом, что количество участков гликозилирования в белках-переносчиках максимизируется таким образом, что дает возможность вводить более низкие концентрации белка, например, в иммуногенной композиции, в частности в форме ее биоконъюгата.

[0079] Таким образом, в определенных вариантах осуществления белки-переносчики, описанные в данном документе, модифицированы для включения

дополнительных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше участков гликозилирования по сравнению с тем, как они в норме будут ассоциированы с белком-переносчиком (например, относительно числа участков гликозилирования, ассоциированных с белком-переносчиком в его нативном/естественном состоянии, т. е. в состоянии "дикого типа"). Введение участков гликозилирования в белок-переносчик можно осуществлять посредством вставки консенсусной последовательности гликозилирования в любом месте первичной структуры белка, например, посредством добавления новых аминокислот к первичной структуре белка таким образом, чтобы участок гликозилирования добавлялся полностью или частично, или посредством мутации существующих аминокислот в белке для создания участка гликозилирования. Специалисту средней квалификации в данной области будет понятно, что аминокислотную последовательность белка можно легко модифицировать с использованием подходов, известных из уровня техники, например, рекомбинантных подходов, которые включают модификацию последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок. В конкретных вариантах осуществления консенсусные последовательности гликозилирования вводятся в определенные области белка-переносчика, например, в поверхностные структуры белка, в N- или C-концы белка и/или в петли, которые стабилизированы дисульфидными мостиками у основания белка. В некоторых вариантах осуществления консенсусная последовательность гликозилирования может быть удлинена путем добавления остатков лизина для более эффективного гликозилирования.

[0080] Типичные консенсусные последовательности гликозилирования, которые могут быть вставлены или созданы в белке-переносчике, включают Asn-X-Ser(Thr), где X может представлять собой любую аминокислоту, за исключением Pro (SEQ ID NO: 1); и предпочтительно Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой аминокислоты, за исключением Pro (SEQ ID NO: 2).

[0081] В некоторых вариантах осуществления полисахаридный O-антиген *E. coli* ковалентно связан с остатком аспарагина (Asn) в белке-переносчике (например, является N-связанным), где остаток Asn присутствует в участке гликозилирования, содержащем консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 1, более предпочтительно имеющую SEQ ID NO: 2. Как правило, белок-переносчик содержит 1-10 участков гликозилирования, предпочтительно 2-4 участка гликозилирования, наиболее предпочтительно 4 участка гликозилирования, например 1-10, предпочтительно 2-4 и более предпочтительно 4 участка гликозилирования,

каждый из которых содержит консенсусные последовательности гликозилирования, имеющие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 и более предпочтительно аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2.

[0082] В конкретных вариантах осуществления белок-переносчик представляет собой детоксифицированный экзотоксин А *P. aeruginosa*. Для EPA в литературе были описаны различные детоксифицированные варианты белка, и их можно использовать в качестве белков-носителей. Например, детоксификация может быть достигнута посредством мутации и удаления каталитически существенных остатков L552V и ΔE553 в соответствии с Lukac et al., 1988, *Infect Immun*, 56: 3095-3098, и Ho et al., 2006, *Hum Vaccin*, 2:89-98. Как используется в данном документе, "EPA" относится к детоксифицированному экзотоксину А *P. aeruginosa*. В тех вариантах осуществления, где белок-переносчик представляет собой EPA, полисахаридный антиген *E. coli* может быть ковалентно связан с остатком Asn в участке гликозилирования, содержащем консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 1, и предпочтительно ковалентно связан с остатком Asn в участке гликозилирования, содержащем консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 2. Предпочтительно белок-переносчик EPA содержит 1-10 участков гликозилирования, предпочтительно 2-4 участка гликозилирования, наиболее предпочтительно 4 участка гликозилирования, например, 1-10, предпочтительно 2-4 и более предпочтительно 4 участка гликозилирования, каждый из которых содержит консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 и более предпочтительно аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2.

[0083] В некоторых вариантах осуществления белок-переносчик EPA содержит четыре участка гликозилирования, каждый из которых содержит консенсусную последовательность гликозилирования, например, участок гликозилирования, содержащий консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 2. Как используется в данном документе, термины "белок-переносчик EPA-4" и "EPA-4" относятся к детоксифицированному экзотоксину А белка-переносчика *P. aeruginosa*, содержащему четыре участка гликозилирования, каждый из которых содержит консенсусные последовательности гликозилирования, имеющие SEQ ID NO: 2. Типичным предпочтительным примером белка-переносчика EPA-4 является белок-переносчик EPA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3.

[0084] В определенных вариантах осуществления белок-переносчик EPA может быть получен вместе с сигнальной последовательностью (такой как сигнальный пептид для DsbA *E. coli*, порин A наружной мембраны *E. coli* (OmpA), мальтоза-связывающий белок (MalE) *E. coli* и т. д.), которая направляет белок-переносчик в периплазматическое пространство клетки-хозяина, экспрессирующей белок-переносчик. Белок-переносчик EPA также может быть модифицирован с помощью "метки", т. е. последовательности аминокислот, которая дает возможность выделять и/или идентифицировать белок-переносчик.

[0085] Белок-переносчик EPA, применимый в настоящем изобретении, может быть получен посредством известных из уровня техники способов с учетом настоящего изобретения. См., например, соответствующее раскрытие, например, Ihssen et al., 2010, Microbial Cell Factories 9, 61, и в WO 2006/119987, WO 2009/104074 и WO 2015/124769, раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки в их полных объемах.

[0086] В других вариантах осуществления белок-переносчик представляет собой CRM_{197}. Белок CRM_{197} представляет собой нетоксичную форму дифтерийного токсина, однако является иммунологически неотличимым от дифтерийного токсина. CRM_{197} продуцируется *Corynebacterium diphtheriae*, инфицированной нетоксигенным фагом $\beta197^{tox-}$, созданным в результате мутагенеза токсикогенного коринефага бета с использованием нитрозогуанидина (Uchida et al. (1971) Nature New Biology 233:8-11). Белок CRM_{197} имеет такую же молекулярную массу, как и дифтерийный токсин, однако отличается от него одной заменой основания (гуанина на аденин) в структурном гене. Это единственное изменение основания вызывает замену аминокислоты (глицина на глутаминовую кислоту) в зрелом белке и устраняет токсические свойства дифтерийного токсина. Белок CRM_{197} является безопасным и эффективным Т-клеточно-зависимым переносчиком сахаридов. Аминокислотная последовательность белка CRM_{197} показана под SEQ ID NO: 20. Дополнительные подробности о CRM_{197} и его получении можно найти, например, в патенте США № 5614382. В варианте осуществления полисахаридный О-антиген по настоящему изобретению конъюгирован с белком CRM_{197} или А-цепью CRM_{197} (см. CN103495161). В варианте осуществления полисахаридный О-антиген по настоящему изобретению конъюгирован с А-цепью CRM_{197}, полученной посредством экспрессии в генетически рекомбинантной *E. coli* (см. CN103495161). В варианте осуществления каждый из полисахаридных О-антигенов по настоящему изобретению независимо конъюгирован

с CRM_{197}. В одном варианте осуществления каждый из полисахаридных О-антигенов по настоящему изобретению независимо конъюгирован с А-цепью CRM_{197}.

Конъюгаты

[0087] Термин "биоконъюгат" относится к конъюгату между белком (например, белком-переносчиком) и сахарным или сахаридным антигеном (например, олиго- и полисахаридом), полученному в окружении клетки-хозяина, предпочтительно бактериальной клетки-хозяина, например, клетки-хозяина *E. coli*, где аппарат клетки-хозяина связывает антиген с белком (например, N-связями). Предпочтительно термин "биоконъюгат" относится к конъюгату между белком (например, белком-переносчиком) и О-антигеном, предпочтительно О-антигеном *E. coli* (например, O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B, O75 и т. д.), полученному в окружении клетки-хозяина, где аппарат клетки-хозяина связывает антиген с белком (например, N-связями). Поскольку биоконъюгаты получают в клетках-хозяевах с помощью аппарата клетки-хозяина, то антиген и белок ковалентно связаны посредством гликозидной связи или связи в биоконъюгате. Биоконъюгаты могут быть получены в рекомбинантных клетках-хозяевах, сконструированных для экспрессии клеточного аппарата, необходимого для синтеза О-антигена и/или связывания О-антигена с белком-мишенью. Биоконъюгаты, как описано в данном документе, обладают более выгодными свойствами по сравнению с химически полученными гликоконъюгатами, где гликаны очищаются от бактериальных клеточных стенок, а затем подвергаются химическому сочетанию с белком-переносчиком, например, биоконъюгаты требуют меньшего количества химических веществ при изготовлении и являются более стабильными с точки зрения получаемого конечного продукта, а также содержат меньше или совсем не содержат свободного (т. е. не связанного с белком-переносчиком) гликана. Очистка О-антигена от липида А и последующая химическая конъюгация с белком-переносчиком представляет собой длительный и трудоемкий процесс. Кроме того, процессы очистки, детоксификации липида А и химической конъюгации могут приводить к потере эпитопов, гетерогенности антигена и снижению иммуногенности конъюгированного полисахарида. Синтез гликоконъюгатов путем биоконъюгации может преодолеть эти ограничения классической очистки и химической конъюгации. Таким образом, в типичных вариантах биоконъюгаты предпочтительнее, чем химически полученные гликоконъюгаты.

[0088] В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин может продуцировать О-антиген *E. coli* и белок-переносчик EPA и ковалентно связывать О-

антиген с белком-переносчиком EPA с образованием биоконъюгата, применимого в настоящем изобретении. См., например, соответствующее раскрытие, например, Ihssen et al., 2010, *Microbial Cell Factories* 9, 61, и в WO 2006/119987, WO 2009/104074 и WO 2015/124769, раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки в их полном объеме.

[0089] В конкретном варианте осуществления белок-переносчик связан N-связью с O-антигеном *E. coli*, применимым в настоящем изобретении. Например, O-антиген *E. coli* связан с остатком Asn в последовательности гликозилирования белка-переносчика, такой как Asn-X-Ser(Thr), где X может представлять собой любую аминокислоту, за исключением Pro (SEQ ID NO: 2), предпочтительно Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой природной аминокислоты, за исключением Pro (SEQ ID NO: 3).

[0090] В качестве альтернативы гликоконъюгаты могут быть получены путем химического синтеза, т. е. получены вне клеток-хозяев (in vitro). Например, O-антигены *E. coli*, описанные в данном документе, например, антиген O75, могут быть конъюгированы с белками-переносчиками с применением способов, известных специалистам в данной области, в том числе посредством использования активационных реакционноспособных групп в полисахариде/олигосахариде, а также в белке-переносчике. См., например, Pawlowski et al., 2000, Vaccine 18:1873-1885 и Robbins et al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106:7974-7978, раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки. Такие подходы предусматривают экстракцию полисахаридных/олигосахаридных антигенов из клеток-хозяев, очистку полисахаридов/олигосахаридов, химическую активацию полисахаридов/олигосахаридов и конъюгацию полисахаридов/олигосахаридов с белком-переносчиком. Способы получения гликоконъюгатов O-антигенов *E. coli*, конъюгированных с белками-переносчиками, с применением химической конъюгации с белком-переносчиком и композиции, содержащей такие гликоконъюгаты, также описаны в WO 2020/039359.

[0091] Например, конъюгаты могут быть получены с применением химического соединения CDAP. В этих вариантах осуществления полисахариды активируют с помощью тетрафторбората 1-циано-4-диметиламинопиридиния (CDAP) с образованием цианатного сложного эфира. Затем активированный полисахарид подвергают сочетанию непосредственно или посредством спейсерной (линкерной) группы с аминогруппой на белке-переносчике (например, EPA или CRM_{197}). Например,

спейсер мог представлять собой цистамин или цистеамин для получения тиолированного полисахарида, который может быть подвергнут сочетанию с переносчиком посредством тиоэфирной связи, полученной после реакции с малеимид-активированным белком-переносчиком (например, с использованием N-[γ-малеимидобутирилокси]сукцинимидного сложного эфира (GMBS)) или галогенацетилированного белка-переносчика (например, с использованием йодацетимида, N-сукцинимидилбромацетата (SBA; SIB), N-сукцинимидил(4-йодацетил)аминобензоата (SIAB), сульфосукцинимидил(4-йодацетил)аминобензоата (сульфо-SIAB), N-сукцинимидилйодацетата (SIA) или сукцинимидил-3-[бромацетамидо]пропионата (SBAP)). Предпочтительно цианатный сложный эфир (необязательно полученный с помощью химического соединения CDAP) подвергают сочетанию с гександиамином или дигидразидом адипиновой кислоты (ADH), а аминодериватизированный сахарид конъюгируют с белком-переносчиком (например, EPA или CRM_{197}) с применением химического соединения карбодиимида (например, EDAC или EDC) посредством карбоксильной группы на белке-переносчике. Такие конъюгаты описаны, например, в WO 93/15760, WO 95/08348 и WO 96/129094.

[0092] В других подходящих методиках конъюгации используются карбодиимиды, гидразиды, активные сложные эфиры, норборан, п-нитробензойная кислота, N-гидроксисукцинимид, S—NHS, EDC, TSTU. Многие описаны в WO 98/42721. Конъюгация может предусматривать карбонильный линкер, который может быть образован с помощью реакции свободной гидроксильной группы сахарида с CDI (см. Bethell et al. (1979) 1. Biol. Chern. 254:2572-2574; Hearn et al. (1981) J. Chromatogr. 218:509-518) с последующей реакцией с белком с образованием карбаматной связи. Это может включать восстановление аномерного конца до первичной гидроксильной группы, необязательное присоединение защитной группы/удаление защитной группы с первичной гидроксильной группы, реакцию первичной гидроксильной группы с CDI с образованием карбаматного промежуточного соединения CDI и связывание карбаматного промежуточного соединения CDI с аминогруппой на белке.

[0093] В других вариантах осуществления конъюгаты получают с применением восстановительного аминирования. Восстановительное аминирование включает две стадии: (1) окисление полисахарида, (2) восстановление активированного полисахарида и белка-переносчика с образованием конъюгата. Перед окислением полисахарид необязательно гидролизуют. Можно применять механический или

химический гидролиз. Химический гидролиз можно проводить с использованием уксусной кислоты.

[0094] Стадия окисления может включать в себя реакцию с периодатом. Для целей настоящего изобретения термин "периодат" включает как периодат, так и перйодную кислоту; этот термин также включает как метапериодат (IO_4^-), так и ортопериодат (IO_6^{5-}) и включает различные периодатные соли (например, периодат натрия и периодат калия). В одном варианте осуществления капсульный полисахарид окисляют в присутствии метапериодата, предпочтительно в присутствии периодата натрия ($NaIO_4$). В другом варианте осуществления капсульный полисахарид окисляют в присутствии ортопериодата, предпочтительно в присутствии перйодной кислоты.

[0095] В одном варианте осуществления окисляющее средство представляет собой стабильное соединение нитроксильного или нитроксидного радикала, такое как пиперидин-N-окси- или пирролидин-N-оксисоединения, в присутствии окислителя для избирательного окисления первичных гидроксилов (как описано в WO 2014/097099). В указанной реакции фактическим окислителем является соль N-оксоаммония в каталитическом цикле. В одном аспекте указанное стабильное соединение нитроксильного или нитроксидного радикала представляет собой пиперидин-N-окси- или пирролидин-N-оксисоединения. В одном аспекте указанное стабильное соединение нитроксильного или нитроксидного радикала несет фрагмент TEMPO (2,2,6,6-тетраметил-1-пиперидинилокси) или PROXYL (2,2,5,5-тетраметил-1-пирролидинилокси). В одном аспекте указанное стабильное соединение нитроксильного радикала представляет собой TEMPO или его производное. В одном аспекте указанный окислитель представляет собой молекулу, несущую фрагмент N-галогена. В одном аспекте указанный окислитель выбран из группы, состоящей из N-хлорсукцинимида, N-бромсукцинимида, N-йодсукцинимида, дихлоризоциануровой кислоты, 1,3,5-трихлор-1,3,5-триазинан-2,4,6-триона, дибромизоциануровой кислоты, 1,3,5-трибром-1,3,5-триазинан-2,4,6-триона, дийодизоциануровой кислоты и 1,3,5-трийод-1,3,5-триазинан-2,4,6-триона. Предпочтительно указанный окислитель представляет собой N-хлорсукцинимид.

[0096] Необязательно реакцию окисления гасят добавлением гасящего средства. Гасящее средство выбрано из вицинальных диолов, 1,2-аминоспиртов, аминокислот, глутатиона, сульфита, бисульфата, дитионита, метабисульфита, тиосульфата, фосфитов, гипофосфитов или фосфористой кислоты (как, например, глицерина,

этиленгликоля, пропан-1,2-диола, бутан-1,2-диола или бутан-2,3-диола, аскорбиновой кислоты).

[0097] После стадии окисления полисахарида говорят, что полисахарид является активированным, и в данном документе ниже он упоминается как "активированный полисахарид". Активированный полисахарид и белок-переносчик могут быть лиофилизированы (высушены сублимацией) независимо (дискретная лиофилизация) либо вместе (совместная лиофилизация). В одном варианте осуществления активированный полисахарид и белок-переносчик лиофилизируются совместно. В другом варианте осуществления активированный полисахарид и белок-переносчик лиофилизируются независимо.

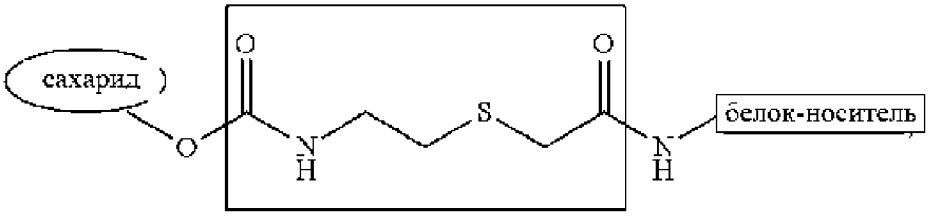
[0100] В одном варианте осуществления лиофилизация происходит в присутствии невосстанавливающего сахара, возможные невосстанавливающие сахара включают сахарозу, трегалозу, раффинозу, стахиозу, мелецитозу, декстран, маннит, лактит и палатинит.

[0101] Вторая стадия процесса конъюгации представляет собой восстановление активированного полисахарида и белка-переносчика с образованием конъюгата (так называемое восстановительное аминирование) с применением восстанавливающего средства. Подходящие восстановители включают цианоборогидриды (такие как цианоборогидрид натрия, триацетоксиборогидрид натрия или борогидрид натрия или цинка в присутствии кислот Бренстеда или Льюиса), аминобораны, такие как пиридинборан, 2-пиколинборан, 2,6-диборанметанол, диметиламинборан, t-BuMe^{i}PrN—BH_3, бензиламин-BH_3 или 5-этил-2-метилпиридинборан (PEMB), или борогидридсодержащую ионобменную смолу. В одном варианте осуществления восстанавливающее средство представляет собой цианоборогидрид натрия.

[0102] В варианте осуществления реакцию восстановления осуществляют в водном растворителе (например, выбранном из PBS, MES, HEPES, Bis-Tris, ADA, PIPES, MOPSO, BES, MOPS, DIPSO, MOBS, HEPPSO, POPSO, TEA, EPPS, бицина или HEPB, при pH от 6,0 до 8,5, от 7,0 до 8,0 или от 7,0 до 7,5), в другом варианте осуществления реакцию осуществляют в апротонном растворителе. В варианте осуществления реакцию восстановления осуществляют в растворителе DMSO (диметилсульфоксиде) или в DMF (диметилформамиде). Растворитель DMSO или DMF можно использовать для восстановления активированного полисахарида и белка-переносчика, которые были лиофилизированы.

[0103] В конце реакции восстановления в конъюгатах могут остаться не вступившие в реакцию альдегидные группы, которые можно кэппировать с помощью подходящего кэппирующего средства. В одном варианте осуществления этот кэппирующее средство представляет собой борогидрид натрия ($NaBH_4$).

[0104] В других вариантах осуществления конъюгаты получают с использованием конъюгации с eTEC, как описано в WO 2014/027302. Указанные гликоконъюгаты содержат сахарид, ковалентно конъюгированный с белком-переносчиком посредством один или нескольких спейсеров eTEC, где сахарид ковалентно конъюгирован со спейсером eTEC посредством карбаматной связи, и где белок-переносчик ковалентно конъюгирован со спейсером eTEC посредством амидной связи. Гликоконъюгаты, связанные с eTEC, по настоящему изобретению могут быть представлены общей формулой (I):



где атомы, которые содержат спейсер eTEC, содержатся в центральном прямоугольнике.

[0105] Спейсер eTEC содержит семь линейных атомов (т. е. — $C(O)NH(CH_2)_2SCH_2C(O)$—) и обеспечивает стабильные тиоэфирные и амидные связи между сахаридом и белком-переносчиком. Синтез гликоконъюгата, связанного с eTEC, включает реакцию активированной гидроксильной группы сахарида с аминогруппой тиоалкиламинового реагента, например, цистамина или цистеинамина или их соли, с образованием карбаматной связи с сахаридом с получением тиолированного сахарида. Образование одной или нескольких свободных сульфгидрильных групп осуществляется путем реакции с восстанавливающим средством с получением активированного тиолированного сахарида. Реакция свободных сульфгидрильных групп активированного тиолированного сахарида с активированным белком-переносчиком, имеющим одну или несколько α-галогенацетамидных групп на аминосодержащих остатках, приводит к образованию тиоэфирной связи с образованием конъюгата, в котором белок-переносчик присоединен к спейсеру eTEC посредством амидной связи.

[0106] Описанные в данном документе конъюгаты могут быть очищены посредством любого способа, известного из уровня техники, для очистки белка, например, посредством хроматографии (например, ионообменной, анионообменной, аффинной и колоночной хроматографии с распределением по размеру), центрифугирования, дифференциальной растворимости или посредством любой другой стандартной методики для очистки белков. См., например, Saraswat et al., 2013, *Biomed. Res. Int.* ID#312709 (стр. 1-18); см. также способы, описанные в WO 2009/104074. Фактические условия, используемые для очистки конкретного конъюгата, будут зависеть, в частности, от стратегии синтеза (например, синтетического продуцирования по сравнению с рекомбинантным продуцированием) и от таких факторов, как суммарный заряд, гидрофобность и/или гидрофильность биоконъюгата, и будут очевидными для квалифицированных специалистов в данной области.

Клетки-хозяева

[0107] В данном документе описаны клетки-хозяева, например, прокариотические клетки-хозяева, способные продуцировать О-антигены *E. coli*, и биоконъюгаты, содержащие такие О-антигены *E. coli*. Клетки-хозяева, описанные в данном документе, предпочтительно модифицированы таким образом (например, посредством генной инженерии), что они содержат одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих аппарат клетки-хозяина (например, гликозилтрансферазу), используемый для продуцирования полисахаридных О-антигенов *E. coli* и/или их биоконъюгатов.

[0108] Любые клетки-хозяева, известные специалистам в данной области, могут использоваться для получения полисахаридных О-антигенов *E. coli*, описанных в данном документе (например, полисахарида О75 *E. coli*), и биоконъюгатов, содержащих описанные в данном документе полисахаридные О-антигены *E. coli* (например, биоконъюгата полисахаридного антигена О75 *E. coli*), включая археи, прокариотические клетки-хозяева и эукариотические клетки-хозяева. В предпочтительном варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку-хозяина. Типичные прокариотические клетки-хозяева для использования в продуцировании полисахаридных О-антигенов *E. coli*, описанных в данном документе, и биоконъюгатов, содержащих описанные в данном документе полисахаридные О-антигены *E. coli*, включают без ограничения 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*.

[0109] В конкретном варианте осуществления клетка-хозяин, используемая для получения полисахаридных О-антигенов *E. coli*, описанных в данном документе, и биоконъюгатов, содержащих описанные в данном документе полисахаридные О-антигены *E. coli*, представляет собой прокариотическую клетку-хозяина и предпочтительно представляет собой *E. coli*.

[0110] В определенных вариантах осуществления клетки-хозяева, используемые для получения полисахаридных О-антигенов *E. coli* и биоконъюгатов, описанных в данном документе, сконструированы таким образом, что они содержат гетерологичные нуклеиновые кислоты, например, гетерологичные нуклеиновые кислоты, содержащие кластеры генов *rfb* требуемого серотипа О-антигена, гетерологичные нуклеиновые кислоты, которые кодируют один или несколько белков-переносчиков и/или гликозилтрансфераз. В конкретном варианте осуществления гетерологичные гены *rfb* и/или гетерологичные нуклеиновые кислоты, которые кодируют белки, участвующие в путях гликозилирования (например, прокариотических и/или эукариотических путях гликозилирования), могут быть введены в клетки-хозяева, описанные в данном документе. Такие нуклеиновые кислоты могут кодировать белки, в том числе без ограничения олигосахарилтрансферазы и/или гликозилтрансферазы.

[0111] Последовательности различных генов и кластеры генов, кодирующие гликозилтрансферазы, пригодные для получения рекомбинантных клеток-хозяев, можно, например, использовать для получения полисахаридных О-антигенов *E. coli* и их биоконъюгатов. Специалистам в данной области будет понятно, что вследствие вырожденности генетического кода белок, имеющий конкретную аминокислотную последовательность, может кодироваться несколькими различными нуклеиновыми кислотами. Таким образом, специалистам в данной области будет понятно, что нуклеиновая кислота, предусмотренная в данном документе, может быть изменена таким образом, что ее последовательность будет отличаться от последовательности, предусмотренной в данном документе, без воздействия на аминокислотную последовательность белка, кодируемого нуклеиновой кислотой.

[0112] В данном документе описаны клетки-хозяева (например, рекомбинантные клетки-хозяева) для получения биоконъюгата полисахаридного антигена O75 *E. coli*, полисахаридного антигена O1A, полисахаридного антигена O2, глюкозилированного или неглюкозилированного полисахаридного антигена O4, полисахаридного антигена

O6A, полисахаридного антигена O8, полисахаридного антигена O15, полисахаридного антигена O16, полисахаридного антигена O18A или полисахаридного антигена O25B. Клетки-хозяева, описанные в данном документе, содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие ферменты (например, гликозилтрансферазы), способные продуцировать полисахаридный O-антиген *E. coli*. Клетки-хозяева, описанные в данном документе, могут естественным образом экспрессировать нуклеиновые кислоты, способные продуцировать O-антиген, представляющий интерес, или клетки-хозяева могут быть получены таким образом, что они экспрессируют такие нуклеиновые кислоты. В определенных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты являются гетерологичными по отношению к клеткам-хозяевам и вводятся в клетки-хозяева с применением генетических подходов, известных из уровня техники. Например, нуклеиновые кислоты могут быть введены в клетку-хозяина с помощью генетической манипуляции (например, кластер генов экспрессируется на плазмиде или плазмидах или интегрируется в геном клетки-хозяина (см., например, WO 2014/037585, WO 2014/057109, WO 2015/052344).

[0113] Также в данном документе описаны клетки-хозяева (например, рекомбинантные клетки-хозяева), способные продуцировать биоконъюгат полисахаридного антигена O1A, O2, глюкозилированного или неглюкозилированного O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B или O75 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком. Такие клетки-хозяева (например, рекомбинантные клетки-хозяева) содержат нуклеотидную последовательность кластера генов *rfb*, специфичного для полисахаридного O-антигена. Кластеры генов *rfb* могут быть выделены из штаммов *E. coli* дикого типа и объединены с нуклеиновыми кислотами, кодирующими олигосахарилтрансферазу (например, PglB) и белок-переносчик (например, EPA) в одной клетке-хозяине с получением рекомбинантной клетки-хозяина, которая продуцирует представляющий интерес O-антиген *E. coli* или его биоконъюгат. Например, такие клетки-хозяева можно конструировать с применением рекомбинантных подходов таким образом, чтобы они содержали одну или несколько плазмид, содержащих кластер генов *rfb*, олигосахарилтрансферазу (например, PglB) и белок-переносчик (например, EPA), с применением технологии биоконъюгации, такой как описанная в WO 2015/124769, WO 2014/037585, WO 2009/104074 и WO 2009/089396. Предпочтительно клетки-хозяева содержат кластеры генов *rfb*, интегрированные в их геном. Нуклеиновые кислоты, кодирующие олигосахарилтрансферазу, белок-переносчик и в соответствующих случаях ген *gtrS*, в

определенных вариантах осуществления также интегрированы в геном клетки-хозяина. Гетерологичные или гомологичные гены *gtrA* и *gtrB* в определенных вариантах осуществления также интегрированы в геном клетки-хозяина.

[0114] Получение биоконъюгатов для антигенов O1A, O2, O6A и O25B подробно описано в WO 2015/124769 и WO 2017/035181. Типичные кластеры генов для каждого O-антигена *E. coli* (локусы *rfb*) были описаны в Iguchi A, et al, DNA Research, 2014, 1-7 и в DebRoy C, et al, PLoS One. 2016, 11(1):e0147434; исправленный вариант в: PLoS One. 2016, 11(4):e0154551). Последовательности нуклеиновых кислот для кластеров *rfb* и аминокислотные последовательности кодируемых ими белков также можно найти в общедоступных базах данных, таких как GenBank. Типичные последовательности для кластеров *rfb*, которые можно использовать в штаммах-продуцентах для биоконъюгатов с полисахаридными антигенами серотипов, раскрытых в данном документе, также представлены под SEQ ID NO: 9 и 11-19. Таким образом, для каждого из упомянутых выше требуемых биоконъюгатов соответствующий кластер *rfb* может быть введен в клетку-хозяина с получением клеток-хозяев со специфическим кластером *rfb* для требуемого O-антигена, которые также содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую олигосахарилтрансферазу и белок-переносчик. По указанным выше причинам клетки-хозяева предпочтительно представляют собой рекомбинантные клетки-хозяева и предпочтительно происходят из штаммов с относительно хорошо известными характеристиками, таких как лабораторные штаммы или штаммы-продуценты *E. coli*, например, *E. coli* K12 или *E. coli* BL21 и т. д. Предпочтительно кластеры *rfb* являются гетерологичными в отношении клетки-хозяина, например, введены в клетку-предшественника клетки-хозяина и предпочтительно интегрированы в ее геном. Предпочтительно исходный кластер генов *rfb*, если таковой присутствовал в клетке-предшественнике, был заменен кластером генов *rfb* для представляющего интерес O-антигена в клетке-хозяине с обеспечением продуцирования биоконъюгата интересующего O-антигена. Предпочтительно олигосахарилтрансфераза является гетерологичной в отношении клетки-хозяина, и в определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая такую олигосахарилтрансферазу, интегрирована в геном клетки-хозяина.

[0115] Любая из описанных в данном документе клеток-хозяев (например, рекомбинантных клеток-хозяев, предпочтительно рекомбинантных прокариотических клеток-хозяев) содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие дополнительные ферменты, активные в *N*-гликозилировании белков, например, описанная в данном

документе клетка-хозяин может дополнительно содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую олигосахарилтрансферазу, или нуклеиновые кислоты, кодирующие другие гликозилтрансферазы.

[0116] Описанные в данном документе клетки-хозяева, как правило, содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую олигосахарилтрансферазу. Такие олигосахарилтрансферазы переносят связанные с липидами олигосахариды к остаткам аспарагина образующихся полипептидных цепей, которые содержат консенсусный мотив *N*-гликозилирования. Нуклеиновая кислота, которая кодирует олигосахарилтрансферазу, может быть нативной в отношении клетки-хозяина или может быть введена в клетку-хозяин с применением генетических подходов. В предпочтительных вариантах осуществления олигосахарилтрансфераза является гетерологичной в отношении клетки-хозяина. В природе *E. coli* не содержит олигосахарилтрансферазу, а следовательно, если *E. coli* используется в качестве клетки-хозяина для продуцирования биоконъюгатов, то гетерологичная олигосахарилтрансфераза содержится в такой клетке-хозяине, например, при введении посредством генной инженерии. Олигосахарилтрансфераза может быть получена из любого источника, известного из уровня техники с учетом настоящего изобретения.

[0117] В определенных вариантах осуществления может использоваться альтернатива олигосахарилтрансферазе с *N*-гликозилтрансферазной активностью, такая как *O*-гликозилтрансфераза, например, в качестве неограничивающего примера, PglL в сочетании со своей собственной другой консенсусной последовательностью гликозилирования в белке-переносчике, как, например, описано в WO 2016/82597 и WO 2020/120569. Другие гликозилтрансферазы, такие как *O*-гликозилтрансферазы, также могут таким образом использоваться в качестве олигосахарилтрансферазы в соответствии с настоящим изобретением.

[0118] В определенных предпочтительных вариантах осуществления олигосахарилтрансфераза представляет собой олигосахарилтрансферазу из *Campylobacter*. Например, в одном варианте осуществления олигосахарилтрансфераза представляет собой олигосахарилтрансферазу из *Campylobacter jejuni* (т. е. *pglB*; см., например, Wacker et al., 2002, *Science* 298:1790-1793; см. также, например, ID гена в NCBI: 3231775, номер доступа в UniProt O86154). В другом варианте осуществления олигосахарилтрансфераза представляет собой олигосахарилтрансферазу из *Campylobacter lari* (см., например, ID гена в NCBI: 7410986).

[0119] В конкретных вариантах осуществления олигосахарилтрансфераза представляет собой олигосахарилтрансферазу PglB из *Campylobacter jejuni*, включая природный белок (дикого типа) или любой его вариант, такой как белки, описанные в WO 2016/107818 и WO 2016/107819. PglB может переносить связанные с липидами олигосахариды на остатки аспарагина в консенсусных последовательностях под SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. В конкретных вариантах осуществления олигосахарилтрансфераза PglB содержит SEQ ID NO: 6 или ее вариант. В определенных вариантах осуществления одна или несколько эндогенных консенсусных последовательностей гликозилирования в PglB дикого типа были подвергнуты мутации, чтобы избежать аутогликозилирования PglB, например, SEQ ID NO: 6, содержащая мутацию N534Q. Примеры вариантов олигосахарилтрансфераз PglB, подходящих для использования в рекомбинантных клетках-хозяевах, предусмотренных в данном документе, включают олигосахарилтрансферазу PglB под 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 варианте осуществления олигосахарилтрансфераза PglB имеет SEQ ID NO: 6, содержащую мутацию N311V. В другом конкретном варианте осуществления олигосахарилтрансфераза PglB имеет SEQ ID NO: 6, содержащую мутации Y77H и N311V. В другом конкретном варианте осуществления олигосахарилтрансфераза PglB имеет SEQ ID NO: 6, содержащую мутации N311V, K482R, D483H и A669V. В другом конкретном варианте осуществления олигосахарилтрансфераза PglB имеет SEQ ID NO: 6, содержащую мутации Y77H, S80R, Q287P, K289R и N311V. В PCT/US20/23415, поданной 18 марта 2020 г., было обнаружено и описано, что определенные варианты олигосахарилтрансферазы PglB дают неожиданно улучшенные выходы при продуцировании биоконъюгатов О-антигенов *E. coli* конкретных серотипов. Улучшенный или оптимальный вариант PglB для данного О-антигена *E. coli* было нельзя предсказать. Поэтому в настоящем изобретении в определенных аспектах также раскрыты способы получения биоконъюгатов конкретных О-антигенов *E. coli* с использованием конкретных вариантов PglB в качестве олигосахарилтрансферазы. Дополнительные варианты PglB, которые на по меньшей мере 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 одну или несколько конкретных аминокислот в указанных положениях, раскрытых в данном документе в комбинации (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 могут использоваться для получения биоконъюгатов.

[0120] В конкретном варианте осуществления клетка-хозяин (например, рекомбинантная клетка-хозяин), способная продуцировать биоконъюгат полисахаридного антигена O75 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу PglB из *Campylobacter jejuni*, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 или предпочтительно SEQ ID NO: 6, содержащую мутацию N311V.

[0121] В других конкретных вариантах осуществления клетка-хозяин (например, рекомбинантная клетка-хозяин), способная продуцировать биоконъюгат полисахаридного антигена O1A, O6A или O15 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу PglB из *Campylobacter jejuni*, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 или предпочтительно SEQ ID NO: 6, содержащую мутации N311V, K482R, D483H и A669V.

[0122] В конкретном варианте осуществления клетка-хозяин (например, рекомбинантная клетка-хозяин), способная продуцировать биоконъюгат глюкозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу PglB из *Campylobacter jejuni*, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 или предпочтительно SEQ ID NO: 6, содержащую мутацию N311V, или более предпочтительно под SEQ ID NO: 6, содержащую мутации Y77H и N311V. Предпочтительно рекомбинантная клетка-хозяин для продуцирования биоконъюгата глюкозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, дополнительно содержит последовательность, кодирующую глюкозилтрансферазу GtrS, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 (или ее вариант, который на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичен SEQ ID NO: 4) и способную модифицировать полисахаридный антиген O4 *E. coli* путем добавления глюкозы с образованием глюкозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, и нуклеотидные последовательности, кодирующие транслоказу GtrA и гликозилтрансферазу GtrB, имеющие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 7 и 8 соответственно (или их

варианты с аминокислотными последовательностями, которые на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичны SEQ ID NO: 7 и 8 соответственно), где транслоказа способна к транслокации глюкозы, связанной с бактопренолом, а гликозилтрансфераза способна к глюкозилированию бактопренола. Для продуцирования биоконъюгата неглюкозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, клетке не требуются такие последовательности, кодирующие белки GtrS, GtrA и GtrB. Описано получение биоконъюгатов полисахарида глюкозилированного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, с использованием новой GtrS, специфичной в отношении глюкозилирования полисахаридного антигена O4 *E. coli*, в PCT/US20/23404, поданной 18 марта 2020 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0123] В конкретном варианте осуществления клетка-хозяин (например, рекомбинантная клетка-хозяин), способная продуцировать биоконъюгат полисахаридного антигена O16 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу PglB из *Campylobacter jejuni*, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 или предпочтительно SEQ ID NO: 6, содержащую мутации Y77H, S80R, Q287P, K289R и N311V.

[0124] В конкретном варианте осуществления клетка-хозяин (например, рекомбинантная клетка-хозяин), способная продуцировать биоконъюгат полисахаридного антигена O8, O18A, O25B или O2 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу PglB из *Campylobacter jejuni*, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, где предпочтительно SEQ ID NO: 6 не содержит аминокислотных мутаций в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669.

[0125] В некоторых вариантах осуществления любая из клеток-хозяев, описанных в данном документе, содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-переносчик, например, белок, к которому может(могут) быть присоединен(присоединены) полисахаридный(полисахаридные) O-антиген(антигены), продуцируемый(продуцируемые) аппаратом гликозилирования клетки-хозяина, с образованием биоконъюгата. Клетка-хозяин может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую любой белок-переносчик, известный специалистам в данной области с

учетом настоящего изобретения, в том числе без ограничения детоксифицированный экзотоксин А *P. aeruginosa* (EPA), флагеллин *E. coli* (FliC), CRM197, мальтоза-связывающий белок (MBP), дифтерийный анатоксин, столбнячный анатоксин, детоксифицированный гемолизин А *S. aureus*, фактор слипания А, фактор слипания В, термолабильный энтеротоксин *E. coli*, детоксифицированные варианты термолабильного энтеротоксина *E. coli*, субъединицу В холерного токсина (CTB), холерный токсин, детоксифицированные варианты холерного токсина, белок Sat *E. coli*, домен-пассажир белка Sat *E. coli*, пневмолизин *Streptococcus pneumoniae*, гемоцианин лимфы улитки (KLH), PcrV *P. aeruginosa*, белок наружной мембраны *Neisseria meningitidis* (OMPC) и белок D из нетипируемой *Haemophilus influenzae*.

[0126] В предпочтительных вариантах осуществления клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую детоксифицированный экзотоксин А *P. aeruginosa* (EPA). Предпочтительно белок-переносчик EPA содержит 1-10 участков гликозилирования, предпочтительно 2-4 участка гликозилирования, наиболее предпочтительно 4 участка гликозилирования, например, 1-10, предпочтительно 2-4 и более предпочтительно 4 участка гликозилирования, каждый из которых содержит консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 и более предпочтительно имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2. В конкретном варианте осуществления клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-переносчик EPA-4, содержащий SEQ ID NO: 3.

[0127] В определенных вариантах осуществления белки-переносчики, используемые при образовании биоконъюгатов клетками-хозяевами, описанными в данном документе, содержат "метку", т. е. последовательность аминокислот, которая обеспечивает возможность выделения и/или идентификации белка-переносчика. Например, добавление метки к белку-переносчику может быть полезным при очистке этого белка и, следовательно, при очистке конъюгированных вакцин, содержащих меченый белок-переносчик. Типичные метки, которые можно использовать в данном документе, включают без ограничения гистидиновые (HIS) метки (например, гексагистидиновую метку или 6XHis-метку), FLAG-метку и HA-метки. В определенных вариантах осуществления метки, используемые в данном документе, являются удаляемыми, например, при удалении с помощью химических средств или ферментативных средств, когда они больше не нужны, например, после того, как белок был очищен. В других вариантах осуществления белок-переносчик не содержит метки.

[0128] В определенных вариантах осуществления белки-переносчики, описанные в данном документе, содержат сигнальную последовательность, которая нацеливает белок-переносчик в периплазматическое пространство клетки-хозяина, которая экспрессирует белок-переносчик. В конкретном варианте осуществления сигнальная последовательность происходит из DsbA *E. coli*, порина А наружной мембраны *E. coli* (OmpA), мальтоза-связывающего белка *E. coli* (MalE), пектатлиазы *Erwinia carotovorans* (PelB), FlgI, NikA или эндоксиланазы *Bacillus* sp. (XynA), термолабильного энтеротоксина LTIIb *E. coli*, эндоксиланазы XynA *Bacillus* или флагеллина *E. coli* (FlgI). В одном варианте осуществления сигнальная последовательность содержит SEQ ID NO: 10. Сигнальная последовательность может отщепляться после переноса белка в периплазму и, таким образом, может больше не присутствовать в конечном белке-переносчике биоконъюгата.

[0129] В определенных вариантах осуществления в клетки-хозяева, описанные в данном документе, могут быть введены дополнительные модификации (например, с применением рекомбинантных методик). Например, нуклеиновые кислоты клетки-хозяина (например, гены), которые кодируют белки, составляющие часть возможного конкурирующего или препятствующего пути гликозилирования (например, который конкурирует с одним или несколькими гетерологичными генами, участвующими в гликозилировании, которые рекомбинантно вводятся в клетку-хозяина, или препятствует им), могут быть удалены или модифицированы в окружении клетки-хозяина (геноме) таким образом, что они становятся неактивными/дисфункциональными (т. е. удаленные/модифицированные нуклеиновые кислоты клетки-хозяина не кодируют функциональный белок). В определенных вариантах осуществления, когда нуклеиновые кислоты удаляются из генома клеток-хозяев, предусмотренных в данном документе, они заменяются требуемой последовательностью, например, последовательностью, которая применима для продуцирования полисахаридного О-антигена или его биоконъюгата.

[0130] Типичные гены или кластеры генов, которые могут быть удалены в клетках-хозяевах (и в некоторых случаях заменены другими требуемыми последовательностями нуклеиновых кислот), включают гены или кластеры генов клеток-хозяев, участвующие в биосинтезе гликолипидов, такие как *waaL* (см., например, Feldman et al., 2005, *PNAS USA* 102:3016-3021), кластер биосинтеза липида А/сердцевины (*waa*), кластер галактозы (*gal*), кластер арабинозы (*ara*), кластер колановой кислоты (*wc*), кластер капсульного полисахарида, гены биосинтеза

ундекапренола-р (например, *uppS, uppP*), гены реутилизации und-P, метаболические ферменты, участвующие в биосинтезе сахаров, активированных нуклеотидами, кластер общих антигенов энтеробактерий (*eca*) и кластеры модификаций О-антигена профага, такие как кластер *gtrABS* или его области. В конкретном варианте осуществления клетки-хозяева, описанные в данном документе, модифицированы таким образом, что они не продуцируют никакого полисахаридного О-антигена, кроме требуемого полисахаридного О-антигена, например, глюкозилированного полисахаридного антигена О4.

[0131] В конкретном варианте осуществления ген *waaL* подвергнут делеции или функционально инактивирован в геноме клетки-хозяина (например, рекомбинантной клетки-хозяина), предусмотренной в данном документе. Термины "*waaL*" и "ген *waaL*" относятся к гену лигазы О-антигена, кодирующему мембраносвязанный фермент с активным участком, расположенным в периплазме. Кодируемый фермент переносит связанный с ундекапренилфосфатом (UPP) О-антиген к липиду А/сердцевине с образованием липополисахарида. Делеция или нарушение в эндогенном гене *waaL* (например, штаммов Δ*waaL*) нарушает перенос О-антигена к липиду А и вместо этого может усиливать перенос О-антигена к другой биомолекуле, такой как белок-переносчик.

[0132] В другом конкретном варианте осуществления один или несколько из гена *waaL*, гена *gtrA*, гена *gtrB*, гена *gtrS* и кластера генов *rfb* подвергнуты делеции или функционально инактивированы в исходном геноме прокариотической клетки-хозяина, предусмотренной в данном документе.

[0133] В одном варианте осуществления клетка-хозяин, используемая в данном документе, представляет собой *E. coli*, которая продуцирует биоконъюгат глюкозилированного полисахаридного антигена О4, в котором ген *waaL* подвергнут делеции или функционально инактивирован в геноме клетки-хозяина и вставлен ген *gtrS*, специфичный для полисахаридного антигена О4 *E. coli*. В определенных вариантах осуществления для штаммов-продуцентов биоконъюгатов глюкозилированного О-антигена О4 ген *gtrS*, кодирующий глюкозилтрансферазу, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4, вставляется вместо гена *gtrS* исходного штамма, чтобы заменить ген *gtrS* в этом исходном штамме на тот, который отвечает за глюкозилирование антигена О4. Примером такого исходного штамма является штамм *E. coli* K-12 W3110. Гены *gtrA* и *gtrB* могут быть гомологичны исходному штамму или в качестве альтернативы один

или оба из этих генов могут быть гетерологичными исходному штамму. Как правило, и в отличие от гена *gtrS*, эти гены *gtrA* и *gtrB* не являются специфичными в отношении структуры О-антигена.

[0134] В данном документе также описаны способы получения рекомбинантных клеток-хозяев. Рекомбинантные клетки-хозяева, полученные посредством способов, описанных в данном документе, можно использовать для получения биоконъюгатов О-антигенов *E. coli*. Способы включают введение одной или нескольких молекул рекомбинантной нуклеиновой кислоты в клетку с получением рекомбинантной клетки-хозяина. Как правило, молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты являются гетерологичными. Для введения молекул рекомбинантной нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина может применяться любой способ, известный из уровня техники, с учетом настоящего изобретения. Рекомбинантные нуклеиновые кислоты могут быть введены в клетки-хозяева, описанные в данном документе, с применением любых способов, известных специалистам средней квалификации в данной области, например, электропорации, химической трансформации, с помощью теплового шока, естественной трансформации, фаговой трансдукции и конъюгации. В конкретных вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты вводят в клетки-хозяева, описанные в данном документе, с использованием плазмиды. Например, гетерологичные нуклеиновые кислоты могут быть экспрессированы в клетках-хозяевах с помощью плазмиды (например, вектора экспрессии). В другом конкретном варианте осуществления гетерологичные нуклеиновые кислоты вводят в клетки-хозяева, описанные в данном документе, с применением способа вставки в геном, как, например, описано в WO 2014/037585, WO 2014/057109 или WO 2015/052344.

[0135] Штаммы *E. coli*, которые обычно используются в молекулярной биологии как в качестве инструмента, так и в качестве модельного организма, могут, например, использоваться в качестве исходных для клеток-хозяев в определенных вариантах осуществления. Неограничивающие примеры включают штаммы K12 (например, такие как W1485, W2637, W3110, MG1655, DH1, DH5α, DH10 и т. д.), штаммы B (например, BL-21, REL606 и т. д.), штаммы C или штаммы W *E. coli*. В одном конкретном варианте осуществления штамм-хозяин происходит из исходного штамма W3110. Этот штамм может быть получен, например, из Центра генетического фонда *E. coli* в Йельском университете. Для получения дополнительной информации об *E. coli* см., например, Ecoliwiki.net.

[0136] В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева, описанные в данном документе, можно использовать для получения биоконъюгатов, содержащих полисахаридный О-антиген *E. coli*, ковалентно связанный с белком-переносчиком. Способы получения таких биоконъюгатов с использованием клеток-хозяев известны из уровня техники. См., например, WO 2003/074687 и WO 2006/119987. Такие способы включают культивирование любой из рекомбинантных клеток-хозяев, описанных в данном документе, в условиях для получения биоконъюгата. Биоконъюгаты могут быть выделены, отделены и/или очищены от рекомбинантных клеток-хозяев с применением любого способа, известного из уровня техники, с учетом настоящего изобретения. Например, биоконъюгаты могут быть очищены посредством любого способа, известного из уровня техники, для очистки белка, например, посредством хроматографии (например, ионообменной, анионообменной, аффинной и колоночной хроматографии с распределением по размеру), центрифугирования, дифференциальной растворимости или посредством любой другой стандартной методики для очистки белков. См., например, способы, описанные в WO 2009/104074. Кроме того, биоконъюгаты могут быть слиты с гетерологичными последовательностями полипептидов для облегчения очистки. Фактические условия, используемые для очистки конкретного биоконъюгата, будут частично зависеть от таких факторов, как суммарный заряд, гидрофобность и/или гидрофильность биоконъюгата, и будут очевидными для квалифицированных специалистов в данной области. Получение биоконъюгатов для O1A, O2, O6A и O25B, а также содержащих их вакцинных композиций было описано, например, в WO 2015/124769 и в WO 2017/035181.

[0137] Также предусмотрены биоконъюгаты, полученные посредством описанных в данном документе способов, т. е. с использованием рекомбинантных клеток-хозяев, описанных в данном документе.

[0138] В некоторых вариантах осуществления способ получения биоконъюгата полисахаридного О-антигена *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, включает: (i) получение рекомбинантной клетки-хозяина, содержащей (a) нуклеотидную последовательность кластера генов *rfb* для полисахаридного О-антигена; (b) нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-переносчик, предпочтительно EPA, содержащий по меньшей мере один участок гликозилирования, который содержит консенсусную последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 1, предпочтительно SEQ ID NO: 2, и более предпочтительно содержащий четыре участка гликозилирования, каждый из которых содержит консенсусную

последовательность гликозилирования, имеющую SEQ ID NO: 2; и (c) нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу, например, олигосахарилтрансферазу PglB или ее вариант.

[0139] В определенных вариантах осуществления полисахаридные О-антигены *E. coli* ковалентно связаны с белком-переносчиком при конкретном весовом отношении полисахарида к белку (вес/вес). Это отношение количества полисахаридного О-антигена по весу к количеству ковалентно связанного с ним белка-переносчика по весу называют "отношением гликан/белок", или "отношением полисахарид/белок", или "отношением PS/белок". В некоторых вариантах осуществления полисахаридный О-антиген ковалентно связан с белком-переносчиком при отношении полисахарида к белку (вес/вес), составляющим от приблизительно от 1:20 до 20:1, предпочтительно от 1:10 до 10:1, более предпочтительно от 1:3 до 3:1. В определенных неограничивающих вариантах осуществления биоконъюгатов, описанных в данном документе, отношение гликан/белок составляет от приблизительно 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 вариантах осуществления весовое отношение полисахаридный О-антиген:белок составляет от приблизительно 1:10 до 1:2, как, 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 определенных вариантах осуществления отношение гликан/белок составляет от приблизительно 0,15 до приблизительно 0,45. Как правило, более высокое отношение гликан/белок для полисахаридного О-антигена и белка-переносчика является предпочтительным, поскольку большое количество белка-переносчика в некоторых случаях может приводить к иммунной интерференции. Кроме того, более высокое отношение гликан/белок способствовало бы получению достаточного количества полисахаридного О-антигена в виде биоконъюгата с сохранением при этом относительно низкого количества белка-переносчика, что особенно полезно для поливалентных композиций, где композиция должна охватывать несколько серотипов, например, композиций, содержащих биоконъюгаты из 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.

[0140] Отношение гликан/белок у конъюгата по настоящему изобретению можно определить путем определения количества белка и количества гликана. Количество белка можно определить путем измерения поглощения УФ-излучения при 280 нм

(A280). Количество гликанов можно определить с использованием ионной хроматографии с импульсным амперометрическим выявлением (IC-PAD) сахара в повторяющемся звене (например, Man для O8 в таблице 1 и GlcNAc для других гликанов в таблице 1), после чего структурную информацию о повторяющемся звене можно использовать для расчета общего количества гликанов (например, повторяющееся звено O1A имеет молярную массу 845 Да, и при этом один моль такого повторяющегося звена содержит один моль GlcNAc, что дает возможность рассчитать общее количество гликанов, в случае если количество GlcNAc было определено посредством IC-PAD).

[0141] В некоторых вариантах осуществления биоконъюгат полисахаридного антигена O25B *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, как описано в данном документе, характеризуется определенной степенью ацетилирования в положении 2 сахара L-Rh. Степень O-ацетилирования полисахаридного антигена O25B в (био)конъюгате предпочтительно составляет по меньшей мере 30%, предпочтительно по меньшей мере 50%, как, например, по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100%.

[0142] Аналогично, степень O-ацетилирования полисахаридного антигена O16 *E. coli* в (био)конъюгате предпочтительно составляет по меньшей мере 30%, предпочтительно по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100%.

[0143] В конкретных вариантах осуществления способ получения биоконъюгата полисахаридного O-антигена включает получение рекомбинантной клетки-хозяина, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую конкретный фермент олигосахарилтрансферазу, в частности олигосахарилтрансферазу PglB или ее вариант, в зависимости от биоконъюгата полисахаридного O-антигена, который должен быть получен. Конкретный вариант фермента олигосахарилтрансферазы может влиять на выход биоконъюгата, продуцируемого клеткой-хозяином. Как правило, предпочтительным является более высокий выход, поскольку выход будет влиять на затраты на получение конкретного биоконъюгата, что особенно важно для поливалентных композиций, содержащих несколько разных биоконъюгатов.

[0144] В одном конкретном варианте осуществления, в случае если O-антиген представляет собой полисахаридный антиген O75, олигосахарилтрансфераза PglB содержит аминокислотную мутацию N311V, где аминокислотные мутации указаны

относительно PglB дикого типа, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6.

[0145] В другом конкретном варианте осуществления, в случае если О-антиген представляет собой полисахаридный антиген O1A, O6A или O15, олигосахарилтрансфераза PglB содержит аминокислотные мутации N311V, K482R, D483H и A669V, где аминокислотные мутации указаны относительно PglB дикого типа, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6.

[0146] В другом конкретном варианте осуществления, в случае если О-антиген представляет собой глюкозилированный полисахаридный антиген O4, олигосахарилтрансфераза PglB содержит аминокислотную мутацию N311V или аминокислотные мутации Y77H и N311V, где аминокислотные мутации указаны относительно PglB дикого типа, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6.

[0147] В другом конкретном варианте осуществления, в случае если О-антиген представляет собой полисахаридный антиген O16, олигосахарилтрансфераза PglB содержит аминокислотные мутации Y77H, S80R, Q287P, K289R и N311V, где аминокислотные мутации указаны относительно PglB дикого типа, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6.

[0148] В другом конкретном варианте осуществления, в случае если О-антиген представляет собой полисахаридный антиген O8, O18A, O25B или O2, олигосахарилтрансфераза PglB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, где SEQ ID NO: 6 не содержит аминокислотных мутаций в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669. В определенных вариантах осуществления олигосахарилтрансфераза PglB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6.

[0149] В некоторых вариантах осуществления биоконъюгаты полисахаридных О-антигенов, продуцируемые рекомбинантными клетками-хозяевами, кодирующими ферменты олигосахарилтрансферазы согласно указанным выше парам О-антиген/олигосахарилтрансфераза PglB, предпочтительно характеризуются одним или несколькими предпочтительными свойствами, описанными в данном документе, например, отношением гликан/белок и/или процентной долей полигликозилированного белка-переносчика.

Композиции и комбинации

[0150] В данном документе предусмотрены композиции и комбинации, содержащие полисахаридные антигены O75 и O6 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, и необязательно дополнительно содержащие один или несколько, предпочтительно все, из полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O15, O16, O18, O25 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком. Комбинация полисахаридных O-антигенов или конъюгатов, например, биоконъюгатов, может содержать несколько композиций, однако предпочтительно, чтобы комбинация полисахаридных O-антигенов или конъюгатов, например, биоконъюгатов, присутствовала в одной и той же композиции.

[0151] Композиции и комбинации, описанные в данном документе, применимы для лечения и предупреждения инфицирования субъектов (например, людей) *E. coli*, предпочтительно для предупреждения инвазивного заболевания, вызываемого ExPEC. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой иммуногенную композицию. Как используется в данном документе, термин "иммуногенная композиция" относится к композиции, которая может вызывать иммунный ответ у хозяина или субъекта, которому вводят эту композицию. Композиции и иммуногенные композиции могут дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. В данном контексте "фармацевтически приемлемый" означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или указанный в Фармакопее США или в другой общепризнанной фармакопее для применения у животных или, более конкретно, у людей. Термин "носитель", используемый в контексте фармацевтически приемлемого носителя, относится к разбавителю, адъюванту, наполнителю или носителю, с которым вводят фармацевтическую композицию. Физиологические растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, в частности, для инъекционных растворов. Подходящие наполнители 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. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences" у EW. Martin.

[0152] В одном варианте осуществления композиция по настоящему изобретению содержит (био)конъюгаты, как описано в данном документе, в забуференном Tris

физиологическим растворе (TBS), pH 7,4 (например, содержащем Tris, NaCl и KCl, например, при концентрации 25 мМ, 137 мМ и 2,7 мМ соответственно). В других вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат (био)конъюгаты, как описано в данном документе, приблизительно в 10 мМ буфера KH_2PO_4/Na_2HPO_4 при pH, составляющим приблизительно 7,0, приблизительно 5% (вес/об.) сорбита, приблизительно 10 мМ метионина и приблизительно 0,02% (вес/объем) полисорбата 80. В других вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат (био)конъюгаты, как описано в данном документе, в приблизительно 10 мМ буфера KH_2PO_4/Na_2HPO_4 при pH, составляющем приблизительно 7,0, приблизительно 8% (вес/об.) сахарозы, приблизительно 1 мМ EDTA и приблизительно 0,02% (вес/об.) полисорбата 80 (см., например, WO 2018/077853 для подходящих буферов для биоконъюгатов О-антигенов *E. coli*, ковалентно связанных с белком-переносчиком EPA). В других вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат (био)конъюгаты, как описано в данном документе, в приблизительно 5 мМ сукцината/0,9% NaCl, pH 6,0.

[0153] В данном документе предусмотрены композиции (например, фармацевтические и/или иммуногенные композиции), которые представляют собой поливалентные композиции, например, двухвалентные, трехвалентные, четырехвалентные и т. д. композиции. Например, поливалентная композиция содержит более чем один антиген, такой как О-антиген *E. coli*, его гликоконъюгат или биоконъюгат. В конкретных вариантах осуществления поливалентные композиции, предусмотренные в данном документе, содержат биоконъюгат полисахаридного антигена O75 *E. coli* и биоконъюгат полисахаридного антигена O6A *E. coli*. В некоторых вариантах осуществления поливалентные композиции, предусмотренные в данном документе, содержат по меньшей мере один дополнительный антиген или биоконъюгат.

[0154] Как правило, композиции по настоящему изобретению могут быть получены вначале путем получения индивидуальных гликоконъюгатов для каждого из полисахаридных О-антигенов *E. coli*, как описано в данном документе, путем независимого ковалентного связывания этих полисахаридных О-антигенов с белком-переносчиком, например, посредством химической конъюгации или биоконъюгации, и последующего смешивания индивидуальных гликоконъюгатов в количествах и соотношениях, как описано в данном документе, с получением композиций в соответствии с настоящим изобретением.

[0155] В одном варианте осуществления композиция (например, фармацевтическая и/или иммуногенная композиция) представляет собой поливалентную композицию, содержащую полисахаридный антиген O75 *E. coli*, ковалентно связанный с белком-переносчиком, как описано в данном документе, и по меньшей мере один дополнительный антиген.

[0156] В некоторых вариантах осуществления дополнительный антиген представляет собой сахаридный или полисахаридный антиген, более предпочтительно полисахаридный O-антиген *E. coli*, такой как O-антиген *E. coli* одного или нескольких из серотипов O1, O2, O4, O6, O8, O15, O16, O18 и O25 и их подсеротипов, при этом предпочтительно каждый из них индивидуально конъюгирован с белком-переносчиком, где белок-переносчик для каждого серотипа может быть одинаковым или может различаться между некоторыми или всеми серотипами. Предпочтительно поливалентная композиция, содержащая (био)конъюгат полисахарида O75 *E. coli*, дополнительно содержит O-антигены *E. coli* каждого из серотипов O1, O2, O4, O6, O15, O16, O18 и O25 или их подсеротипов. В некоторых вариантах осуществления каждый из дополнительных полисахаридных O-антигенов *E. coli* представляет собой гликоконъюгат, что означает то, что полисахаридный O-антиген *E. coli* ковалентно связан с другим химическим соединением, например, белком, пептидом, липидом и т. д., наиболее предпочтительно белком-переносчиком, как, например, посредством химических или ферментативных способов. В предпочтительных вариантах осуществления каждый из дополнительных полисахаридных O-антигенов *E. coli* представляет собой биоконъюгат, в котором полисахаридный O-антиген ковалентно связан, например, с белком-переносчиком, посредством гликозидной связи ферментативно с помощью аппарата клетки-хозяина. В определенных вариантах осуществления поливалентная композиция дополнительно содержит O-антиген *E. coli* серотипа O8, предпочтительно в форме гликоконъюгата, предпочтительно биоконъюгата. Композиции, предусмотренные в данном документе, в определенных вариантах осуществления могут содержать 1-20 дополнительных гликоконъюгатов, более предпочтительно биоконъюгатов полисахаридных O-антигенов *E. coli*, как, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 дополнительных гликоконъюгатов или предпочтительно биоконъюгатов полисахаридных O-антигенов *E. coli*. В композиции, предусмотренные в данном документе, могут быть включены другие антигены, такие как пептидные, белковые или липидные антигены и т. д.

[0157] В некоторых вариантах осуществления композиция (например, фармацевтическая и/или иммуногенная композиция) содержит (био)конъюгат полисахаридного антигена O75 *E. coli*, и (био)конъюгат полисахаридного антигена O6 *E. coli*, и по меньшей мере один дополнительный полисахаридный антиген, выбранный из группы, состоящей из полисахаридного антигена O1 *E. coli*, полисахаридного антигена O2 *E. coli*, глюкозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, полисахаридного антигена O8 *E. coli*, полисахаридного антигена O15 *E. coli*, полисахаридного антигена O16 *E. coli*, полисахаридного антигена O18 *E. coli* и полисахаридного антигена O25 *E. coli*, предпочтительно по меньшей мере полисахаридного антигена O1 *E. coli*, полисахаридного антигена O2 *E. coli* и полисахаридного антигена O25 *E. coli*, более предпочтительно по меньшей мере полисахаридного антигена O1 *E. coli*, полисахаридного антигена O2 *E. coli*, полисахаридного антигена O25 *E. coli*, полисахаридного антигена O4 *E. coli*, полисахаридного антигена O15 *E. coli*, полисахаридного антигена O16 *E. coli* и полисахаридного антигена O18 *E. coli*. Предпочтительно полисахаридный антиген O1 представляет собой полисахаридный антиген O1A, полисахаридный антиген O6 представляет собой полисахаридный антиген O6A, полисахаридный антиген O4 представляет собой глюкозилированный полисахаридный антиген O4, полисахаридный антиген O18 представляет собой полисахаридный антиген O18A, и полисахаридный антиген O25 представляет собой полисахаридный антиген O25B. Предпочтительно каждый из дополнительных полисахаридных O-антигенов ковалентно связан с белком-переносчиком и более предпочтительно представляет собой биоконъюгат.

[0158] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит O75 *E. coli* и по меньшей мере один из полисахаридных антигенов O1, O2 или O6 *E. coli*, предпочтительно по меньшей мере один из полисахаридных антигенов O1 или O6 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, и где отношение концентраций полисахаридного антигена O75 к полисахаридному антигену O1, O2 и/или O6 составляет от приблизительно 1,2:1 до приблизительно 8:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, более предпочтительно приблизительно 2:1, например, приблизительно 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1, 2,0:1, 2,1:1, 2,2:1, 2,3:1, 2,4:1 или 2,5:1. В предпочтительных вариантах осуществления композиция дополнительно содержит полисахаридный антиген O25 *E. coli*, предпочтительно полисахаридный антиген O25B *E. coli*, ковалентно связанный с белком-переносчиком, и где отношение концентраций

полисахаридного антигена O25 к полисахаридным антигенам O1, O2 и/или O6 составляет от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, предпочтительно приблизительно 2:1. В таких вариантах осуществления отношение концентраций полисахаридного антигена O25 к полисахаридному антигену O75 предпочтительно составляет от приблизительно 2:1 до приблизительно 1:1, предпочтительно приблизительно 1,5:1, более предпочтительно приблизительно 1:1. В их определенных вариантах осуществления отношение концентраций полисахаридного антигена O25 к полисахаридному антигену O2 составляет от приблизительно 4:1 до приблизительно 2:1. В определенных вариантах осуществления композиция содержит полисахаридные антигены O75, O1, O2, O6 и O25 *E. coli*, где предпочтительно полисахаридные антигены O1, O6 и O25 соответственно представляют собой полисахариды O1A, O6A и O25B, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, и где отношение концентраций полисахаридных антигенов O75:O1:O2:O6:O25 составляет приблизительно 2:1:1:1:2. В определенных вариантах осуществления O-антигены ковалентно связаны с белком-переносчиком посредством биоконъюгации, например, посредством N-связей с остатками Asn в белке-переносчике. В определенных вариантах осуществления концентрация полисахаридного антигена O75 в композиции составляет приблизительно 8-64 мкг/мл, предпочтительно приблизительно 16-32 мкг/мл, предпочтительно приблизительно 28-36 мкг/мл, например, приблизительно 32 мкг/мл. В определенных вариантах осуществления композиция дополнительно содержит один или несколько, предпочтительно все, из полисахаридных антигенов O4, O15, O16, O18 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, где предпочтительно O4 является глюкозилированным, и антиген O18 представляет собой O18A. В определенных вариантах осуществления композиция дополнительно содержит полисахаридный антиген O8 *E. coli*, ковалентно связанный с белком-переносчиком. В определенных вариантах осуществления отношение концентраций полисахаридных антигенов O75:O4:O15:O16:O18:O8, в случае если каждый из них присутствует в композиции, составляет приблизительно 2:1:1:1:1:1. В дополнительных вариантах осуществления композиция может содержать один или несколько дополнительных полисахаридных O-антигенов *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком.

[0159] В одном варианте осуществления полисахаридный антиген O1 (например, в выделенной форме или в виде части гликоконъюгата или биоконъюгата) используется

в композиции, предусмотренной в данном документе (например, в комбинации с полисахаридным антигеном O75 или его биоконъюгатом). В конкретном варианте осуществления полисахаридный антиген O1 характеризуется структурой 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, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20. Полисахаридный антиген O1 предпочтительно является частью биоконъюгата и ковалентно связан с белком-переносчиком, например, EPA или CRM_{197}. В определенных вариантах осуществления весовое отношение между полисахаридными антигенами O75:O1 в композиции и/или при введении субъекту составляет от приблизительно 1,2:1 до 8:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до 4:1, более предпочтительно приблизительно 2:1, например, приблизительно 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1, 2,0:1, 2,1:1, 2,2:1, 2,3:1, 2,4:1 или 2,5:1.

[0160] В одном варианте осуществления полисахаридный антиген O2 (например, в выделенной форме или в виде части гликоконъюгата или биоконъюгата) используется в композиции, предусмотренной в данном документе (например, в комбинации с полисахаридным антигеном O75 или его биоконъюгатом). В конкретном варианте осуществления полисахаридный антиген O2 характеризуется структурой 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, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20. Полисахаридный антиген O2 предпочтительно является частью биоконъюгата и ковалентно связан с белком-переносчиком, например, EPA или CRM_{197}. В определенных вариантах осуществления весовое отношение между полисахаридными антигенами O75:O2 в композиции и/или при введении субъекту составляет от приблизительно 1,2:1 до 8:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до 4:1, более предпочтительно приблизительно 2:1, например, приблизительно 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1, 2,0:1, 2,1:1, 2,2:1, 2,3:1, 2,4:1 или 2,5:1.

[0161] В одном варианте осуществления полисахаридный антиген O4 (например, в выделенной форме или в виде части гликоконъюгата или биоконъюгата) используется в композиции, предусмотренной в данном документе (например, в комбинации с полисахаридным антигеном O75 или его биоконъюгатом). В конкретном варианте осуществления полисахаридный антиген O4 представляет собой глюкозилированный полисахаридный антиген O4 и в конкретном варианте осуществления характеризуется структурой 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,

предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20. Полисахаридный антиген O4 предпочтительно является частью биоконъюгата и ковалентно связан с белком-переносчиком, например, EPA или CRM_{197}. В определенных вариантах осуществления весовое отношение между полисахаридными антигенами O75:O4 в композиции и/или при введении субъекту составляет от приблизительно 1,2:1 до 8:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до 4:1, более предпочтительно приблизительно 2:1, например, приблизительно 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1, 2,0:1, 2,1:1, 2,2:1, 2,3:1, 2,4:1 или 2,5:1.

[0162] В одном варианте осуществления полисахаридный антиген O6 (например, в выделенной форме или в виде части гликоконъюгата или биоконъюгата) используется в композиции, предусмотренной в данном документе (например, в комбинации с полисахаридным антигеном O75 или его биоконъюгатом). В конкретном варианте осуществления полисахаридный антиген O6 характеризуется структурой 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, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20. Полисахаридный антиген O6 предпочтительно является частью биоконъюгата и ковалентно связан с белком-переносчиком, например, EPA или CRM_{197}. В определенных вариантах осуществления весовое отношение между полисахаридными антигенами O75:O6 в композиции и/или при введении субъекту составляет от приблизительно 1,2:1 до 8:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до 4:1, более предпочтительно приблизительно 2:1, например, приблизительно 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1, 2,0:1, 2,1:1, 2,2:1, 2,3:1, 2,4:1 или 2,5:1.

[0163] В одном варианте осуществления полисахаридный антиген O8 (например, в выделенной форме или в виде части гликоконъюгата или биоконъюгата) используется в композиции, предусмотренной в данном документе (например, в комбинации с полисахаридным антигеном O75 или его биоконъюгатом). В конкретном варианте осуществления полисахаридный антиген O8 характеризуется структурой 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, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20. Полисахаридный антиген O8 предпочтительно является частью биоконъюгата и ковалентно связан с белком-переносчиком, например, EPA или CRM_{197}. В определенных вариантах осуществления весовое отношение между полисахаридными антигенами O75:O8 в композиции и/или при введении субъекту составляет от приблизительно 1,2:1 до 8:1, предпочтительно от

приблизительно 1,5:1 до 4:1, более предпочтительно приблизительно 2:1, например, приблизительно 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1, 2,0:1, 2,1:1, 2,2:1, 2,3:1, 2,4:1 или 2,5:1.

[0164] В одном варианте осуществления полисахаридный антиген O15 (например, в выделенной форме или в виде части гликоконъюгата или биоконъюгата) используется в композиции, предусмотренной в данном документе (например, в комбинации с полисахаридным антигеном O75 или его биоконъюгатом). В конкретном варианте осуществления полисахаридный антиген O15 характеризуется структурой 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, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20. Полисахаридный антиген O15 предпочтительно является частью биоконъюгата и ковалентно связан с белком-переносчиком, например, EPA или CRM_{197}. В определенных вариантах осуществления весовое отношение между полисахаридными антигенами O75:O15 в композиции и/или при введении субъекту составляет от приблизительно 1,2:1 до 8:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до 4:1, более предпочтительно приблизительно 2:1, например, приблизительно 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1, 2,0:1, 2,1:1, 2,2:1, 2,3:1, 2,4:1 или 2,5:1.

[0165] В одном варианте осуществления полисахаридный антиген O16 (например, в выделенной форме или в виде части гликоконъюгата или биоконъюгата) используется в композиции, предусмотренной в данном документе (например, в комбинации с полисахаридным антигеном O75 или его биоконъюгатом). В конкретном варианте осуществления полисахаридный антиген O16 характеризуется структурой 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, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20. Полисахаридный антиген O16 предпочтительно является частью биоконъюгата и ковалентно связан с белком-переносчиком, например, EPA или CRM_{197}. В определенных вариантах осуществления весовое отношение между полисахаридными антигенами O75:O16 в композиции и/или при введении субъекту составляет от приблизительно 1,2:1 до 8:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до 4:1, более предпочтительно приблизительно 2:1, например, приблизительно 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1, 2,0:1, 2,1:1, 2,2:1, 2,3:1, 2,4:1 или 2,5:1.

[0166] В одном варианте осуществления полисахаридный антиген O18 (например, в выделенной форме или в виде части гликоконъюгата или биоконъюгата) используется в композиции, предусмотренной в данном документе (например, в комбинации с полисахаридным антигеном O75 или его биоконъюгатом). В конкретном варианте

осуществления полисахаридный антиген O18 характеризуется структурой 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, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20. Полисахаридный антиген O18 предпочтительно является частью биоконъюгата и ковалентно связан с белком-переносчиком, например, EPA или CRM_{197}. В определенных вариантах осуществления весовое отношение между полисахаридными антигенами O75:O18 в композиции и/или при введении субъекту составляет от приблизительно 1,2:1 до 8:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до 4:1, более предпочтительно приблизительно 2:1, например, приблизительно 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1, 2,0:1, 2,1:1, 2,2:1, 2,3:1, 2,4:1 или 2,5:1.

[0167] В одном варианте осуществления полисахаридный антиген O25 (например, в выделенной форме или в виде части гликоконъюгата или биоконъюгата) используется в композиции, предусмотренной в данном документе (например, в комбинации с полисахаридным антигеном O75 или его биоконъюгатом). В конкретном варианте осуществления полисахаридный антиген O25 предусматривает полисахаридный антиген O25B и в конкретном варианте осуществления характеризуется структурой 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, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20. Полисахаридный антиген O25 предпочтительно является частью биоконъюгата и ковалентно связан с белком-переносчиком, например, EPA или CRM_{197}. В определенных вариантах осуществления весовое отношение между полисахаридными антигенами O75:O25 в композиции и/или при введении субъекту составляет от приблизительно 1:4 до 1:0,5, предпочтительно от приблизительно 1:2 до 1:1, более предпочтительно приблизительно 1:1, например, приблизительно 1:1,5, 1:1,4, 1:1,3, 1:1,2, 1:1,1, 1:1,0, 1:0,9, 1:0,8, 1:0,7, 1:0,6 или 1:0,5.

[0168] В другом варианте осуществления композиция (например, фармацевтическая и/или иммуногенная композиция) содержит по меньшей мере полисахаридные антигены O75, O1, O2, O4, O6 и O25 *E. coli*, конъюгированные с белком-переносчиком, предпочтительно биоконъюгаты полисахаридных антигенов O75, O1A, O2, глюкозилированного O4, O6A и O25B, ковалентно связанных с белком-переносчиком, например, EPA или CRM_{197} (т. е. является по меньшей мере шестивалентной композицией). В одном варианте осуществления весовое отношение между полисахаридными антигенами O75:O1:O2:O4:O6:O25 в композиции и/или при введении субъекту составляет приблизительно 2:1:1:1:1:2.

[0169] В предпочтительном варианте осуществления композиция (например, фармацевтическая и/или иммуногенная композиция) содержит по меньшей мере полисахаридные антигены O1, O2, O4, O6, O15, O16, O18, O25 и O75 *E. coli*, конъюгированные с белком-переносчиком, предпочтительно биоконъюгаты полисахаридных антигенов O1A, O2, глюкозилированного O4, O6A, O15, O16, O18A, O25B и O75, ковалентно связанных с белком-переносчиком, например, EPA или CRM_{197} (т. е. является по меньшей мере 9-валентной композицией). В одном варианте осуществления весовое отношение между полисахаридными антигенами O75:O1:O2:O4:O6:O15:O16:O18:O25 в композиции и/или при введении субъекту составляет приблизительно 2:1:1:1:1:1:1:1:2.

[0170] В другом предпочтительном варианте осуществления композиция (например, фармацевтическая и/или иммуногенная композиция) содержит по меньшей мере полисахаридные антигены O1, O2, O4, O6, O8, O15, O16, O18, O25 и O75 *E. coli*, конъюгированные с белком-переносчиком, предпочтительно биоконъюгаты полисахаридных антигенов O1A, O2, глюкозилированного O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75, ковалентно связанных с белком-переносчиком, например, EPA или CRM_{197} (т. е. является по меньшей мере 10-валентной композицией). В одном варианте осуществления весовое отношение между полисахаридными антигенами O75:O1:O2:O4:O6:O8:O15:O16:O18:O25 в композиции и/или при введении субъекту составляет приблизительно 2:1:1:1:1:1:1:1:1:2.

[0171] Также в данном документе рассматриваются композиции, которые необязательно дополнительно содержат другие O-антигены (например, в выделенной форме или в виде части гликоконъюгата или биоконъюгата) из других серотипов *E. coli*. В некоторых вариантах осуществления композиция (например, фармацевтическая и/или иммуногенная композиция) предусматривает по меньшей мере 6-, 9- или 10-валентные композиции, как описано выше, и дополнительно содержит от 1 до 15 дополнительных полисахаридных антигенов *E. coli*, предпочтительно (био)конъюгаты полисахаридных антигенов, ковалентно связанных с белком-переносчиком, например, EPA или CRM_{197}, как, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 дополнительных полисахаридных антигенов *E. coli*. В определенных вариантах осуществления 6-, 9- или 10-валентные композиции, как описано выше, не содержат дополнительных полисахаридных антигенов *E. coli* или их конъюгатов, т. е. такие композиции содержат 6, 9 или 10, но не больше полисахаридных антигенов *E. coli* соответственно, предпочтительно в форме конъюгатов, предпочтительно

биоконъюгатов. Таким образом, один вариант осуществления предусматривает композицию, которая содержит 9 конъюгатов, в частности полисахаридные антигены O1, O2, O4, O6, O15, O16, O18, O25 и O75 *E. coli*, конъюгированные с белком-переносчиком, предпочтительно биоконъюгаты полисахаридных антигенов O1A, O2, глюкозилированного O4, O6A, O15, O16, O18A, O25B и O75, ковалентно связанных с белком-переносчиком, например, EPA или CRM_{197} (т. е. 9-валентную композицию), и не содержит дополнительных конъюгатов полисахаридных O-антигенов *E. coli*, ковалентно связанных с белком-переносчиком. Таким образом, другой вариант осуществления предусматривает композицию, которая содержит 10 конъюгатов, в частности полисахаридные антигены O1, O2, O4, O6, O8, O15, O16, O18, O25 и O75 *E. coli*, конъюгированные с белком-переносчиком, предпочтительно биоконъюгаты полисахаридных антигенов O1A, O2, глюкозилированного O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75, ковалентно связанных с белком-переносчиком, например, EPA или CRM_{197} (т. е. 10-валентную композицию), и не содержит дополнительных конъюгатов полисахаридных O-антигенов *E. coli*, ковалентно связанных с белком-переносчиком.

[0172] В некоторых предпочтительных вариантах осуществления каждый из дополнительных полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O6, O15, O16, O18 и/или O25 *E. coli* ковалентно связан с белком-переносчиком. Полисахаридный O-антиген может быть связан с белком-переносчиком посредством химических или других синтетических способов, или полисахаридный O-антиген может являться частью биоконъюгата и предпочтительно является частью биоконъюгата. Предпочтительно каждый из O-антигенов каждого серотипа, охватываемого композицией, по отдельности связан с белком-переносчиком, т. е. каждый гликоконъюгат или биоконъюгат, охватывающий конкретный серотип, может быть получен отдельно перед смешиванием с композицией в соответствии с настоящим изобретением. Белок-переносчик предпочтительно может быть одинаковым для каждого гликоконъюгата или биоконъюгата в композиции или в качестве альтернативы может различаться для некоторых или всех O-антигенов *E. coli*, например, O-антигены различных серотипов также могут быть конъюгированы с различными белками-переносчиками. Можно использовать любой белок-переносчик, известный специалистам в данной области, принимая во внимание настоящее изобретение. Подходящие белки-переносчики включают без ограничения детоксифицированный экзотоксин A *P. aeruginosa* (EPA), флагеллин (FliC) *E. coli*, CRM197, мальтоза-связывающий белок (MBP), дифтерийный анатоксин, столбнячный анатоксин, детоксифицированный гемолизин A *S. aureus*,

фактор слипания A, фактор слипания B, термолабильный энтеротоксин *E. coli*, детоксифицированные варианты термолабильного энтеротоксина *E. coli*, субъединицу B холерного токсина (CTB), холерный токсин, детоксифицированные варианты холерного токсина, белок Sat *E. coli*, домен-пассажир белка Sat *E. coli*, пневмолизин *Streptococcus pneumoniae*, гемоцианин лимфы улитки (KLH), PcrV *P. aeruginosa*, белок наружной мембраны *Neisseria meningitidis* (OMPC) и белок D из нетипируемой *Haemophilus influenzae*. Предпочтительно белок-переносчик представляет собой EPA или CRM_{197}.

[0173] В некоторых вариантах осуществления каждый из дополнительных полисахаридных антигенов O1(A), O2, (глюкозилированного) O4, O6(A), O15, O16, O18(A) и/или O25(B) *E. coli*, в частности когда они являются частью биоконъюгата, ковалентно связан с остатком аспарагина (Asn) в белке-переносчике, где остаток Asn присутствует в участке гликозилирования, содержащем консенсусную последовательность гликозилирования Asn-X-Ser(Thr), где X может представлять собой любую аминокислоту, за исключением Pro (SEQ ID NO: 1), где предпочтительно остаток Asn присутствует в участке гликозилирования, содержащем консенсусную последовательность гликозилирования Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбраны из любой аминокислоты, за исключением Pro (SEQ ID NO: 2). Белок-переносчик может содержать 1-10 участков гликозилирования, предпочтительно 2-4 участка гликозилирования, наиболее предпочтительно 4 участка гликозилирования, каждый из которых содержит консенсусную последовательность гликозилирования. В конкретном варианте осуществления белок-переносчик представляет собой белок-переносчик EPA-4, например, белок-переносчик EPA-4, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3.

[0174] В конкретном варианте осуществления в данном документе предусмотрена композиция (например, фармацевтическая и/или иммуногенная композиция), содержащая: (i) биоконъюгат полисахаридного антигена O75 *E. coli*, ковалентно связанного с детоксифицированным экзотоксином A белка-переносчика *P. aeruginosa*, содержащим SEQ ID NO: 3 (белком-переносчиком EPA-4), где полисахаридный антиген O75 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O75); (ii) биоконъюгат полисахаридного антигена O1A *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, где полисахаридный антиген O1A *E. coli* характеризуется структурой формулы (O1A); (iii) биоконъюгат полисахаридного антигена O2 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, где полисахаридный антиген O2 *E. coli* характеризуется

структурой формулы (O2); (iv) биоконъюгат полисахаридного антигена O6A *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, где полисахаридный антиген O6A *E. coli* характеризуется структурой формулы (O6A); (v) биоконъюгат полисахаридного антигена O15 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, где полисахаридный антиген O15 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O15); (vi) биоконъюгат полисахаридного антигена O16 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, где полисахаридный антиген O16 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O16); (vii) биоконъюгат полисахаридного антигена O18A *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, где полисахаридный антиген O18A *E. coli* характеризуется структурой формулы (O18A); (viii) биоконъюгат полисахаридного антигена O25B *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, где полисахаридный антиген O25B *E. coli* характеризуется структурой формулы (O25B); и (ix) биоконъюгат глюкозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, где глюкозилированный полисахаридный антиген O4 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O4-Glc+), где каждая из формул представлена в таблице 1, и для каждой из формул независимо n представляет собой целое число от 1 до 100, например, от 1 до 50, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20.

[0175] В конкретном варианте осуществления указанная композиция (например, фармацевтическая и/или иммуногенная композиция) дополнительно содержит: (x) биоконъюгат полисахаридного антигена O8 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, где полисахаридный антиген O8 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O8), как показано в таблице 1, где n для данной структуры представляет собой целое число от 1 до 100, например, от 1 до 50, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20.

[0176] В некоторых вариантах осуществления композиция, предусмотренная в данном документе, содержит конъюгат полисахаридного антигена O75 *E. coli* и по меньшей мере конъюгат полисахаридного антигена O6 *E. coli*, предпочтительно полисахаридный антиген O6A, где конъюгат полисахаридного антигена O75 *E. coli* присутствует в композиции в концентрации, которая в приблизительно 1,2-8 раз выше, например, в приблизительно 2-4 раза выше, например, в 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 раз выше, чем концентрация

полисахаридного антигена O6, присутствующего в композиции (все концентрации приведены в пересчете на вес полисахаридных O-антигенов). Предпочтительно полисахаридный антиген O75 *E. coli* присутствует в композиции в концентрации, которая в приблизительно 1,5-2,5 раза выше, например, в 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4 или 2,5 раза выше, чем концентрация полисахаридного антигена O6 в композиции.

[0177] В конкретных вариантах осуществления композиция содержит биоконъюгаты полисахаридных антигенов O1A, O2, глюкозилированного O4, O6A, O15, O16, O18, O25B и O75 *E. coli*, где биоконъюгаты O1A:O2:глюкозилированного O4:O6A:O15:O16:O18:O25B:O75 присутствуют в отношении (по весу полисахаридного O-антигена), составляющем 1:1:1:1:1:1:1:2:2, 1:1:1:1:1:1:1:2:1,5, 2:1:1:2:1:1:1:4:3, 2:1:1:2:1:1:1:4:4, 2:1:2:2:2:2:2:4:4, предпочтительно приблизительно 1:1:1:1:1:1:1:2:2.

[0178] В конкретных вариантах осуществления композиция содержит биоконъюгаты полисахаридных антигенов O1A, O2, глюкозилированного O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75 *E. coli*, где биоконъюгаты O1A:O2:глюкозилированного O4:O6A:O8:O15:O16:O18A:O25B:O75 присутствуют в отношении (по весу полисахаридного O-антигена), составляющем 1:1:1:1:1:1:1:1:2:2, 2:1:2:2:2:2:2:2:4:4, 2:1:1:2:1:1:1:1:4:3 или 2:1:1:2:1:1:1:1:4:4, предпочтительно приблизительно 1:1:1:1:1:1:1:1:2:2.

[0179] В некоторых вариантах осуществления композиция, предусмотренная в данном документе, содержит биоконъюгат полисахаридного антигена O75 *E. coli* и по меньшей мере биоконъюгат полисахаридного антигена O6 *E. coli*, где биоконъюгат полисахаридного антигена O75 *E. coli* присутствует в композиции в концентрации, составляющей от приблизительно 8 до приблизительно 50 мкг/мл, предпочтительно от приблизительно 12 до приблизительно 40 мкг/мл, более предпочтительно от приблизительно 16 до приблизительно 32 мкг/мл, как, например, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 или 32 мкг/мл, предпочтительно приблизительно 32 мкг/мл. Концентрация биоконъюгата полисахаридного антигена O75 *E. coli* предпочтительно в от приблизительно 1,2 до приблизительно 8 раз, например, в приблизительно 2-4 раза выше, как, например, в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 раз выше, чем концентрация биоконъюгата O6, присутствующего в композиции.

[0180] В одном конкретном варианте осуществления предусмотрена фармацевтическая композиция, при этом данная композиция содержит:

(i) биоконъюгат полисахаридного антигена O1A *E. coli*, ковалентно связанного с

белком-переносчиком EPA-4, при концентрации полисахарида, составляющей приблизительно 12-20, предпочтительно приблизительно 16 мкг/мл;

(ii) биоконъюгат полисахаридного антигена O2 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, при концентрации полисахарида, составляющей приблизительно 12-20, предпочтительно приблизительно 16 мкг/мл;

(iii) биоконъюгат полисахаридного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, при концентрации полисахарида, составляющей приблизительно 12-20, предпочтительно приблизительно 16 мкг/мл;

(iv) биоконъюгат полисахаридного антигена O6A *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, при концентрации полисахарида, составляющей приблизительно 12-20, предпочтительно приблизительно 16 мкг/мл;

(v) биоконъюгат полисахаридного антигена O15 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, при концентрации полисахарида, составляющей приблизительно 12-20, предпочтительно приблизительно 16 мкг/мл;

(vi) биоконъюгат полисахаридного антигена O16 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, при концентрации полисахарида, составляющей приблизительно 12-20, предпочтительно приблизительно 16 мкг/мл;

(vii) биоконъюгат полисахаридного антигена O18A *E. coli* ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, при концентрации полисахарида, составляющей приблизительно 12-20, предпочтительно приблизительно 16 мкг/мл;

(viii) биоконъюгат полисахаридного антигена O25B *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, при концентрации полисахарида, составляющей приблизительно 28-36, предпочтительно приблизительно 32 мкг/мл; и

(ix) биоконъюгат полисахаридного антигена O75 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, при концентрации полисахарида, составляющей приблизительно 28-36, предпочтительно приблизительно 32 мкг/мл;

где белок-переносчик EPA-4 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, и

где полисахаридные антигены O1A, O2, O4, O6A, O15, O16, O18A, O25B и O75 характеризуются структурами формул (O1A), (O2), (O4-Glc+), (O6A), (O15), (O16), (O18A), (O25B) и (O75) соответственно, как показано в таблице 1, где каждое n независимо представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, более предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20.

[0181] В определенных вариантах осуществления такая композиция дополнительно содержит:

(x) биоконъюгат полисахаридного антигена O75 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, при концентрации полисахарида, составляющей приблизительно 12-20, предпочтительно приблизительно 16 мкг/мл;

где полисахаридный антиген O8 характеризуется структурой 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, более предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20.

[0182] В одном варианте осуществления предусмотрена композиция, содержащая биоконъюгат полисахаридного антигена O75 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, где полисахаридный антиген O75 имеет концентрацию, составляющую по меньшей мере приблизительно 32 мкг/мл.

[0183] В одном варианте осуществления предусмотрена композиция, содержащая:

(i) биоконъюгат полисахаридного антигена O1A *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, где полисахаридный антиген O1A *E. coli* характеризуется структурой формулы (O1A);

(ii) биоконъюгат полисахаридного антигена O2 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, где полисахаридный антиген O2 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O2);

(iii) биоконъюгат глюкозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, где глюкозилированный полисахаридный антиген O4 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O4-Glc+);

(iv) биоконъюгат полисахаридного антигена O6A *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, где полисахаридный антиген O6A *E. coli* характеризуется структурой формулы (O6A);

(v) биоконъюгат полисахаридного антигена O15 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, где полисахаридный антиген O15 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O15);

(vi) биоконъюгат полисахаридного антигена O16 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, где полисахаридный антиген O16 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O16);

(vii) биоконъюгат полисахаридного антигена O18A *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, где полисахаридный антиген O18A *E. coli* характеризуется структурой формулы (O18A);

(viii) биоконъюгат полисахаридного антигена O25B *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, где полисахаридный антиген O25B *E. coli* характеризуется структурой формулы (O25B); и

(ix) биоконъюгат полисахаридного антигена O75 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, где полисахаридный антиген O75 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O75);

где каждая из структур формул (O1A), (O2), (O4-Glc+), (O6A), (O15), (O16), (O18A), (O25B) и (O75) показана в таблице 1, где каждое n независимо представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, более предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20, где полисахаридные антигены *E. coli*, присутствующие в композиции, состоят из O1A, O2, O4-Glc+, O6A, O15, O16, O18A, O25B и O75. Предпочтительно белок-переносчик представляет собой детоксифицированный экзотоксин A *P. aeruginosa* (EPA-4), более предпочтительно EPA-4 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3. Предпочтительно отношение концентраций полисахаридного антигена O75 к полисахаридным антигенам O1A, O2 и/или O6A составляет от приблизительно 1,2:1 до приблизительно 8:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, более предпочтительно приблизительно 2:1. Предпочтительно полисахаридные антигены *E. coli*, присутствующие в композиции, состоят из O1A, O2, O4-Glc+, O6A, O15, O16, O18A, O25B и O75 при отношении 1:1:1:1:1:1:1:2:2.

[0184] В одном общем аспекте в данном документе предусмотрена композиция, содержащая полисахаридные антигены O75 и O6 E. coli, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, и где отношение концентраций полисахаридного антигена O75 к полисахаридному антигену O6 составляет от приблизительно 1,2:1 до приблизительно 8:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 2,5:1, более предпочтительно приблизительно 2:1.

[0185] В определенных вариантах осуществления композиция дополнительно содержит один или несколько, предпочтительно все, из полисахаридных антигенов O1,

O2, O4, O15, O16, O18, O25 E. coli, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком,
где предпочтительно антиген O1 представляет собой O1A, O4 является глюкозилированным, антиген O6 представляет собой O6A, антиген O18 представляет собой O18A, и антиген O25 представляет собой O25B.

[0186] В определенных вариантах осуществления
полисахаридный антиген O1 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O1A), показанной в таблице 1,
полисахаридный антиген O2 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O2), показанной в таблице 1,
полисахаридный антиген O4 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O4-Glc+), показанной в таблице 1,
полисахаридный антиген O6 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O6A), показанной в таблице 1,
полисахаридный антиген O15 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O15), показанной в таблице 1,
полисахаридный антиген O16 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O16), показанной в таблице 1,
полисахаридный антиген O18 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O18A), показанной в таблице 1,
полисахаридный антиген O25 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O25B), показанной в таблице 1, и
полисахаридный антиген O75 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O75), показанной в таблице 1,
где каждое n независимо представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20.

[0187] В определенных вариантах осуществления весовое отношение полисахаридных антигенов O1:O2:O4:O6:O15:O16:O18:O25:O75 *E. coli* составляет 1:1:1:1:1:1:1:2:2.

[0188] В определенных вариантах осуществления концентрация полисахаридного антигена O75 составляет от приблизительно 8 до приблизительно 50 мкг/мл, предпочтительно от 12 до 40 мкг/мл, например, 16-32 мкг/мл, предпочтительно приблизительно 32 мкг/мл.

[0189] В определенных вариантах осуществления композиция дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный полисахаридный антиген *E. coli*, ковалентно связанный с белком-переносчиком.

[0190] В конкретном варианте осуществления по меньшей мере один дополнительный полисахаридный антиген *E. coli* включает в себя полисахаридный антиген O8 с формулой (O8), показанной в таблице 1, где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20.

[0191] В определенных вариантах осуществления каждый белок-переносчик независимо выбран из группы, состоящей из детоксифицированного экзотоксина A P. aeruginosa (EPA), флагеллина (FliC) *E. coli*, CRM197, мальтоза-связывающего белка (MBP), дифтерийного анатоксина, столбнячного анатоксина, детоксифицированного гемолизина A S. aureus, фактора слипания A, фактора слипания B, термолабильного энтеротоксина *E. coli*, детоксифицированных вариантов термолабильного энтеротоксина *E. coli*, субъединицы B холерного токсина (CTB), холерного токсина, детоксифицированных вариантов холерного токсина, белка Sat *E. coli*, домена-пассажира белка Sat *E. coli*, пневмолизина Streptococcus pneumoniae, гемоцианина лимфы улитки (KLH), PcrV P. aeruginosa, белка наружной мембраны Neisseria meningitidis (OMPC) и белка D из нетипируемой Haemophilus influenzae.

[0192] В конкретном варианте осуществления белок-переносчик представляет собой детоксифицированный экзотоксин A Pseudomonas aeruginosa (EPA) или CRM197.

[0193] В определенных вариантах осуществления белок-переносчик содержит от 1 до 20, как, например, от 1 до 10 или от 2 до 4, консенсусных последовательностей гликозилирования, имеющих аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, предпочтительно консенсусных последовательностей, имеющих аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, наиболее предпочтительно белок-переносчик содержит четыре консенсусные последовательности гликозилирования.

[0194] В конкретном варианте осуществления каждый белок-переносчик представляет собой EPA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3.

[0195] В определенных вариантах осуществления полисахаридные антигены *E. coli* ковалентно связаны с белком-переносчиком посредством биоконъюгации или химической конъюгации. Химическая конъюгация может, например, включать

химический метод восстановительного аминирования (RAC), конъюгацию с одним концом, конъюгацию с (2-((2-оксоэтил)тио)этил)карбаматным спейсером (eTEC), химический метод цианилирования (CNBr, CDAP) со спейсером ADH или без него, тиоэфирный химический метод (с использованием малеимидного/бромацетильного линкера) или химический метод с использованием EDC-N-гидроксисукцинимидного линкера нулевой длины.

[0196] В определенных вариантах осуществления полисахаридные антигены *E. coli* ковалентно связаны с белком-переносчиком посредством биоконъюгации, предпочтительно полисахарид ковалентно связан с остатком Asn в участке гликозилирования в белке-переносчике.

[0197] В другом аспекте в данном документе предусмотрена композиция, содержащая биоконъюгат полисахаридного антигена O1A *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком детоксифицированного экзотоксина A P. aeruginosa (EPA-4), где полисахаридный антиген O1A *E. coli* характеризуется структурой формулы (O1A);

биоконъюгат полисахаридного антигена O2 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, где полисахаридный антиген O2 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O2);

биоконъюгат глюкозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, где глюкозилированный полисахаридный антиген O4 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O4-Glc+);

биоконъюгат полисахаридного антигена O6A *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, где полисахаридный антиген O6A *E. coli* характеризуется структурой формулы (O6A);

биоконъюгат полисахаридного антигена O15 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, где полисахаридный антиген O15 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O15);

биоконъюгат полисахаридного антигена O16 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, где полисахаридный антиген O16 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O16);

биоконъюгат полисахаридного антигена O18A *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, где полисахаридный антиген O18A *E. coli* характеризуется структурой формулы (O18A);

биоконъюгат полисахаридного антигена O25B *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, где полисахаридный антиген O25B *E. coli* характеризуется структурой формулы (O25B); и

биоконъюгат полисахаридного антигена O75 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, где полисахаридный антиген O75 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O75);

где EPA-4 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3,

где каждая из структур формул (O1A), (O2), (O4-Glc+), (O6A), (O15), (O16), (O18A), (O25B) и (O75) показана в таблице 1, где каждое n независимо представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, более предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20, и

где отношение полисахаридного антигена O75 к полисахаридному антигену O6A составляет от приблизительно 1,2:1 до приблизительно 8:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, более предпочтительно приблизительно 2:1.

[0198] В определенных вариантах осуществления композиция дополнительно содержит от 1 до 15 дополнительных полисахаридных антигенов *E. coli*, каждый из которых независимо ковалентно связан с белком-переносчиком.

[0199] В определенных вариантах осуществления композиция содержит биоконъюгат глюкозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, где глюкозилированный полисахаридный антиген O4 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O4-Glc+), показанной в таблице 1, где n представляет собой целое число от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20, где биоконъюгат глюкозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, был получен в клетке *E. coli*, которая содержит:

(i) нуклеотидную последовательность кластера генов rfb для полисахаридного антигена O4 *E. coli*;

(ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую глюкозилтрансферазу, характеризующуюся по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4, где глюкозилтрансфераза способна модифицировать полисахаридный антиген O4 *E. coli* с получением глюкозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*;

(iii) нуклеотидные последовательности, кодирующие транслоказу и гликозилтрансферазу, характеризующиеся по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 7 и 8 соответственно, где транслоказа способна к транслокации глюкозы, связанной с бактопренолом, а гликозилтрансфераза способна к глюкозилированию бактопренола;

(iv) нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-переносчик; и

(v) нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу, способную к ковалентному связыванию глюкозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli* с белком-переносчиком, где предпочтительно олигосахарилтрансфераза представляет собой PglB из Campylobacter jejuni.

[0200] В определенных вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, дополнительно содержат консервант, такой как производное ртути тимеросал. В конкретном варианте осуществления фармацевтические композиции, описанные в данном документе, содержат от 0,001% до 0,01% тимеросала. В других вариантах осуществления фармацевтические композиции, описанные в данном документе, не содержат консервант.

[0201] В определенных вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе (например, иммуногенные композиции), содержат адъювант или вводятся в комбинации с ним. Адъювант для введения в комбинации с композицией, описанной в данном документе, может вводиться до введения (например, в пределах 72 часов, 48 часов, 24 часов, 12 часов, 6 часов, 2 часов, 1 часа, 10 минут), одновременно с введением или после введения (например, в рамках 72 часов, 48 часов, 24 часов, 12 часов, 6 часов, 2 часов, 1 часа, 10 минут) указанной композиции. В некоторых вариантах осуществления термин "адъювант" относится к соединению, которое при введении в сочетании с композицией, описанной в данном документе, или в качестве ее части повышает, усиливает и/или стимулирует иммунный ответ на биоконъюгат, однако при введении адъюванта в отдельности иммунный ответ на биоконъюгат не формируется. В некоторых вариантах осуществления адъювант вызывает иммунный ответ на биоконъюгированный пептид и не вызывает аллергии или другой побочной реакции. Адъюванты усиливают иммунный ответ посредством нескольких механизмов, включая, например, привлечение лимфоцитов, стимуляцию B- и/или T-клеток и стимуляцию макрофагов. В определенных предпочтительных вариантах

осуществления композиции, описанные в данном документе, не содержат адъювант помимо биоконъюгатов и/или не вводятся в комбинации с адъювантом помимо биоконъюгатов (в случае если биоконъюгаты будут характеризоваться некоторыми внутренне присущими свойствами адъювантов, они не будут приниматься во внимание, и в этих вариантах осуществления не будет добавляться внешний адъювант).

[0202] Примеры подходящих адъювантов включают без ограничения соли алюминия (квасцы) (такие как гидроксид алюминия, фосфат алюминия, сульфат алюминия и оксид алюминия, включая наночастицы, содержащие составы квасцов или наноквасцов), фосфат кальция, монофосфориллипид A (MPL) или 3-де-O-ацилированный монофосфориллипид A (3D-MPL) (см., например, 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), имидазохиноксалиновые соединения (см. WO2007/109813), дельта-инулин, STING-активирующие синтетические циклические динуклеотиды (например, US20150056224), комбинации гомополимеров лецитина и карбомера (например, US6676958) и сапонины, такие как QuilA и QS21 (см., например, Zhu D and W Tuo, 2016, Nat Prod Chem Res 3: e113, Matrix M, Iscoms, Iscomatrix и т. д., необязательно в комбинации с QS7 (см. Kensil *et al.*, в Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); патент США № 5057540). В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой адъювант Фрейнда (полный или неполный). Другие адъюванты представляют собой эмульсии типа "масло в воде" (такие как сквален или арахисовое масло), необязательно в комбинации с иммуностимуляторами, такими как монофосфориллипид A (см. Stoute *et al.*, N. Engl. J. Med. 336, 86-91 (1997)). Другой адъювант представляет собой CpG. Дополнительными примерами адъювантов являются липосомы, содержащие иммуностимуляторы, такие как MPL и QS21, такие как в AS01E и AS01B (например, US 2011/0206758). Другими примерами адъювантов являются имидазохинолины (такие как имиквимод и R848). См., например, Reed G, et al., 2013, *Nature Med*, 19: 1597-1608. В определенных вариантах осуществления адъювант содержит агонист толл-подобного рецептора 4 (TLR4). Агонисты TLR4 хорошо известны из уровня техники, см., например, Ireton GC и SG Reed, 2013, Expert Rev Vaccines 12: 793-807. В определенных вариантах осуществления адъювант содержит агонист TLR4, содержащий липид A или его аналог

или производное, такой как MPL, 3D-MPL, RC529 (например, EP1385541), PET-липид A, GLA (гликопиранозиллипидный адъювант, синтетический дисахарид-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 к оптимизации лигандов TLR4 для человеческих вакцин), PHAD (фосфорилированный гексаацилдисахарид), 3D-PHAD (структура которого такая же, как у GLA), 3D-(6-ацил)-PHAD (3D(6A)-PHAD) (PHAD, 3D-PHAD и 3D(6A)PHAD представляют собой синтетические варианты липида A, см., например, avantilipids.com/divisions/adjuvants, где также представлены структуры этих молекул), E6020 (номер CAS 287180-63-6), ONO4007, OM-174 и т. п.

[0203] В определенных вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, не содержат адъювант и не вводятся в комбинации с ним.

[0204] В некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, составлены так, чтобы они подходили для определенного пути введения субъекту. Например, композиции, описанные в данном документе, могут быть составлены таким образом, чтобы они подходили для подкожного, парентерального, перорального, внутрикожного, чрескожного, колоректального, внутрибрюшинного и ректального введения. В конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция может быть составлена для внутривенного, перорального, внутрибрюшинного, интраназального, интратрахеального, подкожного, внутримышечного, местного, внутрикожного, чрескожного или легочного введения. В определенных вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, вводятся посредством внутримышечной инъекции.

[0205] В определенных вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, дополнительно содержат один или несколько буферов, например, забуференный Tris физиологический раствор, фосфатный буфер или сахарозо-фосфатно-глутаматный буфер.

[0206] В определенных вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, дополнительно содержат одну или несколько солей, например, трис-гидрохлорид, хлорид натрия, хлорид кальция, хлорид калия, фосфат натрия, глутамат натрия или соли алюминия (например, гидроксид алюминия, фосфат алюминия, квасцы (алюмосульфат калия) или смесь таких солей алюминия).

[0207] Композиции, описанные в данном документе, могут быть включены в контейнер, упаковку или дозатор вместе с инструкциями по введению.

[0208] Композиции, описанные в данном документе, можно хранить перед применением, например, композиции можно хранить в замороженном виде (например, при приблизительно -20°C или при приблизительно -70°C); хранить в условиях охлаждения (например, при приблизительно 4°C) или хранить при комнатной температуре.

[0209] В одном аспекте в настоящем изобретении также предусмотрены способы получения композиций в соответствии с настоящим изобретением, включающие получение каждого из требуемых конъюгатов О-антигена (например, путем их получения или изготовления, например, в форме лекарственных субстанций) и их смешивание в требуемых отношениях и/или количествах с получением композиции по настоящему изобретению (например, поливалентной вакцинной композиции против *E. coli*, в частности ExPEC, иногда называемой лекарственным продуктом).

Способы индуцирования иммунного ответа

[0210] Биоконъюгаты и композиции, предусмотренные в данном документе, могут применяться для индукции антител к О-антигену *E. coli* у субъекта или для вакцинации субъекта против *E. coli*. Способы индуцирования иммунного ответа у субъекта, описанные в данном документе, приводят к вакцинации субъекта против инфекции, вызываемой штаммами ExPEC, О-антигены которых присутствуют в композиции(композициях). При использовании подтипа О-антигена посредством способа по настоящему изобретению можно также индуцировать иммунный ответ на другой подтип О-антигена, характеризующийся аналогичной антигенностью. Примерами являются перекрестная реактивность между подсеротипами, например, иммунизация с помощью антигена O25B индуцирует антитела, которые распознают O-LPS обоих из серотипов O25B и O25A, а иммунизация глюкозилированным O4 индуцирует антитела, которые распознают O-LPS серотипов как глюкозилированного O4, так и неглюкозилированного O4, и в других примерах также может предусматриваться перекрестная иммунизация, направленная против других серотипов, которые имеют разные О-антигены, однако все же обладают некоторым сходством в антигенных структурах (например, некоторые сыворотки, по-видимому, перекрестно реагируют в исследованиях по серотипированию).

[0211] В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком. В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком, у которого имеется

инфекция, вызываемая ExPEC, или инвазивное заболевание, вызываемое ExPEC, или который подвержен риску их наличия.

[0212] В некоторых вариантах осуществления инвазивное заболевание, вызываемое ExPEC, включает сепсис. В некоторых вариантах осуществления инвазивное заболевание, вызываемое ExPEC, включает бактериемию. В некоторых вариантах осуществления инвазивное заболевание, вызываемое ExPEC, включает одну или несколько из инфекции мочевыводящих путей, инфекции в участке хирургического вмешательства, абдоминальной или тазовой инфекции, пневмонии, остеомиелита, целлюлита, сепсиса, бактериемии, раневой инфекции, пиелонефрита, менингита, перитонита, холангита, инфекции мягких тканей, пиомиозита, септического артрита, эндофтальмита, гнойного тиреоидита, синусита, эндокардита и простатита.

[0213] В определенных вариантах осуществления иммунный ответ, индуцированный у субъекта после введения композиции, описанной в данном документе, ограничивает тяжесть инвазивного заболевания, вызываемого ExPEC, у субъекта или предупреждает его. В одном варианте осуществления у субъекта имеется инфекция, вызванная *E. coli* (например, ExPEC), на момент введения. В предпочтительном варианте осуществления у субъекта отсутствует инфекция, вызванная *E. coli* (например, ExPEC), на момент введения.

[0214] В определенных вариантах осуществления иммунный ответ, индуцированный у субъекта после введения композиции, описанной в данном документе, является эффективным для предупреждения или ослабления симптома, обусловленного инфекцией, вызываемой ExPEC, предпочтительно у по меньшей мере 30%, более предпочтительно у по меньшей мере 40%, как, например, по меньшей мере 50% субъектов, которым вводили композицию. Симптомы инфекции, вызываемой ExPEC, могут варьироваться в зависимости от характера инфекции и могут включать без ограничения: дизурию, учащенное мочеиспускание или неотложные позывы к мочеиспусканию, пиурию, гематурию, боль в спине, боль в области таза, боль при мочеиспускании, лихорадку, озноб и/или тошноту (например, у субъектов, у которых имеется инфекция мочевыводящих путей, вызванная ExPEC); высокую температуру, головную боль, ригидность затылочных мышц, тошноту, рвоту, судороги, сонливость и/или чувствительность к свету (например, у субъектов с менингитом, вызванным ExPEC); лихорадку, учащенный пульс, учащенное дыхание, сниженный диурез, сниженное количество тромбоцитов, боль в животе, затрудненное дыхание и/или нарушенную функцию сердца (например, у субъектов с сепсисом, вызванным ExPEC).

[0215] В определенных вариантах осуществления иммунный ответ, индуцированный у субъекта после введения композиции, описанной в данном документе, является эффективным для снижения вероятности госпитализации субъекта, страдающего инфекцией, вызываемой ExPEC. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ, индуцированный у субъекта после введения композиции, описанной в данном документе, является эффективным для сокращения продолжительности госпитализации субъекта, страдающего инфекцией, вызываемой ExPEC.

[0216] В определенных вариантах осуществления вакцинация с помощью композиции по настоящему изобретению предназначена для предупреждения инвазивного заболевания, вызываемого ExPEC (IED), например, уросепсиса, бактериемии, сепсиса и т. д. В определенных вариантах осуществления вакцинация предназначена для предупреждения или снижения вероятности возникновения или тяжести инфекций мочевыводящих путей. В определенных вариантах осуществления IED может являться внутрибольничным, например, у пациентов, подвергающихся урогенитальным и/или абдоминальным процедурам или хирургическим операциям. В определенных вариантах осуществления IED может быть связано с оказанием медицинской помощи, например, у пациентов, получающих медицинскую помощь по поводу другого состояния, например, через центральные венозные катетеры, катетеры и т. д., например, в больнице, амбулаторном хирургическом центре, учреждении для пациентов с терминальной стадией почечной недостаточности, стационарном учреждении длительного ухода и т. д. В определенных вариантах осуществления IED может являться внебольничным, например, у пациента, который за недавнее время не подвергался рискам в отношении здоровья.

[0217] В некоторых вариантах осуществления способ индуцирования иммунного ответа на внекишечную патогенную *E. coli* (ExPEC) у субъекта включает введение субъекту композиции, описанной в данном документе.

[0218] В некоторых вариантах осуществления способ индуцирования иммунного ответа на внекишечную патогенную *E. coli* (ExPEC) у субъекта включает введение субъекту первого эффективного количества полисахаридного антигена O75 *E. coli* и второго эффективного количества полисахаридного антигена O6 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, и где отношение первого эффективного количества ко второму эффективному количеству составляет от приблизительно 1,2:1 до приблизительно 8:1,

предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, например, приблизительно 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1, 2,0:1, 2,1:1, 2,2:1, 2,3:1, 2,4:1, 2,5:1, более предпочтительно приблизительно 2:1. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления полисахаридный антиген O75, ковалентно связанный с белком-переносчиком, и полисахаридный антиген O6, ковалентно связанный с белком-переносчиком, вводят в виде одной композиции. В некоторых альтернативных вариантах осуществления полисахаридный антиген O75, ковалентно связанный с белком-переносчиком, и полисахаридный антиген O6, ковалентно связанный с белком-переносчиком, вводят в виде комбинации отдельных композиций.

[0219] В некоторых вариантах осуществления способ индуцирования иммунного ответа на внекишечную патогенную *E. coli* (ExPEC) у субъекта дополнительно включает введение субъекту одного или нескольких, предпочтительно всех, из полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O15, O16, O18, O25 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком. Предпочтительно антиген O1 представляет собой O1A, антиген O4 представляет собой глюкозилированный полисахаридный антиген O4, антиген O6 представляет собой O6A, антиген O18 представляет собой O18A, и антиген O25 представляет собой O25B. Предпочтительно антигены O1, O2, O4, O6, O15, O16, O18, O25 и O75 соответственно имеют структуры формул (O1A), (O2), (O4-Glc+), (O6A), (O15), (O16), (O18A), (O25B) и (O75), как показано в таблице 1, где каждое n независимо представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20. В соответствии с настоящим изобретением отношение полисахаридного антигена O75 к полисахаридному антигену O6 составляет от приблизительно 1,2:1 до приблизительно 8:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, более предпочтительно приблизительно 2:1. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту от 1 до 15 дополнительных полисахаридных антигенов *E. coli*, каждый из которых независимо ковалентно связан с белком-переносчиком. В определенных вариантах осуществления такие дополнительные антигены *E. coli* содержат полисахаридный антиген O8, предпочтительно имеющий 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, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20. Предпочтительно каждый полисахаридный антиген *E. coli*, ковалентно связанный с белком-переносчиком,

представляет собой биоконъюгат. В некоторых вариантах осуществления биоконъюгаты вводят в виде одной композиции. В некоторых вариантах осуществления биоконъюгаты вводят в виде комбинации двух или более отдельных композиций. Предпочтительно ограничивать количество отдельных введений, поэтому предпочтительным является применение отдельных композиций, содержащих большую часть антигенов или все антигены.

[0220] В одном варианте осуществления предусмотрен способ введения композиции для индуцирования иммунного ответа на *E. coli*, предпочтительно внекишечную патогенную *E. coli* (ExPEC), где композиция содержит биоконъюгат полисахаридного антигена O75 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, и где концентрация вводимого полисахаридного антигена O75 составляет по меньшей мере 16 мкг на дозу.

[0221] В некоторых вариантах осуществления способ индуцирования иммунного ответа на внекишечную патогенную *E. coli* (ExPEC) у субъекта включает введение субъекту первого эффективного количества полисахаридного антигена O75 *E. coli* и второго эффективного количества полисахаридного антигена O1 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, и где отношение первого эффективного количества ко второму эффективному количеству составляет от приблизительно 1,2:1 до приблизительно 8:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, например, приблизительно 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1, 2,0:1, 2,1:1, 2,2:1, 2,3:1, 2,4:1, 2,5:1, более предпочтительно приблизительно 2:1. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления полисахаридный антиген O75, ковалентно связанный с белком-переносчиком, и полисахаридный антиген O1, ковалентно связанный с белком-переносчиком, вводят в виде одной композиции. В некоторых альтернативных вариантах осуществления полисахаридный антиген O75, ковалентно связанный с белком-переносчиком, и полисахаридный антиген O1, ковалентно связанный с белком-переносчиком, вводят в виде комбинации композиций. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту одного или нескольких, предпочтительно всех, из полисахаридных антигенов O2, O4, O6, O15, O16, O18, O25 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком. Предпочтительно антиген O1 представляет собой O1A, антиген O4 представляет собой глюкозилированный полисахаридный антиген O4, антиген O6 представляет собой O6A, антиген O18 представляет собой

O18A, и антиген O25 представляет собой O25B. Предпочтительно антигены O1, O2, O4, O6, O15, O16, O18, O25 и O75 соответственно имеют структуры формул (O1A), (O2), (O4-Glc+), (O6A), (O15), (O16), (O18A), (O25B) и (O75), как показано в таблице 1, где каждое n независимо представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20. В соответствии с настоящим изобретением отношение полисахаридного антигена O75 к полисахаридному антигену O1 составляет от приблизительно 1,2:1 до приблизительно 8:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, более предпочтительно приблизительно 2:1. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту от 1 до 15 дополнительных полисахаридных антигенов *E. coli*, каждый из которых независимо ковалентно связан с белком-переносчиком. В определенных вариантах осуществления такие дополнительные антигены *E. coli* содержат полисахаридный антиген O8, предпочтительно имеющий 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, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20. Предпочтительно каждый полисахаридный антиген *E. coli*, ковалентно связанный с белком-переносчиком, представляет собой биоконъюгат. В некоторых вариантах осуществления биоконъюгаты вводят в виде одной композиции. В некоторых вариантах осуществления биоконъюгаты вводят в виде комбинации двух или более отдельных композиций. Предпочтительно ограничивать количество отдельных введений, поэтому предпочтительным является применение отдельных композиций, содержащих большую часть антигенов или все антигены.

[0222] В некоторых вариантах осуществления способ индуцирования иммунного ответа на внекишечную патогенную *E. coli* (ExPEC) у субъекта включает введение субъекту первого эффективного количества полисахаридного антигена O75 *E. coli* и второго эффективного количества полисахаридного антигена O2 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, и где отношение первого эффективного количества ко второму эффективному количеству составляет от приблизительно 1,2:1 до приблизительно 8:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, например, приблизительно 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1, 2,0:1, 2,1:1, 2,2:1, 2,3:1, 2,4:1, 2,5:1, более предпочтительно приблизительно 2:1. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления полисахаридный антиген O75, ковалентно связанный с белком-

переносчиком, и полисахаридный антиген O2, ковалентно связанный с белком-переносчиком, вводят в виде одной композиции. В некоторых альтернативных вариантах осуществления полисахаридный антиген O75, ковалентно связанный с белком-переносчиком, и полисахаридный антиген O2, ковалентно связанный с белком-переносчиком, вводят в виде комбинации композиций. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту одного или нескольких, предпочтительно всех, из полисахаридных антигенов O1, O4, O6, O15, O16, O18, O25 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком. Предпочтительно антиген O1 представляет собой O1A, антиген O4 представляет собой глюкозилированный полисахаридный антиген O4, антиген O6 представляет собой O6A, антиген O18 представляет собой O18A, и антиген O25 представляет собой O25B. Предпочтительно антигены O1, O2, O4, O6, O15, O16, O18, O25 и O75 соответственно имеют структуры формул (O1A), (O2), (O4-Glc+), (O6A), (O15), (O16), (O18A), (O25B) и (O75), как показано в таблице 1, где каждое n независимо представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20. В соответствии с настоящим изобретением отношение полисахаридного антигена O75 к полисахаридному антигену O2 составляет от приблизительно 1,2:1 до приблизительно 8:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, более предпочтительно приблизительно 2:1. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту от 1 до 15 дополнительных полисахаридных антигенов *E. coli*, каждый из которых независимо ковалентно связан с белком-переносчиком. Предпочтительно каждый полисахаридный антиген *E. coli*, ковалентно связанный с белком-переносчиком, представляет собой биоконъюгат. В некоторых вариантах осуществления биоконъюгаты вводят в виде одной композиции. В некоторых вариантах осуществления биоконъюгаты вводят в виде комбинации двух или более отдельных композиций. Предпочтительно ограничивать количество отдельных введений, поэтому предпочтительным является применение отдельных композиций, содержащих большую часть антигенов или все антигены.

[0223] В некоторых вариантах осуществления способ индуцирования иммунного ответа на внекишечную патогенную *E. coli* (ExPEC) у субъекта включает введение субъекту первого эффективного количества полисахаридного антигена O75 *E. coli* и второго эффективного количества полисахаридного антигена O25 *E. coli*, где каждый

из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, и где отношение первого эффективного количества ко второму эффективному количеству составляет от приблизительно 1:4 до 1:0,5, предпочтительно от приблизительно 1:2 до 1:1, например, более предпочтительно приблизительно 1:1, например, приблизительно 1:1,5, 1:1,4, 1:1,3, 1:1,2, 1:1,1, 1:1,0, 1:0,9, 1:0,8, 1:0,7, 1:0,6 или 1:0,5. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления полисахаридный антиген O75, ковалентно связанный с белком-переносчиком, и полисахаридный антиген O25, ковалентно связанный с белком-переносчиком, вводят в виде одной композиции. В некоторых альтернативных вариантах осуществления полисахаридный антиген O75, ковалентно связанный с белком-переносчиком, и полисахаридный антиген O25, ковалентно связанный с белком-переносчиком, вводят в виде комбинации композиций. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту одного или нескольких, предпочтительно всех, из полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O6, O15, O16, O18 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком. Предпочтительно антиген O1 представляет собой O1A, антиген O4 представляет собой глюкозилированный полисахаридный антиген O4, антиген O6 представляет собой O6A, антиген O18 представляет собой O18A, и антиген O25 представляет собой O25B. Предпочтительно антигены O1, O2, O4, O6, O15, O16, O18, O25 и O75 соответственно имеют структуры формул (O1A), (O2), (O4-Glc+), (O6A), (O15), (O16), (O18A), (O25B) и (O75), как показано в таблице 1, где каждое n независимо представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20. В соответствии с настоящим изобретением отношение полисахаридного антигена O75 к полисахаридному антигену O25 составляет от приблизительно 1:4 до приблизительно 1:0,5, предпочтительно от приблизительно 1:2 до 1:1, более предпочтительно приблизительно 1:1. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту от 1 до 15 дополнительных полисахаридных антигенов *E. coli*, каждый из которых независимо ковалентно связан с белком-переносчиком. В определенных вариантах осуществления такие дополнительные антигены *E. coli* содержат полисахаридный антиген O8, предпочтительно имеющий 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, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20. Предпочтительно каждый полисахаридный антиген *E. coli*, ковалентно связанный с

белком-переносчиком, представляет собой биоконъюгат. В некоторых вариантах осуществления биоконъюгаты вводят в виде одной композиции. В некоторых вариантах осуществления биоконъюгаты вводят в виде комбинации двух или более отдельных композиций. Предпочтительно ограничивать количество отдельных введений, поэтому предпочтительным является применение отдельных композиций, содержащих большую часть антигенов или все антигены.

[0224] В определенных вариантах осуществления композиции, комбинации и биоконъюгаты, описанные в данном документе, могут вводиться субъекту для индуцирования иммунного ответа, который включает выработку антител, предпочтительно антител, обладающих опсонофагоцитарной активностью. Такие антитела могут быть выделены с применением методик, известных специалисту в данной области (например, иммуноаффинной хроматографии, центрифугирования, преципитации и т. д.).

[0225] Способность биоконъюгатов и композиций, описанных в данном документе, вызывать иммунный ответ у субъекта можно оценить с применением любого подхода, известного специалистам в данной области или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способность биоконъюгата вызывать иммунный ответ у субъекта можно оценить путем иммунизации субъекта (например, мыши, крысы, кролика или обезьяны) или группы субъектов с помощью биоконъюгата, описанного в данном документе, и иммунизации дополнительного субъекта (например, мыши, крысы, кролика или обезьяны) или группы субъектов с помощью контроля (например, PBS). Субъекты или группа субъектов могут быть впоследствии заражены ExPEC, и может быть определена способность ExPEC вызывать заболевание (например, UTI, бактериемию или другое заболевание) у субъектов или группы субъектов. Специалистам в данной области будет понятно, что если субъект или группа субъектов, иммунизированных с помощью контроля, страдает(страдают) заболеванием после заражения ExPEC, однако субъект или группа субъектов, иммунизированных с помощью биоконъюгата(биоконъюгатов) или композиции на их основе, описанных в данном документе, страдают заболеванием меньше или не страдают им вовсе, тогда биоконъюгат способен вызывать иммунный ответ у субъекта. Способность биоконъюгата(биоконъюгатов) или композиции на их основе, описанных в данном документе, индуцировать образование антисыворотки, которая перекрестно реагирует с О-антигеном из ExPEC, можно протестировать, например, посредством

иммуноанализа, такого как ELISA (см., например, Van den Dobbelsteen et al, 2016, Vaccine 34: 4152-4160) или иммуноанализ на основе ECL.

[0226] Например, способность биоконъюгатов, описанных в данном документе, вызывать иммунный ответ у субъекта можно оценить посредством анализа бактерицидной активности сыворотки крови (SBA) или анализа опсонофагоцитарного уничтожения (анализа OPK или OPKA), который представляет собой установленный и принятый способ, который применяется для получения одобрения вакцин на основе гликоконъюгатов. Такие анализы хорошо известны из уровня техники и, вкратце, включают стадии создания и выделения антител к мишени, представляющей интерес (например, полисахаридному О-антигену, например, полисахаридному антигену O75 *E. coli*), путем введения субъекту (например, мыши, крысе, кролику или обезьяне) соединения, которое вызывает выработку таких антител. Впоследствии бактерицидную способность антител можно оценивать, например, путем культивирования рассматриваемых бактерий (например, *E. coli* соответствующего серотипа) в присутствии антител и комплемента и, в зависимости от анализа, нейтрофильных клеток и анализа способности антител опосредовать уничтожение и/или нейтрализацию бактерий, например, с применением стандартных микробиологических подходов. В отношении примера анализа OPK для биоконъюгированных вакцин против *E. coli* см., например, Abbanat et al, 2017, Clin. Vaccine Immunol. 24: e00123-17. Анализ OPK можно выполнять в моноплексном или мультиплексном формате, из которых мультиплексный формат (например, одновременное тестирование нескольких серотипов), как правило, является предпочтительным. Мультиплексный анализ OPK иногда упоминается в данном документе как "MOPA".

[0227] В конкретных вариантах осуществления, где композиция, предусмотренная в данном документе, содержит биоконъюгат полисахаридного антигена O75 *E. coli* и по меньшей мере биоконъюгат полисахаридного антигена O6A *E. coli*, эффективное количество полисахаридного антигена O75 *E. coli* в приблизительно 1,2-8 раз выше, например, в приблизительно 2-4 раза выше, например, в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 раз выше, чем концентрация любого другого биоконъюгата, присутствующего в композиции. В таких вариантах осуществления эффективное количество полисахаридного антигена O75 *E. coli* составляет, например, от приблизительно 5 до 18 мкг на введение, как, например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 мкг на введение. Предпочтительно за введение вводят приблизительно 8-16 мкг полисахаридного антигена O75.

[0228] В определенных вариантах осуществления композицию, описанную в данном документе, вводят субъекту в комбинации с одним или несколькими другими средствами терапии (например, противобактериальными или иммуномодулирующими средствами терапии). Одно или несколько других средств терапии могут быть полезными в лечении или предупреждении инфекции, вызываемой ExPEC, или могут облегчать симптом или состояние, ассоциированные с инфекцией, вызываемой ExPEC. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других средств терапии представляют собой обезболивающие или жаропонижающие препараты. В определенных вариантах осуществления терапевтические средства вводят с интервалом от менее чем 5 минут до менее чем 1 недели. Любые противобактериальные средства, известные специалисту в данной области (например, антибиотики), могут применяться в комбинации с композицией, описанной в данном документе.

[0229] В определенных вариантах осуществления биоконъюгат или композиция по настоящему изобретению вводятся субъекту однократно. В определенных вариантах осуществления биоконъюгат или композиция по настоящему изобретению вводятся субъекту более чем один раз, например, в режиме прайм-буст. В определенных вариантах осуществления время между двумя введениями составляет по меньшей мере две недели, по меньшей мере один месяц, 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 требуемый иммунный ответ, как правило, может быть вызван однократным введением биоконъюгата или композиции в соответствии с настоящим изобретением. В определенных вариантах осуществления предусмотрено повторное введение, например, через десять лет.

[0230] Композиции, предусмотренные в данном документе, можно применять для индуцирования антител к О-антигенам *E. coli* у субъекта и для вакцинации субъекта против *E. coli*, в частности внекишечной патогенной *E. coli* (ExPEC). Как используется в данном документе, "субъект" означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, которому будут вводить или вводили биоконъюгат или композицию, предусмотренные 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, отличных от человека (NHP), таких как

нечеловекообразные обезьяны или человекообразные обезьяны, людей и т. д. В определенных вариантах осуществления субъект является человеком. Субъект-человек может быть любого возраста. В определенных вариантах осуществления субъект является человеком в возрасте от приблизительно двух месяцев до приблизительно 18 лет, например, в возрасте от 1 года до 18 лет. В определенных вариантах осуществления субъект является человеком в возрасте по меньшей мере 18 лет. В определенных вариантах осуществления субъект является человеком в возрасте от 15 до 50 лет, например, в возрасте от 18 до 45 лет, например, в возрасте от 20 до 40 лет. В определенных вариантах осуществления субъект является человеком мужского пола. В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком женского пола. В определенных вариантах осуществления субъект имеет ослабленный иммунитет. В определенных вариантах осуществления субъект является человеком в возрасте по меньшей мере 50 лет, по меньшей мере 55 лет, по меньшей мере 60 лет, по меньшей мере 65 лет. В определенных вариантах осуществления субъект является человеком, который 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 определенных вариантах осуществления субъект является человеком в возрасте по меньшей мере 60 лет и не старше чем 85 лет. В определенных вариантах осуществления субъект является человеком со стабильным состоянием здоровья. В определенных вариантах осуществления субъект является взрослым человеком в возрасте от 60 до не более чем 85 лет со стабильным состоянием здоровья. В определенных вариантах осуществления субъект является человеком, у которого в анамнезе имеется инфекция мочевыводящих путей (UTI, т. е. бактериальная инфекция уретры, мочевого пузыря, мочеточников и/или почек; в некоторых вариантах осуществления это включает пиелонефрит), т. е. имелся хотя бы один эпизод UTI в его или ее жизни. В определенных вариантах осуществления субъект является человеком, у которого в анамнезе имеется UTI за последние двадцать, пятнадцать, двенадцать, десять, девять, восемь, семь, шесть, пять, четыре, три, два или один год. В определенных вариантах осуществления субъект является человеком, у которого в анамнезе имеется UTI за последние два года. В определенных вариантах осуществления субъект является человеком, у которого в анамнезе имеется рецидивирующая UTI, т. Е. имелись по меньшей мере две UTI в течение шести месяцев или по меньшей мере три UTI в течение одного года. В определенных вариантах осуществления субъект является субъектом-человеком, у которого в анамнезе имеется рецидивирующая UTI в течение последних двух лет. В определенных вариантах

осуществления субъект является человеком в возрасте 60 лет или старше со стабильным состоянием здоровья. В определенных вариантах осуществления субъект является человеком в возрасте 60 лет или старше, у которого в анамнезе имеется UTI за последние два года. В определенных вариантах осуществления субъект является человеком в возрасте по меньшей мере 60 лет или менее чем 75 лет, у которого в анамнезе имеется UTI за последние два года. В определенных вариантах осуществления субъект является субъектом-человеком в возрасте 75 лет или старше, у которого в анамнезе имеется UTI за последние два года. В определенных вариантах осуществления субъект является пациентом, у которого запланировано проведение плановых урогенитальных и/или абдоминальных процедур или хирургических операций, например, трансректальная пункционная биопсия предстательной железы под ультразвуковым контролем (TRUS-PNB). В определенных вариантах осуществления субъект является человеком, у которого в анамнезе имеется простатит, в том числе без ограничения острый бактериальный простатит (ABP), т. е. бактериальная инфекция предстательной железы, т. е. у которого имелся по меньшей мере один эпизод простатита в его жизни, например, за последние десять, девять, восемь, семь, шесть, пять, четыре, три, два или один год.

[0231] В предпочтительных вариантах иммунный ответ, индуцированный композициями или способами индуцирования иммунного ответа в соответствии с настоящим изобретением, предусматривает антитела, характеризующиеся опсонофагоцитарной активностью. Было показано, что композиции, содержащие полисахаридные О-антигены *E. coli*, ковалентно связанные с белком-переносчиком (т. е. гликоконъюгаты О-антигенов *E. coli*), могут индуцировать этот тип функциональных антител у людей, и при этом было показано, что такие антитела опосредуют уничтожение бактерий *in vivo* и посредством этого механизма могут защищать от инфекций, вызываемых *E. coli*.

[0232] В другом аспекте в данном документе предусмотрен способ индуцирования иммунного ответа на *E. coli*, предпочтительно внекишечную патогенную *E. coli* (ExPEC), у субъекта, включающий введение субъекту композиции, описанной в данном документе.

[0233] В другом аспекте в данном документе предусмотрен способ вакцинации субъекта против *E. coli*, предпочтительно внекишечной патогенной *E. coli* (ExPEC), включающий введение субъекту композиции, описанной в данном документе. В определенных аспектах в данном документе предусмотрена композиция, описанная в

данном документе, для применения в индуцировании антител к *E. coli*, предпочтительно ExPEC. В определенных аспектах в данном документе предусмотрена композиция, описанная в данном документе, для применения в вакцинации против *E. coli*, предпочтительно ExPEC. В определенных аспектах в данном документе предусмотрено применение композиции, описанной в данном документе, для изготовления лекарственного препарата для индуцирования у субъекта антител к *E. coli*, предпочтительно ExPEC. В определенных аспектах в данном документе предусмотрено применение композиции, описанной в данном документе, для изготовления лекарственного препарата для вакцинации субъекта против *E. coli*, предпочтительно ExPEC.

[0234] В определенных аспектах в данном документе предусмотрена композиция, описанная в данном документе, для применения в способе индуцирования у субъекта иммунного ответа на *E. coli*, предпочтительно внекишечную патогенную *E. coli* (ExPEC). В определенных аспектах в данном документе предусмотрено применение композиции, описанной в данном документе, в изготовлении лекарственного препарата для индуцирования у субъекта иммунного ответа на *E. coli*, предпочтительно внекишечную патогенную *E. coli* (ExPEC).

[0235] В другом аспекте в данном документе предусмотрен способ индуцирования иммунного ответа на *E. coli*, предпочтительно внекишечную патогенную *E. coli* (ExPEC), у субъекта, включающий введение субъекту первого эффективного количества полисахаридного антигена O75 *E. coli* и второго эффективного количества полисахаридного антигена O6 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, и где отношение первого эффективного количества ко второму эффективному количеству составляет от приблизительно 1,2:1 до приблизительно 8:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, более предпочтительно приблизительно 2:1.

[0236] В определенных вариантах осуществления иммунный ответ ограничивает тяжесть инвазивного заболевания, вызываемого ExPEC, у субъекта или предупреждает его.

[0237] В определенных вариантах осуществления инвазивное заболевание, вызываемое ExPEC, включает сепсис и/или бактериемию.

[0238] В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту одного или нескольких, предпочтительно всех, из полисахаридных

антигенов O1, O2, O4, O15, O16, O18, O25 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, при этом предпочтительно антиген O1 представляет собой O1A, O4 является глюкозилированным, антиген O6 представляет собой O6A, антиген O18 представляет собой O18A, и антиген O25 представляет собой O25B, где более предпочтительно каждый из полисахаридных антигенов O1A, O2, глюкозилированного O4, O6A, O15, O16, O18A, O25B и O75 содержит структуры формул (O1A), (O2), (O4-Glc+), (O6A), (O15), (O16), (O18A), (O25B) и (O75) соответственно, как показано в таблице 1, где каждое n независимо представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20, и где отношение полисахаридного антигена O75 к полисахаридному антигену O6 составляет от приблизительно 1,2:1 до приблизительно 8:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, более предпочтительно приблизительно 2:1.

[0239] В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту от 1 до 15 дополнительных полисахаридных антигенов *E. coli*, каждый из которых независимо ковалентно связан с белком-переносчиком.

[0240] В конкретном варианте осуществления каждый из белков-переносчиков содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3.

[0241] В определенных вариантах осуществления субъект является человеком, у которого имеется инфекция, вызываемая *E. coli* (предпочтительно ExPEC), предпочтительно инвазивное заболевание, вызываемое ExPEC, или который подвержен риску их наличия.

[0242] В определенных вариантах осуществления за одно введение вводят приблизительно 8-16 мкг, предпочтительно приблизительно 16 мкг, полисахаридного антигена O75.

[0243] В определенных вариантах осуществления весовое отношение вводимых полисахаридных антигенов O1:O2:O4:O6:O15:O16:O18:O25:O75 *E. coli* составляет 1:1:1:1:1:1:1:2:2.

[0244] В определенных вариантах осуществления глюкозилированный O4 представляет собой биоконъюгат глюкозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, где глюкозилированный полисахаридный антиген O4 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O4-Glc+),

показанной в таблице 1, где n представляет собой целое число от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20, где биоконъюгат глюкозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, был получен в клетке *E. coli*, которая содержит:

(i) нуклеотидную последовательность кластера генов rfb для полисахаридного антигена O4 *E. coli*;

(ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую глюкозилтрансферазу, характеризующуюся по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4, где глюкозилтрансфераза способна модифицировать полисахаридный антиген O4 *E. coli* с получением глюкозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*;

(iii) нуклеотидные последовательности, кодирующие транслоказу и гликозилтрансферазу, характеризующиеся по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 7 и 8 соответственно, где транслоказа способна к транслокации глюкозы, связанной с бактопренолом, а гликозилтрансфераза способна к глюкозилированию бактопренола;

(iv) нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-переносчик; и

(v) нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу, способную к ковалентному связыванию глюкозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli* с белком-переносчиком, где предпочтительно олигосахарилтрансфераза представляет собой PglB из Campylobacter jejuni.

[0245] В одном аспекте в настоящем изобретении также предусмотрена композиция, содержащая полисахаридные антигены O1, O2, O4, O6, O15, O16, O18, O25 и O75 *E. coli* (имеющие структуры, указанные выше для каждого антигена соответственно), где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, и при этом данная композиция не содержит других полисахаридных O-антигенов *E. coli*, ковалентно связанных с белком-переносчиком (т. е. 9-валентная композиция). В определенных вариантах осуществления данного аспекта белок-переносчик представляет собой EPA. В других вариантах осуществления данного аспекта белок-переносчик представляет собой CRM_{197}. В определенных вариантах осуществления данного аспекта ковалентные связи являются результатом химической конъюгации. В других вариантах ковалентные связи являются результатом

биоконъюгации. В определенных вариантах осуществления данного аспекта белок-переносчик представляет собой CRM_{197}, а ковалентные связи являются результатом химической конъюгации. В других вариантах осуществления данного аспекта белок-переносчик представляет собой EPA, а ковалентные связи являются результатом биоконъюгации. В предпочтительных вариантах осуществления данного аспекта композиция содержит увеличенное количество полисахаридного антигена O75 *E. coli* по сравнению с полисахаридными антигенами O1, O2 или O6, предпочтительно по сравнению с каждым из полисахаридных антигенов O1, O2 и O6, предпочтительно увеличенное в приблизительно 1,5-4 раза, предпочтительно увеличенное в приблизительно два раза количество.

Варианты осуществления

[0246] Вариант 1 предусматривает композицию, содержащую полисахаридный антиген O75 *E. coli* и по меньшей мере один дополнительный полисахаридный O-антиген *E. coli*, выбранный из группы, состоящей из O1, O2, O4, O6, O15, O16 и O18, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, и где отношение концентраций полисахаридного антигена O75 к дополнительному полисахаридному O-антигену составляет от приблизительно 1,2:1 до приблизительно 8:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 2,5:1, более предпочтительно приблизительно 2:1.

[0247] Вариант осуществления 1a предусматривает композицию согласно варианту осуществления 1, где по меньшей мере один дополнительный полисахаридный O-антиген представляет собой O1, предпочтительно O1A.

[0248] Вариант осуществления 1a1 предусматривает композицию согласно варианту осуществления 1a, где отношение концентраций полисахаридного антигена O75 к полисахаридному антигену O1 составляет 2:1.

[0249] Вариант осуществления 1b предусматривает композицию согласно варианту осуществления 1, где по меньшей мере один дополнительный полисахаридный O-антиген представляет собой O2.

[0250] Вариант осуществления 1b1 предусматривает композицию согласно варианту осуществления 1b, где отношение концентраций полисахаридного антигена O75 к полисахаридному антигену O1 составляет 2:1.

[0251] Вариант осуществления 1c предусматривает композицию согласно варианту осуществления 1, где по меньшей мере один дополнительный полисахаридный О-антиген представляет собой О4, предпочтительно глюкозилированный О4.

[0252] Вариант осуществления 1c1 предусматривает композицию согласно варианту осуществления 1c, где отношение концентраций полисахаридного антигена О75 к полисахаридному антигену О4 составляет 2:1.

[0253] Вариант осуществления 1d предусматривает композицию согласно варианту осуществления 1, где по меньшей мере один дополнительный полисахаридный О-антиген представляет собой О6, предпочтительно О6А.

[0254] Вариант осуществления 1d1 предусматривает композицию согласно варианту осуществления 1d, где отношение концентраций полисахаридного антигена О75 к полисахаридному антигену О6 составляет 2:1.

[0255] Вариант осуществления 1e предусматривает композицию согласно варианту осуществления 1, где по меньшей мере один дополнительный полисахаридный О-антиген представляет собой О15.

[0256] Вариант осуществления 1e1 предусматривает композицию согласно варианту осуществления 1e, где отношение концентраций полисахаридного антигена О75 к полисахаридному антигену О15 составляет 2:1.

[0257] Вариант осуществления 1f предусматривает композицию согласно варианту осуществления 1, где по меньшей мере один дополнительный полисахаридный О-антиген представляет собой О16.

[0258] Вариант осуществления 1f1 предусматривает композицию согласно варианту осуществления 1f, где отношение концентраций полисахаридного антигена О75 к полисахаридному антигену О16 составляет 2:1.

[0259] Вариант осуществления 1g предусматривает композицию согласно варианту осуществления 1, где по меньшей мере один дополнительный полисахаридный О-антиген представляет собой О18, предпочтительно О18А.

[0260] Вариант осуществления 1g1 предусматривает композицию согласно варианту осуществления 1g, где отношение концентраций полисахаридного антигена О75 к полисахаридному антигену О18 составляет 2:1.

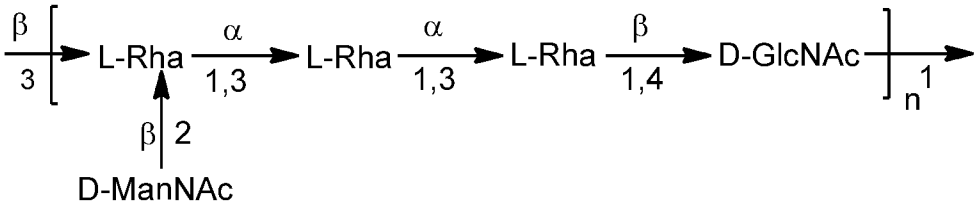
[0261] Вариант осуществления 1h предусматривает композицию согласно варианту осуществления 1, дополнительно содержащую полисахаридный антиген О25, независимо ковалентно связанный с белком-переносчиком, при этом предпочтительно антиген О25 представляет собой О25В.

[0262] Вариант осуществления 1h1 предусматривает композицию согласно варианту осуществления 1h, где отношение концентраций полисахаридного антигена O75 к полисахаридному антигену O25 составляет 1:1.

[0263] Вариант осуществления 2 предусматривает композицию согласно варианту осуществления 1, где композиция содержит полисахаридный антиген O75 *E. coli* и два или более, предпочтительно все, из полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O6, O15, O16, O18, O25 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, при этом предпочтительно антиген O1 представляет собой O1A, O4 является глюкозилированным, антиген O6 представляет собой O6A, антиген O18 представляет собой O18A, и антиген O25 представляет собой O25B.

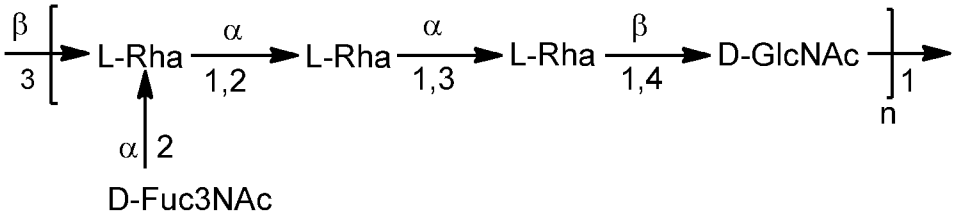
[0264] Вариант осуществления 3 предусматривает композицию согласно варианту осуществления 2, где:

(i) полисахаридный антиген O1 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O1A):



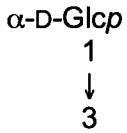
,

(ii) полисахаридный антиген O2 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O2):



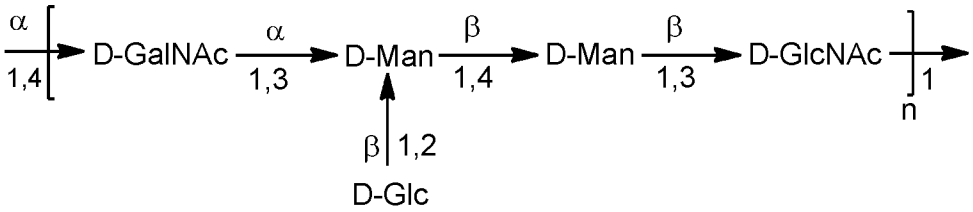
,

(iii) полисахаридный антиген O4 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O4-Glc+):



[→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→]$_n$,

(iv) полисахаридный антиген O6 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O6A):



,

(v) полисахаридный антиген O15 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O15):

[→2)-β-D-Gal*p*-(1→3)-α-L-Fuc*p*NAc-(1→3)-β-D-Glc*p*NAc-(1→]$_n$,

(vi) полисахаридный антиген O16 *E. coli* характеризуется структурой формулы (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

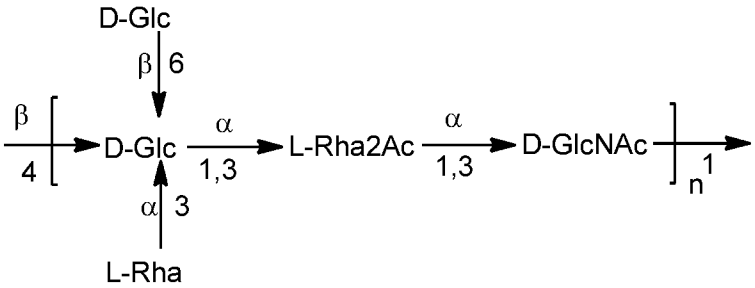
,

(vii) полисахаридный антиген O18 *E. coli* характеризуется структурой формулы (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

,

(viii) полисахаридный антиген O25 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O25B):



, и

(ix) полисахаридный антиген O75 *E. coli* характеризуется структурой формулы (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→]$_n$,

где каждое n независимо представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20.

[0265] Вариант осуществления 4 предусматривает композицию согласно вариантам осуществления 2 или 3, где весовое отношение полисахаридных антигенов O1:O2:O4:O6:O15:O16:O18:O25:O75 *E. coli* составляет 1:1:1:1:1:1:1:2:2.

[0266] Вариант осуществления 5 предусматривает композицию согласно любому из вариантов осуществления 1-4, где концентрация полисахаридного антигена O75 составляет от приблизительно 8 до приблизительно 50 мкг/мл, предпочтительно от 12 до 40 мкг/мл, например, 16-32 мкг/мл, предпочтительно приблизительно 26-38 мкг/мл, предпочтительно приблизительно 32 мкг/мл.

[0267] Вариант осуществления 6 предусматривает композицию согласно любому из вариантов осуществления 1-5, дополнительно содержащую по меньшей мере один другой дополнительный полисахаридный антиген *E. coli*, ковалентно связанный с белком-переносчиком.

[0268] Вариант осуществления 7 предусматривает композицию согласно варианту осуществления 6, где один другой дополнительный полисахаридный антиген O8 *E. coli* включает в себя полисахаридный антиген с формулой (O8):

$$\alpha\text{-D-Man}p3\text{Me-}(1\rightarrow[3)\text{-}\beta\text{-D-Man}p\text{-}(1\rightarrow2)\text{-}\alpha\text{-D-Man}p\text{-}(1\rightarrow2)\text{-}\alpha\text{-D-Man}p\text{-}(1\rightarrow]_n,$$

где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20.

[0269] Вариант осуществления 8 предусматривает композицию согласно любому из вариантов осуществления 1-7, где каждый белок-переносчик независимо выбран из группы, состоящей из детоксифицированного экзотоксина A *P. aeruginosa* (EPA), флагеллина (FliC) *E. coli*, CRM_{197}, мальтоза-связывающего белка (MBP), дифтерийного анатоксина, столбнячного анатоксина, детоксифицированного гемолизина A *S. aureus*, фактора слипания A, фактора слипания B, термолабильного энтеротоксина *E. coli*, детоксифицированных вариантов термолабильного энтеротоксина *E. coli*, субъединицы B холерного токсина (CTB), холерного токсина, детоксифицированных вариантов холерного токсина, белка Sat *E. coli*, домена-пассажира белка Sat *E. coli*, пневмолизина *Streptococcus pneumoniae*, гемоцианина лимфы улитки (KLH), PcrV *P. aeruginosa*, белка

наружной мембраны *Neisseria meningitidis* (OMPC) и белка D из нетипируемой *Haemophilus influenzae*.

[0270] Вариант осуществления 9 предусматривает композицию согласно варианту осуществления 8, где белок-переносчик представляет собой детоксифицированный экзотоксин A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) или CRM_{197}.

[0271] Вариант осуществления 10 предусматривает композицию согласно любому из вариантов осуществления 1-9, где белок-переносчик содержит от 1 до 20, как, например, от 1 до 10 или от 2 до 4, консенсусных последовательностей гликозилирования, имеющих аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, таких как консенсусные последовательности, имеющие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, наиболее предпочтительно белок-переносчик содержит четыре консенсусные последовательности гликозилирования.

[0272] Вариант осуществления 11 предусматривает композицию согласно любому из вариантов осуществления 1-10, где каждый белок-переносчик представляет собой EPA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3.

[0273] Вариант осуществления 12 предусматривает композицию согласно любому из вариантов осуществления 1-11, где полисахаридные антигены *E. coli* ковалентно связаны с белком-переносчиком посредством биоконъюгации или химической конъюгации, например, посредством химического метода восстановительного аминирования (RAC), конъюгации с одним концом или конъюгации с (2-((2-оксоэтил)тио)этил)карбаматным спейсером (eTEC).

[0274] Вариант осуществления 13 предусматривает композицию согласно варианту осуществления 12, где полисахаридные антигены *E. coli* ковалентно связаны с белком-переносчиком посредством биоконъюгации, предпочтительно полисахарид ковалентно связан с остатком Asn в участке гликозилирования в белке-переносчике.

[0275] Вариант осуществления 14 предусматривает композицию, содержащую:

(i) биоконъюгат полисахаридного антигена O1A *E. coli*, ковалентно связанного с детоксифицированным экзотоксином A белка-переносчика P. aeruginosa (EPA-4), где полисахаридный антиген O1A *E. coli* характеризуется структурой формулы (O1A);

(ii) биоконъюгат полисахаридного антигена O2 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, где полисахаридный антиген O2 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O2);

(iii)биоконъюгат глюкозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, где глюкозилированный полисахаридный антиген O4 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O4-Glc+);

(iv)биоконъюгат полисахаридного антигена O6A *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, где полисахаридный антиген O6A *E. coli* характеризуется структурой формулы (O6A);

(v) биоконъюгат полисахаридного антигена O15 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, где полисахаридный антиген O15 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O15);

(vi)биоконъюгат полисахаридного антигена O16 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, где полисахаридный антиген O16 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O16);

(vii) биоконъюгат полисахаридного антигена O18A *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, где полисахаридный антиген O18A *E. coli* характеризуется структурой формулы (O18A);

(viii) биоконъюгат полисахаридного антигена O25B *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, где полисахаридный антиген O25B *E. coli* характеризуется структурой формулы (O25B); и

(ix)биоконъюгат полисахаридного антигена O75 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком EPA-4, где полисахаридный антиген O75 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O75);

где EPA-4 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3,

где каждая из структур формул (O1A), (O2), (O4-Glc+), (O6A), (O15), (O16), (O18A), (O25B) и (O75) показана в таблице 1, где каждое n независимо представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, более предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20, и

где отношение полисахаридного антигена O75 к полисахаридному антигену O6A составляет от приблизительно 1,2:1 до приблизительно 8:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, более предпочтительно приблизительно 2:1.

[0276] Вариант осуществления 15 предусматривает композицию согласно варианту осуществления 14, дополнительно содержащую от 1 до 15 дополнительных

полисахаридных антигенов *E. coli*, каждый из которых независимо ковалентно связан с белком-переносчиком.

[0277] Вариант осуществления 16 предусматривает композицию согласно любому из вариантов осуществления 2-15, где глюкозилированный O4 представляет собой биоконъюгат глюкозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, где глюкозилированный полисахаридный антиген O4 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O4-Glc+), показанной в таблице 1, где n представляет собой целое число от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20,

где биоконъюгат глюкозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, был получен в клетке *E. coli*, которая содержит:

(i) нуклеотидную последовательность кластера генов *rfb* для полисахаридного антигена O4 *E. coli*;

(ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую глюкозилтрансферазу, характеризующуюся по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4, где глюкозилтрансфераза способна модифицировать полисахаридный антиген O4 *E. coli* с получением глюкозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*;

(iii) нуклеотидные последовательности, кодирующие транслоказу и гликозилтрансферазу, характеризующиеся по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 7 и 8 соответственно, где транслоказа способна к транслокации глюкозы, связанной с бактопренолом, а гликозилтрансфераза способна к глюкозилированию бактопренола;

(iv) нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-переносчик; и

(v) нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу, способную к ковалентному связыванию глюкозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli* с белком-переносчиком, где предпочтительно олигосахарилтрансфераза представляет собой PglB из *Campylobacter jejuni*.

[0278] Вариант осуществления 17 предусматривает способ индуцирования иммунного ответа на *E. coli*, предпочтительно внекишечную патогенную *E. coli* (ExPEC), у субъекта, включающий введение субъекту композиции согласно любому из вариантов осуществления 1-16.

[0279] Вариант осуществления 17a предусматривает способ согласно варианту осуществления 17, где субъект нуждается в указанном иммунном ответе.

[0280] Вариант осуществления 18 предусматривает способ индуцирования иммунного ответа на *E. coli* (предпочтительно внекишечную патогенную *E. coli*, ExPEC) у субъекта, включающий введение субъекту первого эффективного количества полисахаридного антигена O75 *E. coli* и второго эффективного количества полисахаридного антигена O6 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, и где отношение первого эффективного количества ко второму эффективному количеству составляет от приблизительно 1,2:1 до приблизительно 8:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, более предпочтительно приблизительно 2:1.

[0281] Вариант осуществления 18a предусматривает способ согласно варианту осуществления 18, где субъект нуждается в указанном иммунном ответе.

[0282] Вариант осуществления 19 предусматривает способ согласно любому из вариантов осуществления 17-18a, где иммунный ответ ограничивает тяжесть инвазивного заболевания, вызываемого ExPEC, у субъекта или предупреждает его.

[0283] Вариант осуществления 20 предусматривает способ согласно варианту осуществления 19, где инвазивное заболевание, вызываемое ExPEC, включает сепсис и/или бактериемию.

[0284] Вариант осуществления 20a предусматривает способ согласно варианту осуществления 20, где инвазивное заболевание, вызываемое ExPEC, включает сепсис.

[0285] Вариант осуществления 20b предусматривает способ согласно варианту осуществления 20, где инвазивное заболевание, вызываемое ExPEC, включает бактериемию.

[0286] Вариант осуществления 21 предусматривает способ согласно любому из вариантов осуществления 18-20, дополнительно включающий введение субъекту одного или нескольких, предпочтительно всех, полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O15, O16, O18, O25 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком,
предпочтительно антиген O1 представляет собой O1A, O4 является

глюкозилированным, антиген O6 представляет собой O6A, антиген O18 представляет собой O18A, и антиген O25 представляет собой O25B,
более предпочтительно каждый из полисахаридных антигенов O1A, O2, глюкозилированного O4, O6A, O15, O16, O18A, O25B и O75 содержит структуры формул (O1A), (O2), (O4-Glc+), (O6A), (O15), (O16), (O18A), (O25B) и (O75) соответственно, как показано в таблице 1, где каждое n независимо представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20, и где отношение полисахаридного антигена O75 к полисахаридному антигену O6 составляет от приблизительно 1,2:1 до приблизительно 8:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, более предпочтительно приблизительно 2:1.

[0287] Вариант осуществления 22 предусматривает способ согласно любому из вариантов осуществления 18-21, дополнительно включающий введение субъекту от 1 до 15 дополнительных полисахаридных антигенов *E. coli*, каждый из которых независимо ковалентно связан с белком-переносчиком.

[0288] Вариант осуществления 23 предусматривает способ согласно любому из вариантов осуществления 18-22, где каждый из белков-переносчиков содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3.

[0289] Вариант осуществления 24 предусматривает способ согласно любому из вариантов осуществления 17-23, где субъект является человеком, у которого имеется инфекция, вызываемая *E. coli* (предпочтительно ExPEC), или инвазивное заболевание, вызываемое ExPEC, или который подвержен риску их наличия.

[0290] Вариант осуществления 25 предусматривает способ согласно любому из вариантов осуществления 17-24, где за одно введение вводят приблизительно 8-16 мкг, предпочтительно приблизительно 16 мкг, полисахаридного антигена O75.

[0291] Вариант осуществления 26 предусматривает способ согласно любому из вариантов осуществления 21-25, где весовое отношение вводимых полисахаридных антигенов O1:O2:O4:O6:O15:O16:O18:O25:O75 *E. coli* составляет 1:1:1:1:1:1:1:2:2.

[0292] Вариант осуществления 27 предусматривает способ согласно любому из вариантов осуществления 21-26, где глюкозилированный O4 представляет собой биоконъюгат глюкозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, где глюкозилированный полисахаридный антиген O4 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O4-Glc+), показанной в таблице 1, где n представляет собой целое число от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от

5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20,

где биоконъюгат глюкозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*, ковалентно связанного с белком-переносчиком, был получен в клетке *E. coli*, которая содержит:

(i) нуклеотидную последовательность кластера генов *rfb* для полисахаридного антигена O4 *E. coli*;

(ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую глюкозилтрансферазу, характеризующуюся по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4, где глюкозилтрансфераза способна модифицировать полисахаридный антиген O4 *E. coli* с получением глюкозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli*;

(iii) нуклеотидные последовательности, кодирующие транслоказу и гликозилтрансферазу, характеризующиеся по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 7 и 8 соответственно, где транслоказа способна к транслокации глюкозы, связанной с бактопренолом, а гликозилтрансфераза способна к глюкозилированию бактопренола;

(iv) нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-переносчик; и

(v) нуклеотидную последовательность, кодирующую олигосахарилтрансферазу, способную к ковалентному связыванию глюкозилированного полисахаридного антигена O4 *E. coli* с белком-переносчиком, где предпочтительно олигосахарилтрансфераза представляет собой PglB из *Campylobacter jejuni*.

[0293] Вариант осуществления 27 предусматривает композицию согласно любому из вариантов осуществления 1-16 для применения в способе индуцирования иммунного ответа на *E. coli* (предпочтительно внекишечную патогенную *E. coli*, ExPEC) у субъекта.

[0294] Вариант осуществления 28 предусматривает применение композиции согласно любому из вариантов осуществления 1-16 в изготовлении лекарственного препарата для индуцирования иммунного ответа на *E. coli*, предпочтительно внекишечную патогенную *E. coli* (ExPEC), у субъекта.

[0295] Вариант осуществления 29 предусматривает комбинацию первого эффективного количества полисахаридного антигена O75 *E. coli* и второго эффективного количества полисахаридного антигена O6 *E. coli* для применения в способе индуцирования иммунного ответа на *E. coli*, предпочтительно внекишечную патогенную *E. coli* (ExPEC), у субъекта, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, и где отношение первого эффективного количества ко второму эффективному количеству составляет от приблизительно 1,2:1 до приблизительно 8:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, более предпочтительно приблизительно 2:1.

[0296] Вариант осуществления 29a предусматривает комбинацию согласно варианту осуществления 29, где первое эффективное количество и второе эффективное количество находятся в одной и той же композиции.

[0297] Вариант осуществления 29b предусматривает комбинацию согласно варианту осуществления 29, где первое эффективное количество и второе эффективное количество находятся в отдельных композициях.

[0298] Вариант осуществления 29c предусматривает комбинацию согласно любому из вариантов осуществления 29-29b, где субъект нуждается в указанном иммунном ответе.

[0299] Вариант осуществления 30 предусматривает комбинацию согласно любому из вариантов осуществления 29-29c, где иммунный ответ ограничивает тяжесть инвазивного заболевания, вызываемого ExPEC, у субъекта или предупреждает его.

[0300] Вариант осуществления 31 предусматривает комбинацию согласно варианту осуществления 30, где инвазивное заболевание, вызываемое ExPEC, включает сепсис и/или бактериемию.

[0301] Вариант осуществления 32 предусматривает комбинацию согласно любому из вариантов осуществления 29-31, дополнительно содержащую один или несколько, предпочтительно все, из эффективных количеств полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O15, O16, O18, O25 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, при этом предпочтительно антиген O1 представляет собой O1A, O4 является глюкозилированным, антиген O6 представляет собой O6A, антиген O18 представляет собой O18A, и антиген O25 представляет собой O25B, предпочтительно каждый из полисахаридных антигенов O1A, O2, глюкозилированного O4, O6A, O15, O16, O18A, O25B и O75 содержит структуры формул (O1A), (O2), (O4-Glc+), (O6A), (O15), (O16), (O18A), (O25B) и (O75)

соответственно, как показано в таблице 1, где каждое n независимо представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20, где весовое отношение полисахаридного антигена O75 к полисахаридному антигену O6 составляет от приблизительно 1,2:1 до приблизительно 8:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, более предпочтительно приблизительно 2:1.

[0302] Вариант осуществления 33 предусматривает комбинацию согласно любому из вариантов осуществления 29-32, дополнительно содержащую эффективные количества от 1 до 15 дополнительных полисахаридных антигенов *E. coli*, каждый из которых независимо ковалентно связан с белком-переносчиком.

[0303] Вариант осуществления 34 предусматривает комбинацию согласно любому из вариантов осуществления 29-33, где каждый из белков-переносчиков содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3.

[0304] Вариант осуществления 35 предусматривает комбинацию согласно любому из вариантов осуществления 29-34, где субъект является человеком, у которого имеется инфекция, вызываемая *E. coli* (предпочтительно ExPEC), или инвазивное заболевание, вызываемое ExPEC, или который подвержен риску их наличия.

[0305] Вариант осуществления 36 предусматривает комбинацию согласно любому из вариантов осуществления 29-35, где эффективное количество полисахаридного антигена O75 составляет приблизительно 8-16 мкг, предпочтительно приблизительно 16 мкг.

[0306] Вариант осуществления 37 предусматривает комбинацию первого эффективного количества полисахаридного антигена O75 *E. coli* и второго эффективного количества полисахаридного антигена O6 *E. coli* для изготовления лекарственного препарата для индуцирования иммунного ответа на *E. coli*, предпочтительно внекишечную патогенную *E. coli* (ExPEC), у субъекта, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, и где отношение первого эффективного количества ко второму эффективному количеству составляет от приблизительно 1,2:1 до приблизительно 8:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, более предпочтительно приблизительно 2:1.

[0307] Вариант осуществления 37a предусматривает комбинацию согласно варианту осуществления 37, где субъект нуждается в указанном иммунном ответе.

[0308] Вариант осуществления 38 предусматривает комбинацию согласно варианту осуществления 37 или 37a, где иммунный ответ ограничивает тяжесть инвазивного заболевания, вызываемого ExPEC, у субъекта или предупреждает его.

[0309] Вариант осуществления 39 предусматривает комбинацию согласно варианту осуществления 38, где инвазивное заболевание, вызываемое ExPEC, включает сепсис и/или бактериемию.

[0310] Вариант осуществления 40 предусматривает комбинацию согласно любому из вариантов осуществления 37-39, дополнительно содержащую один или несколько, предпочтительно все, из эффективных количеств полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O15, O16, O18, O25 *E. coli*, для изготовления лекарственного препарата, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, при этом предпочтительно антиген O1 представляет собой O1A, O4 является глюкозилированным, антиген O6 представляет собой O6A, антиген O18 представляет собой O18A, и антиген O25 представляет собой O25B, предпочтительно каждый из полисахаридных антигенов O1A, O2, глюкозилированного O4, O6A, O15, O16, O18A, O25B и O75 содержит структуры формул (O1A), (O2), (O4-Glc+), (O6A), (O15), (O16), (O18A), (O25B) и (O75) соответственно, как показано в таблице 1, где каждое n независимо представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20, и где отношение полисахаридного антигена O75 к полисахаридному антигену O6 составляет от приблизительно 1,2:1 до приблизительно 8:1, предпочтительно от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, более предпочтительно приблизительно 2:1.

[0311] Вариант осуществления 41 предусматривает комбинацию согласно любому из вариантов осуществления 37-40, дополнительно содержащую эффективные количества от 1 до 15 дополнительных полисахаридных антигенов *E. coli*, каждый из которых независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, для изготовления лекарственного препарата.

[0312] Вариант осуществления 42 предусматривает комбинацию согласно любому из вариантов осуществления 37-41, где каждый из белков-переносчиков содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3.

[0313] Вариант осуществления 43 предусматривает комбинацию согласно любому из вариантов осуществления 37-42, где субъект является человеком, у которого

имеется инфекция, вызываемая *E. coli* (предпочтительно ExPEC), или инвазивное заболевание, вызываемое ExPEC, или который подвержен риску их наличия.

[0314] Вариант осуществления 44 предусматривает комбинацию согласно любому из вариантов осуществления 37-43, где эффективное количество полисахаридного антигена O75 в одной дозе для введения субъекту составляет приблизительно 8-16 мкг, предпочтительно приблизительно 16 мкг.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. **Эпидемиологические данные об инфекциях, вызываемых *E. coli***

[0315] Чтобы определить распределение O-серотипов *E. coli*, вызывающей бактериемию, проводили широкомасштабные мониторинговые исследования. С 2011 до 2017 года было собрано более чем 3200 изолятов *E. coli* из крови пациентов в возрасте ≥ 60 лет, госпитализированных в странах Северной Америки, Европы, Азиатско-Тихоокеанского региона и Южной Америки. Каждый штамм анализировали на серотип O-антигена с применением классических методик агглютинации и O-генотипирования на основе секвенирования. См. таблицу 2 ниже.

[0316] Выделенные образцы крови человека анализировали для определения принадлежности патогенов в них и паттернов их устойчивости к антибиотикам. Изоляты *E. coli* получали из образцов после анализа. Принадлежность к *E. coli* подтверждали посредством MALDI-TOF MS. Дополнительный анализ изолятов *E. coli* выполняли с помощью анализа агглютинации с использованием антисыворотки для определения их серотипа O-антигена (DebRoy et al. (2011) Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases 12, 169-185). Изоляты, не поддающиеся типированию посредством способа агглютинации, дополнительно анализировали путем полногеномного секвенирования с последующим O-генотипированием по специфичным для O-серотипа последовательностям генов *wzy* и *wzx*.

Таблица 2. Распределение наиболее распространенных ассоциированных с бактериемией O-серотипов *E. coli* из коллекции 3217 изолятов крови, собранных по всему миру с 2011 до 2017 года, на основе O-серотипирования путем агглютинации и O-генотипирования изолятов, не поддающихся типированию путем агглютинации. Субъекты были госпитализированы в следующих странах: США, Канада, Аргентина, Бразилия, Великобритания, Германия, Испания, Италия, Нидерланды, Франция, Япония, Таиланд, Южная Корея и Австралия.

О-серотип	Преобладание, 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%)

[0317] Стратификация по географическому местоположению в общемировом наборе *E. coli*, ассоциированных с бактериемией, продемонстрировала преобладание 10 основных О-серотипов независимо от местоположения, что позволяет предположить, что они являются преобладающими О-серотипами, ассоциированными во всем мире с *E. coli*, вызывающими бактериемию.

[0318] В общемировом наборе изолятов *E. coli* с множественной устойчивостью к лекарственным средствам, ассоциированных с бактериемией (n=345), т. е. тех штаммов, которые являются устойчивыми к по меньшей мере трем классам клинически значимых противомикробных лекарственных средств, преобладание 10 основных О-серотипов составляет 75,4%.

[0319] Вся информация, полученная в результате эпидемиологического анализа, взятая вместе, показывает, что 10 преобладающих О-серотипов могут охватывать приблизительно 60-80% случаев бактериемической инфекции, ассоциированной с *E. coli*, при условии охвата подчастей нетипируемых штаммов.

[0320] 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-антигенов. Такую вакцину можно выгодно получать с применением технологии химической конъюгации или биоконъюгации.

<u>Пример 2. Получение биоконъюгатов О-антигенов *E. coli* и получаемых в результате продуктов биоконъюгатов</u>

[0321] Были получены десять (10) биоконъюгатов, включая биоконъюгат *E. coli* O1A-EPA, биоконъюгат O2-EPA, биоконъюгат O4-Glc+-EPA (также обозначаемый далее как O4-EPA, т. е. в представленных ниже примерах биоконъюгат полисахаридного антигена O4 представляет собой вариант, где O4 является глюкозилированным, имеет гликановую структуру (O4-Glc+), показанную в таблице 1; описание получения этого варианта с использованием новой, ранее не представленной и неизвестной глюкозилтрансферазы GtrS, которая способна специфично модифицировать полисахаридный антиген O4 *E. coli* путем добавления глюкозы с получением глюкозилированного антигена O4 *E. coli*, было подробно представлено в PCT/US20/23404, поданной 18 марта 2020 г., включенной в данный документ посредством ссылки), биоконъюгат O6A-EPA, биоконъюгат O8-EPA, биоконъюгат O15-EPA, биоконъюгат O16-EPA, биоконъюгат O18A-EPA, биоконъюгат O25B-EPA и биоконъюгат O75-EPA. Структуры гликанов этих конъюгатов можно увидеть в соответствующих формулах в таблице 1. Композиция, содержащая 10 биоконъюгатов, называется в данном документе как "ExPEC10V". Композиция, содержащая биоконъюгаты O1A-EPA, O2-EPA, O6A-EPA и O25B-EPA, называется "ExPEC4V" (и была ранее описана, например, в WO 2015/124769 и WO 2017/035181). Получение этих десяти биоконъюгатов и типичные штаммы-продуценты для этих биоконъюгатов подробно описаны в PCT/US20/23404, поданной 18 марта 2020 г. и включенной в данный документ посредством ссылки.

Исходный штамм W3110 *Escherichia coli*

[0322] Непатогенный штамм K12 W3110 *E. coli* использовался в качестве исходного штамма для конструирования всех десяти штаммов-продуцентов. Штамм K12 W3110 *E. coli* был получен из Центра генетического фонда Coli (Йельский университет, Нью-Хейвен (Коннектикут), США, номер продукта CGSC № 4474). Его соответствующий генотип был ранее описан (W3110 *E. coli*, F-, лямбда-, IN(rrnD-rrnE)1, rph-1), а его геномная последовательность была ранее опубликована (Hayashi K, et al., 2006, Mol. Syst. Biol. 2006.0007 (doi:10.1038/msb4100049). Штамм W3110 *E. coli* был генетически модифицирован, чтобы сделать возможным получение каждого из биоконъюгатов О-антигенов *E. coli* (таблица 3).

Штаммы-продуценты биоконъюгатов

[0323] Обе из композиций "ExPEC4V" и "ExPEC10V" содержат биоконъюгаты O2-EPA и O25B-EPA из одних и тех же штаммов-продуцентов. Композиция "ExPEC4V" содержит биоконъюгат O1A-EPA из штаммов-продуцентов stGVXN4411 или stLMTB10217, тогда как композиция "ExPEC10V" содержит биоконъюгат O1A-EPA из штамма-продуцента stLMTB10217. Композиция "ExPEC4V" содержит биоконъюгат O6A-EPA из штамма-продуцента stGVXN4112, тогда как композиция "ExPEC10V" содержит биоконъюгат O6A-EPA из штамма-продуцента 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 штаммов-продуцентов, которые не используются для "ExPEC4V". Различные штаммы-продуценты могут различаться по плазмидам для экспрессии белка-переносчика EPA и/или олигосахарилтрансферазы PglB, как указано ниже. Обзор нескольких типичных штаммов-продуцентов приведен в таблице 3 ниже.

Таблица 3. Обзор генной инженерии штаммов-продуцентов *E. coli* для биоконъюгатов O-антигенов для вакцинных композиций ExPEC4V и ExPEC10V

Серотип	**Название штамма**	**Геномные мутации**			**Плазмиды**	
		Кластер генов *rfb*	***waaL***	***gtrABS***	***pglB***	***epa***
O1A (ExPEC 4V)	stGVXN4411	Δ*rfb*::O1A *rfb* upecGVXN_032	Δ*waaL*	-	pGVXN970	pGVXN1076
O1A (ExPEC 4V; ExPEC 10V)	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 (ExPEC	stGVXN4112	Δ*rfb*::O6A *rfb* CCUG11309	Δ*waaL*	-	pGVXN114	pGVXN659

4V)						
O6A (ExPEC 10V)	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

[0324] Были также получены и использовались альтернативные штаммы-продуценты для некоторых биоконъюгатов, например, для поиска клонов с улучшенными выходами и/или изменениями определенных характеристик биоконъюгатов.

Кластер генов (*rfb*), отвечающих за биосинтез О-антигенов

[0325] Во всех штаммах-продуцентах О-антигенов *E. coli* встречающийся в природе геномный кластер генов, отвечающих за биосинтез O16::IS5-антигена W3110 *E. coli* (*rfb*), был заменен выбранными кластерами биосинтеза, специфичными для О-антигенов, из штаммов *E. coli* выбранного серотипа, кодирующими структуры О-антигенов, специфичные для серотипа (см. таблицу 1 для этих структур О-антигенов). Десять донорных кластеров *rfb* были выбраны или подтверждены после полногеномного анализа изолятов крови с *E. coli*. Замена кластера генов *rfb* O16::IS5 W3110, который является дефектным при биосинтезе О-антигена, была достигнута в единственном событии гомологичной рекомбинации. В случае кластеров генов *rfb* O16 и O18A донорная ДНК рекомбинировала посредством фланкирующих генов *gnd* и *rmlCA*, тогда как кластер генов *rfb* для других штаммов рекомбинировал посредством

фланкирующих генов *gnd* и *galF*. Последовательности кластеров *rfb* в штаммах-продуцентах представлены под SEQ ID NO: 9 и 11-19.

Ген лигазы О-антигена (*waaL*)

[0326] Все штаммы-продуценты О-антигенов *E. coli* несут искусственно введенную делецию лигазы геномного О-антигена W3110 *E. coli*, кодируемой геном *waaL*. В штаммах Δ*waaL* перенос О-антигена к липиду А нарушен, и вместо этого перенос О-антигена направляется к белку-переносчику для увеличения выхода продукта.

Гены, отвечающие за глюкозилирование О-антигенов (*gtrABS*)

[0327] В штаммах-продуцентах O8, O15, O16, O18A, O25B и O75 *E. coli* геномные гены *gtrABS* W3110 *E. coli*, которые отвечают за глюкозилирование О-антигена O16, были удалены. Тогда как гены *gtrA* и *gtrB* в различных серотипах являются в высокой степени гомологичными и взаимозаменяемыми, ген *gtrS* кодирует гликозилтрансферазу О-антигена, специфичную для серотипа. В *E. coli* GtrS W3110 может переносить остаток глюкозы (Glc) на сахар GlcNAc в мотиве α-L-Rha-(1→3)-D-GlcNAc О-антигена O16 *E. coli*. В штаммах-продуцентах O1A, O2 и O6A *E. coli* делеции или замены гена *gtrABS* не наблюдались. В этих О-антигенах отсутствует мотив α-L-Rha-(1→3)-D-GlcNAc, который является природным субстратом для *gtrS* O16 *E. coli*. В штамме-продуценте O4 *E. coli* ген *gtrS* W3110 был заменен геном *gtrS* O4 *E. coli* для обеспечения надлежащего глюкозилирования О-антигена O4 *E. coli* (кодирующая последовательность гена *gtrS* O4 *E. coli* в данном документе представлена под SEQ ID NO: 5, и аминокислотная последовательность белка GtrS O4 *E. coli* представлена в данном документе под SEQ ID NO: 4; см., например, также PCT/US20/23404, поданную 18 марта 2020 г.).

Олигосахарилтрансфераза PglB

[0328] Все штаммы-продуценты О-антигенов *E. coli* экспрессировали вариант гликозилтрансферазы PglB *C. jejuni*, которая может переносить О-антиген на аминокислотную консенсусную последовательность в белке-переносчике посредством *N*-гликозилирования. PglB характеризуется широким спектром распознавания субстрата, однако из-за низких выходов продукта было получено несколько штаммов-продуцентов, экспрессирующих вариант PglB с модифицированными формами субстратной специфичности, что приводило к улучшенному выходу продукта (см., например, WO 2016/107818, WO 2016/107819). Ген *pglB* помещали в плазмиде за промотором, индуцируемым изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG). В таблице 4 ниже перечислены варианты PglB, кодируемые плазмидами, используемыми

для получения штаммов-продуцентов О-антигенов *E. coli* для биоконъюгатов для вышеописанных композиций ExPEC4V и ExPEC10V. Другие плазмиды с видоизменениями остова вектора, маркером устойчивости к антибиотикам и/или альтернативными вариантами PglB также были успешно протестированы в отношении продуцирования биоконъюгатов.

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

Название плазмиды	**Ген**	**Описание**[1]
pGVXN114	*pglB*	Частота использования кодонов в *C. jejuni*; SpR
pGVXN970	*pglB*	Оптимизированная частота использования кодонов в *E. coli*; SpR
pGVXN971	*pglB*^{N534Q}	Оптимизированная частота использования кодонов в *E. coli*; природный участок гликозилирования PglB был инактивирован; SpR
pGVXN1217	*pglB*^{N311V}	Оптимизированная частота использования кодонов в *E. coli*; PglB с оптимизированной субстратной специфичностью; SpR
pGVXN1221	*pglB*^{N311V,K482R,D483H,A669V}	Оптимизированная частота использования кодонов в *E. coli*; PglB с оптимизированной субстратной специфичностью; SpR
pGVXN2381	*pglB*^{Y77H,S80R,Q287P,K289R,N311V}	Оптимизированная частота использования кодонов в *E. coli*; PglB с оптимизированной субстратной специфичностью; SpR
pGVXN659	EPA-4	EPA с четырьмя участками биоконъюгации; AmpR
pGVXN1076	EPA-4	EPA с четырьмя участками биоконъюгации; KanR

[1] SpR — устойчивый к спектиномицину; AmpR — устойчивый к ампициллину; KanR — устойчивый к канамицину

Оптимальные варианты PglB для каждого биоконъюгата десяти О-антигенов *E. coli* в ExPEC10V определяли, как более подробно описано, например, в PCT/US20/23415, поданной 18 марта 2020 г., включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Белок-переносчик (EPA)

[0329] Все штаммы-продуценты О-антигенов *E. coli* экспрессировали генетически детоксифицированный анатоксин ADP-рибозилтрансферазы (EPA) *P. aeruginosa* в качестве белка-переносчика для О-антигена. Анатоксин EPA отличается от токсина EPA дикого типа двумя остатками: Leu552 был заменен на Val, а Glu553 (в каталитическом домене) был удален. Сообщалось, что делеции Glu553 значительно уменьшают токсичность. В дополнение к мутации, приводящей к детоксификации, были введены четыре (EPA-4) консенсусных мотива участка *N*-гликозилирования. Ген *epa* помещали в плазмиде за промотором, индуцируемым L-арабинозой (Ara) (таблица 4). Таблица 4 ограничена плазмидами, используемыми в штаммах-продуцентах для биоконъюгатов, используемых в вышеописанных композициях "ExPEC4V" и "ExPEC10V". Плазмиды с видоизменениями остова вектора, маркером устойчивости к антибиотикам и/или вариантами EPA, например, с варьирующимся числом консенсусных мотивов участка *N*-гликозилирования (например, имеющие два таких мотива, EPA-2), также были успешно протестированы в отношении продуцирования биоконъюгатов.

<u>Пример 3. Оптимизация олигосахарилтрансферазы для создания биоконъюгатов О-антигенов *E. coli*</u>

[0330] Оптимизация выхода для получения биоконъюгатов может быть достигнута путем модификации олигосахарилтрансферазы PglB *C. jejuni*, что может привести к более эффективному *N*-гликозилированию О-антигена, представляющего интерес, с белком-переносчиком EPA или более высокой его степени. В штамме *E. coli* для получения биоконъюгата с глюкозилированным полисахаридным О-антигеном O4 (O4-Glc+) была применена такая стратегия оптимизации, и она привела к получению (O4-Glc+)-специфичного оптимизированного варианта PglB, улучшающего выход продукта для биоконъюгата.

[0331] В данном подходе штамм, продуцирующий полисахаридный О-антиген О4-Glc+, содержащий экспрессионную плазмиду с EPA, трансформировали с помощью различных экспрессионных плазмид с PglB, каждая из которых содержала различные аминокислотные замены в белке PglB, приводящие к изменению субстратной специфичности. Уровень продуцирования биоконъюгата и профиль каждого штамма оценивали на уровне встряхиваемой колбы в экспериментах с осмотическим шоком, а считывание выполняли с помощью иммуноанализов методом капиллярного электрофореза периплазматического экстракта с использованием О4-Glc+-специфичных моноклональных антител.

[0332] Было обнаружено, что один из протестированных вариантов PglB, содержащий аминокислотную замену N311V, значительно улучшает выход продукта для глюкозилированных биоконъюгатов О4 (см. PCT/US20/23415, поданную 18 марта 2020 г., включенную в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0333] В дальнейшем улучшении, где вариант PglB N311V был дополнительно модифицирован, аминокислотная замена Y77H приводила к дополнительному повышению О4-Glc+-специфичного выхода продукта и продемонстрировала повышенную степень ди- и тригликозилирования продукта по сравнению с вариантом PglB N311V, где другие модификации оказались нейтральными или оказывали отрицательный эффект в отношении выхода продукта (см. PCT/US20/23415, поданную 18 марта 2020 г., включенную в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Плазмида pLMTB4008 (SpR) кодирует вариант PglB с оптимизированной частотой использования кодонов в *E. coli*, оптимизированной субстратной специфичностью в отношении (О4-Glc+) с мутациями Y77H и N311V.

[0334] Было обнаружено, что вариант PglB с оптимизированной субстратной специфичностью в отношении полисахаридного О-антигена О4-Glc+, содержащий аминокислотные замены N311V и Y77H по сравнению с гликозилтрансферазой PglB *C. jejuni* дикого типа (wt), обеспечивает удвоение выхода биоконъюгата по сравнению с вариантом PglB-N311V после первого цикла оптимизации.

[0335] Аналогично с помощью скрининга также определяли варианты PglB, обеспечивающие наиболее оптимальный выход для получения биоконъюгатов О-антигенов *E. coli* других девяти серотипов в композиции ExPEC10V, см., например, PCT/US20/23415, поданную 18 марта 2020 г., включенную в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0336] Было обнаружено, что для биоконъюгатов, содержащих полисахаридный антиген O1A, O6A или O15, PglB с аминокислотными мутациями N311V, K482R, D483H и A669V дает самые высокие выходы.

[0337] Было обнаружено, что для биоконъюгатов, содержащих полисахаридные антигены O2, O8, O18A или O25B, PglB дикого типа (т. е. не имеющий аминокислотных мутаций в положениях 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 и 669) дает самые высокие выходы.

[0338] Было обнаружено, что для биоконъюгатов, содержащих полисахаридный антиген O16, PglB с аминокислотными мутациями Y77H, S80R, Q287P, K289R и N311V дает самые высокие выходы.

[0339] Было обнаружено, что для биоконъюгатов, содержащих полисахаридный антиген O75, PglB с аминокислотной мутацией N311V дает самые высокие выходы.

[0340] Эти результаты продемонстрировали, что оптимальный вариант PglB является различным для разных O-антигенов, и что оптимальный вариант PglB для получения биоконъюгата с данным полисахаридным O-антигеном нельзя предсказать.

Пример 4. Показатели качества биоконъюгатов O-антигенов из 10 серотипов *E. coli*

[0341] Остатки O-гликанов целевых O-антигенов структурно разнообразны и имеют вариабельные повторяющиеся звенья. Специфичность и аффинность гликозилтрансферазы PglB связаны со структурой гликана. Таким образом, получение биоконъюгата, обладающего требуемыми показателями качества, например, чистотой, отношением гликан/белок и т. д. представляет собой сложную и непростую задачу. Правильная комбинация PglB и белка-переносчика EPA определяет выход и может влиять на эффективность гликозилирования. Путем оптимизации PglB и белков-переносчиков получали биоконъюгаты, имеющие требуемые показатели качества. Также может быть важно поддерживать более низкое пороговое значение общего содержания белка-переносчика, в частности когда один или несколько биоконъюгатов O-антигена объединяются вместе и вводятся в одной композиции или вакцине, потому что очень большие количества белка-переносчика могут приводить к иммунной интерференции. Во избежание такого явления предпочтительными являются конъюгаты, имеющие более высокое отношение гликан/белок. Таким образом, для вакцины ExPEC10V были разработаны биоконъюгаты с по меньшей мере

сопоставимым (с ранее описанной вакциной ExPEC4V, прошедшей клинические испытания) коэффициентом гликозилирования.

[0342] Каждый биоконъюгат получали путем культивирования соответствующих клеток-хозяев (пример 2, таблица 3) в биореакторах (объемы 10 л и/или 200 л) и экспрессии биоконъюгатов, следуя ранее описанным способам. Каждую лекарственную субстанцию изготавливали партиями посредством бактериальной периодической ферментации с добавлением субстрата с получением биомассы, содержащей экспрессированные биоконъюгаты соответствующего серотипа полисахарида. Клетки культивировали и индуцировали с помощью IPTG и арабинозы. Биоконъюгаты выделяли из периплазмы клеток в биореакторных культурах посредством осмотического шока с последующей хроматографической очисткой. Данный процесс выполняли для каждого из 10 биоконъюгатов.

[0343] Полученные таким образом биоконъюгаты О-антигенов *E. coli*, которые являются лекарственными субстанциями (DS) для ExPEC10V и ExPEC4V, продемонстрировали сопоставимые критические показатели качества: (1) связанная с процессом чистота (измеренная с помощью RP-HPLC) составляла выше чем 95%, (2) отношение полисахарид/белок находилось в диапазоне от приблизительно 0,1 до 0,5, в основном от 0,15 до 0,45, (3) содержание бактериальных эндотоксинов (Европейская Фармакопея, раздел 2.2.3) составляло менее чем 0,5 ЕЭ/мкг полисахарида. Средняя длина отдельных полисахаридных цепей, как правило, составляла приблизительно 10-20 повторяющихся звеньев (измерено с применением SDS-PAGE высокого разрешения).

[0344] Структуры полисахаридных повторяющихся звеньев были подтверждены (посредством ЯМР и MS/MS конъюгатов, интактных или расщепленных трипсином) как структуры, показанные в формулах для соответствующих серотипов в таблице 1 для всех десяти биоконъюгатов, которые являются DS, для вышеописанной композиции ExPEC10V.

[0345] Лекарственный продукт (DP) ExPEC10V содержит смесь из десяти вышеописанных моновалентных DS.

<u>Пример 5. Токсикологические характеристики вакцины ExPEC10V</u>

[0346] Пробное исследование токсичности и местной переносимости однократной дозы (не соответствующее GLP) с ExPEC10V проводили на самках кроликов NZW. Одна группа (n=2) получила внутримышечную (IM) инъекцию (в день 0) контрольного

раствора (физиологического раствора), а вторая группа (n=4) получала IM инъекцию ExPEC10V в общей сложности 105,6 мкг полисахарида (PS)/доза (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) с использованием объема вводимой дозы 0,6 мл (176 мкг PS/мл). Вскрытие осуществляли в день 2.

[0347] Летальных исходов не наблюдалось. Кроме того, в клинических наблюдениях не было отмечено эффектов, связанных с вакциной (включая эффекты в участке инъекции с использованием баллов Дрейза), в отношении веса тела, потребления пищи и температуры тела. Гистопатологически в участке введения или в дренирующем (подвздошном) лимфатическом узле не наблюдалось изменений, связанных с вакциной. Минимальное увеличение образования зародышевых центров в селезенке наблюдалось у одного из четырех обработанных животных (день 2) и считалось нормальным иммунным ответом на инъецированную вакцину. В целом введение однократной внутримышечной дозы ExPEC10V самкам кроликов хорошо переносилось.

<u>Пример 6. Иммуногенность смешанного состава ExPEC10V у кроликов</u>

[0348] Было ранее показано, что вакцина ExPEC4V (содержащая биоконъюгаты серотипов O1A, O2, O6A и O25B *E .coli*) 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, 2019, Lancet Infect Dis 19(6): 631-640, http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30803-X). Иммуногенность биоконъюгатов серотипов O4-Glu+, O8, O15, O16, O18A и O75 *E. coli* (все из которых содержат EPA-2 в качестве белка-переносчика) при раздельном введении (в моновалентной форме) крысам подтвердила, что также каждый из этих биоконъюгатов был иммуногенным, поскольку данные ELISA показали, что каждый из этих биоконъюгатов может вызывать выработку высоких уровней антител, специфичных к О-антигену *E. coli* (не показано).

[0349] Также тестировали иммуногенность 10-валентной вакцины, которая содержала смесь 10 биоконъюгатов, как описано выше. Новозеландские белые (NZW) кролики (самки, возраст 12-16 недель) получали 3 внутримышечные иммунизации с помощью ExPEC10V или физиологического раствора, вводимых с интервалом в 2 недели (таблица 5; введение в дни 0, 14 и 27). 10 полисахаридов, являющихся частью

вакцины ExPEC10V, используемой в этих экспериментах, были конъюгированы с белком-переносчиком EPA, содержащим 4 участка гликозилирования (EPA-4). Вакцину составляли в 3 различных дозах: группа 1 ("высокая доза"): 8 мкг/доза O1A, O2, O6A, O4, O8, O15, O16, O18 и O75 и 16 мкг/доза O25B; группа 2 ("средняя доза"): 4 мкг/доза O2, O4, O8, O15, O16, O18 и O75, 8 мкг/доза O1A и O6A и 16 мкг/доза O25B; группа 3 ("низкая доза"): 0,4 мкг/доза O2, O4, O8, O15, O16, O18 и O75, 0,8 мкг/доза O1A и O6A и 1,6 мкг/доза O25B. Животные из контрольной группы (группа 4) получали только физиологический раствор (0,9% (вес/об.) раствор хлорида натрия) (таблица 5).

[0350] Ответы с образованием антител оценивали в день 0 (до иммунизации) и в дни 14, 27 и 42 после иммунизации. Уровни антител в сыворотке крови, индуцированные каждым из биоконъюгатов, включенных в вакцину, и белком-переносчиком EPA, измеряли посредством ELISA (общий IgG) с использованием типоспецифических LPS в качестве материала для покрытия. О титрах антител сообщалось как о значениях EC50, которые соответствуют полумаксимальной эффективной концентрации, на основании двух повторностей кривых 12-стадийного титрования, построенных в 4-параметрической модели логистической нелинейной регрессии. Функциональную активность определяли посредством OPK.

Таблица 5. Описание экспериментальных групп

Экспериментальные группы	**Введение доз (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% (вес/об.) раствор хлорида натрия	7

[0351] Результаты показаны на фиг. 1 и обобщены в таблице 6.

Таблица 6. Краткое описание ответов с образованием антител, специфичных к О-антигенам *E. coli*, индуцированных ExPEC10V у кроликов NZW

ExPEC10V	Ответы с образованием антител в день 14 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	Ответы с образованием антител в день 27 после вакцинации									
Доза	O1A	O2	O6A	O25B	O4	O8	O15[#]	O16	O18A	O75
Высокая	**	**	**	**	**	*	**	**	**	**
Средняя	**	**	**	**	**	*	**	**	*	**
Низкая	**	**	**	**	**	*	**	**	**	**

ExPEC10V	Ответы с образованием антител в день 42 после вакцинации									
Доза	O1A	O2	O6A	O25B	O4	O8	O15[#]	O16	O18A	O75
Высокая	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
Средняя	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
Низкая	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**

Ответы с образованием специфичных в отношении серотипа антител, при которых p-значения свидетельствовали о статистической значимости, показаны звездочками. Ответы с образованием специфичных в отношении серотипа антител, при которых p-значения не свидетельствовали о статистической значимости, обозначены как ns. Критерий суммы рангов Уилкоксона с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. Сравнения животных, вакцинированных с помощью ExPEC10V (группы 1, 2 и 3), и контрольных животных, получавших физиологический раствор (группа 4). *$p \leq 0{,}05$, **$p \leq 0{,}01$. [#] P-значения свидетельствовали о статистической значимости после исключения животного с выпадающими значениями из контрольной группы (анализ чувствительности).

[0352] Высокая доза ExPEC10V (группа 1) индуцировала значительно более высокие уровни антител IgG во все исследованные моменты времени (14, 27 и 42 дни после иммунизации) по сравнению с контрольным физиологическим раствором для

O1A, O2, O4, O6A, O16, O18A и O25B (фиг. 2, таблица 6). Значительно более высокие титры антител, индуцированные конъюгатами O8 и O75, по сравнению с контрольным физиологическим раствором наблюдались в дни 27 и 42 после иммунизации (фиг. 1, таблица 6).

[0353] Средняя доза ExPEC10V (группа 2) и низкая доза (группа 3) индуцировали значительно более высокие уровни антител IgG во все исследованные моменты времени (14, 27 и 42 дни после иммунизации) по сравнению с контрольным физиологическим раствором для O1A, O2, O4, O6A, O16 и O25B (фиг. 1, таблица 6). Значительно более высокие титры антител, индуцированные конъюгатами O8, O18A и O75, по сравнению с контрольным физиологическим раствором наблюдались в дни 27 и 42 после иммунизации, что свидетельствует о том, что бустерная доза у кроликов усиливает ответ на эти O-серотипы (фиг. 1, таблица 6).

[0354] Для конъюгатов O15 анализ чувствительности с исключением животного с выпадающими значениями из контрольной группы продемонстрировал, что все три дозы вакцины ExPEC10V индуцировали значительное усиление ответов с образованием антител по сравнению с контрольным физиологическим раствором в дни 14, 27 и 42 после иммунизации (фиг. 1, таблица 6).

[0355] Уровни антител, индуцированных белком-переносчиком EPA, были значительно выше, чем титры антител к EPA в группе, обработанной физиологическим раствором (контрольной), для трех тестируемых доз ExPEC10V (высокая, средняя и низкая) во все исследуемые моменты времени (дни 14, 27 и 42) (фиг. 1).

[0356] Сравнение между дозами (не показано) продемонстрировало, что в день 14 после вакцинации высокая доза ExPEC10V индуцировала значительно более сильные ответы с образованием антител по сравнению с низкой дозой для большинства тестируемых конъюгатов (O1A, O2, O4, O6A, O15, O16, O18A и O25B). Средняя доза ExPEC10V также индуцировала значительно более сильные ответы с образованием антител по сравнению с низкой дозой для O1A, O2, O4, O18A, O25B и O75. Что касается конъюгата O8, то все три состава ExPEC10V индуцировали одинаковые уровни антител в день 14 после вакцинации.

[0357] Низкая доза ExPEC10V индуцировала значительное усиление ответов с образованием антител в день 42 после вакцинации (после первичной и двух бустерных доз) по сравнению с высокими и средними дозами ExPEC10V для конъюгатов O1A, O2, O4, O16, O25B и O75. Эти результаты согласуются с другим опытом использования конъюгированных вакцин, где, например, у младенцев,

вакцинированных пневмококковой конъюгированной вакциной, не наблюдалось четкой взаимосвязи между дозой и величиной ответа с образованием антител при первичной вакцинации (Poolman JT, et al. Expert Rev Vaccines. 2013, 12(12):1379-94).

[0358] Не было никаких значимых различий между тремя дозами ExPEC10V, тестируемыми в день 42 после вакцинации для конъюгатов O6A, O8 и O15. Что касается конъюгата O18A, высокая доза ExPEC10V индуцировала значительно более сильный ответ с образованием антител по сравнению со средней дозой в день 42 после вакцинации.

[0359] Что касается белка-переносчика (EPA), то высокая и средняя дозы ExPEC10V индуцировали значительно более сильные ответы с образованием антител по сравнению с низкой дозой в день 14 после вакцинации. Высокая доза вакцины также индуцировала значительно более сильные ответы с образованием антител по сравнению с низкой дозой в день 42 после вакцинации.

[0360] В заключение, три состава ExPEC10V (высокая, средняя и низкая дозы), вводимые посредством внутримышечной инъекции в дни 0, 14, 27, являются иммуногенными у кроликов.

[0361] На данный момент функциональные антитела, способные уничтожать штаммы *E. coli*, индуцированные этой вакциной у кроликов, были продемонстрированы для серотипов O1A, O2, O4, O6A, O15, O16 и O25B.

[0362] В дополнительном эксперименте получали партию вакцины ExPEC10V согласно GMP (в отношении получения см. пример 4 выше), и ее инъецировали кроликам NZW в качестве части токсикологического исследования (таблица 7). В данном исследовании кролики NZW (самцы и самки) получали 3 внутримышечные инъекции (0,6 мл) вакцины ExPEC10V (дни 1, 15 и 29), а контрольная группа получала 0,9% (вес/об.) раствора хлорида натрия (физиологического раствора). Каждая доза вакцины содержала 9,6 мкг полисахарида (PS) в случае с серотипами O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A и O75 и 19,2 мкг в случае с серотипом O25B, что соответствует в общей сложности 105,6 мкг PS (в общей сложности 176 мкг PS/мл) и в общей сложности 382,8 мкг EPA (638 мкг EPA/мл). Титры IgG к O-антигенам и белкам-переносчикам (EPA) определяли из образцов, собранных в период до лечения (день 1) и в дни 31 и 50 после иммунизации.

[0363] Значительное усиление ответов с образованием антител против всех O-антигенов и белка-переносчика EPA наблюдалось в дни 31 и 50 после вакцинации в группе, получавшей ExPEC10V, по сравнению с контрольной группой, которая

получала только физиологический раствор (фиг. 2, таблица 8). Для серотипа O1A значительно более сильный ответ с образованием антител также наблюдался в день 1 (исходный уровень), когда вакцинированных животных сравнивали с контролями. Эти результаты позволяют предположить, что некоторые животные были предварительно подвергнуты воздействию *E. coli* или имели антитела, которые перекрестно реагируют с O1A-LPS.

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

Группы	**Обработка**	**Доза**	**Дни введения доз**	**Основной период (день 31) (самцы/самки)**	**Восстановление (день 50) (самцы/самки)**
1	контроль	0	1, 15, 29	10	10
2	ExPEC10V	105,6 мкг PS*	1, 15, 29	10	10

*Каждая доза (объем вводимой дозы 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) в случае с серотипами O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B, O75 соответственно (всего 176 мкг PS/мл). Каждая доза содержит 382,8 мкг белка EPA (638 мкг EPA/мл).

Таблица 8. Иммуногенность ExPEC10V у кроликов NZW как часть токсикологического исследования

Обработка	Ответы с образованием антител в день 14 после вакцинации									
ExPEC10V	O1A	O2	O6A	O25B	O4	O8	O15	O16	O18A	O75
День 31	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
День 50	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****

Ответы с образованием антител, индуцированные ExPEC10V. Серотипы, для которых наблюдалось значительное усиление ответов с образованием антител в вакцинированной группе по сравнению с контролем, показаны звездочками. Тобит-модель с критерием отношения правдоподобия. ****$P \leq 0{,}0001$.

<u>Пример 7. Испытание фазы 1/2a вакцины ExPEC10V у людей</u>

[0364] В настоящее время не существует доступной вакцины для предупреждения IED. Серотипы, входящие в состав вакцины ExPEC10V (O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75), были выбраны для борьбы с инвазивными заболеваниями, вызываемыми большинством клинически значимых штаммов ExPEC, которые также представляют большинство изолятов ExPEC, вызывающих устойчивые к противомикробным препаратам IED, включая ST131. Выбранные серотипы являются репрезентативными для десяти преобладающих O-серотипов ExPEC, вызывающих инфекции кровотока у пожилых людей, и ответственны за примерно 70% инфекций кровотока, вызываемых ExPEC.

[0365] Поскольку предполагается, что механизм действия конъюгированных вакцин для предупреждения инвазивного заболевания не будет зависеть от механизмов устойчивости к антибиотикам, то считается, что вакцина ExPEC10V обеспечивает защиту от IED, вызванных устойчивыми к лекарственным средствам и чувствительными к лекарственным средствам серотипами O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75.

[0366] Имеется предшествующий клинический опыт с ExPEC4V, более ранней вакциной-кандидатом, которая содержала подмножество из четырех конъюгатов O-антигенов (O1A, O2, O6A и O25B) *E. coli*, также обнаруженных в ExPEC10V. На основании результатов четырех завершенных клинических исследований (два исследования фазы 1, два исследования фазы 2) ExPEC4V хорошо переносилась участниками исследования, и никаких сигналов по безопасности, связанных с вакциной, не наблюдалось при дозах вплоть до 16 мкг полисахарида (PS) на серотип (O1A, O2, O6A и O25B). Большинство нежелательных явлений (AE) были 1 и 2 степени, при этом было зарегистрировано очень мало AE 3 степени. Зафиксированные в процессе опроса местные AE с поздним началом (AE, которые начинаются после дня 5 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, и при этом увеличивается титр специфичного к O-антигену иммуноглобулина G (IgG), как измерено посредством твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Функциональная активность антител была продемонстрирована с помощью оптимизированного для ExPEC4V анализа опсонофагоцитарного уничтожения (OPKA). Совместный анализ результатов теста ELISA и OPKA продемонстрировал корреляцию между ответами в анализе (коэффициенты корреляции Пирсона $\geq$ 0,61 и $\geq$ 0,48 в день 30 и 360 соответственно в

клиническом испытании фазы 2 [исследование 4V-BAC2001]), что обосновывает применение ELISA в качестве основного показателя титров антител ExPEC4V и для предсказания функциональной активности антител. Анализ данных в отношении иммуногенности продемонстрировал устойчивость иммунного ответа в течение трех лет после вакцинации ExPEC4V. В настоящее время также наблюдалось, что образцы сыворотки крови людей, вакцинированных с помощью ExPEC4V и имеющих высокие титры специфичных в отношении серотипа опсонофагоцитарных антител, в случае пассивного переноса мышам, которых впоследствии внутрибрюшинно заражали штаммами серотипа O25B или O2 *E. coli*, были способны опосредовать защиту *in vivo*, что демонстрируется по значительному снижению количества колоний *E. coli* (КОЕ) в крови, селезенке и печени (данные не показаны). Следовательно, специфичные к ExPEC4V опсонофагоцитарные человеческие антитела опосредуют уничтожение бактерий *in vivo*, что согласуется с другими конъюгированными вакцинами, в которых предполагаемый механизм защиты заключается в индукции опсонофагоцитарных антител, которые опосредуют уничтожение бактерий.

[0367] ExPEC10V включает в общей сложности десять серотипов и увеличивает охват от приблизительно 50% (ExPEC4V) до примерно 70% инфекций кровотока, вызываемых ExPEC, у взрослых в возрасте 60 лет и старше. На основании клинического опыта с ExPEC4V и доклинических данных для ExPEC10V, как обсуждалось в приведенных выше примерах, ожидалось, что введение ExPEC10V будет индуцировать иммунный ответ на серотипы O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75 *E. coli* также у людей. Каждый из полисахаридных O-антигенов (PS) по отдельности биоконъюгирован с белком-переносчиком — генетически детоксифицированной формой экзотоксина A (EPA), полученной из *Pseudomonas aeruginosa*, и его получение было описано выше. PS O4 представляет собой глюкозилированную форму, имеющую структуру формулы (O4-Glc+) в таблице 1.

[0368] Рандомизированное слепое для наблюдателя впервые проводящееся с участием людей исследование фазы 1/2a для оценки безопасности, реактогенности и иммуногенности трех различных доз вакцины ExPEC10V проводили у людей в возрасте от 60 до 85 лет со стабильным состоянием здоровья (исследование 10V-BAC1001). План исследования включает 2 когорты: всего в исследование включено 824 участника, из них 404 участника (100 участников/доза ExPEC10V) в возрасте от ≥ 60 до ≤ 85 лет со стабильным состоянием здоровья в когорте 1 и дополнительно примерно 420 участников (280 в группе ExPEC10V и 140 в группе плацебо) в возрасте

≥ 60 лет со стабильным состоянием здоровья с UTI в анамнезе в течение последних 5 лет в когорте 2 (первоначально в когорту 2 планировалось включить 600 участников, но это количество было сокращено в ходе исследования до примерно 420 с некоторыми адаптациями протокола).

ЦЕЛИ И КОНЕЧНЫЕ ТОЧКИ

[0369] КОГОРТА 1 — период слепого для наблюдателя исследования фазы 1/2a с периодом открытого долгосрочного последующего наблюдения (N=404)

Цели	Конечные точки
Первичные	
• Оценить безопасность и реактогенность различных доз ExPEC10V у участников в возрасте от ≥ 60 до ≤ 85 лет	• Зафиксированные в процессе опроса местные и системные нежелательные явления (AE), собранные в течение 14 дней после вакцинации (от дня 1 до дня 15) • Сообщаемые добровольно AE, собранные с момента введения исследуемой вакцины до 29 дней после вакцинации (от дня 1 до дня 30) • Серьезные нежелательные явления (SAE), собранные от момента введения исследуемой вакцины до дня 181
• Оценить дозозависимую иммуногенность ExPEC10V в день 15 у участников в возрасте от ≥ 60 до ≤ 85 лет	• Титры антител к ExPEC10V, определенные посредством мультиплексного электрохемилюминесцентного (ECL) иммуноанализа и мультиплексного опсонофагоцитарного анализа (MOPA) в день 15
Вторичные	

• Оценить корреляцию между титрами в сыворотке крови в мультиплексном иммуноанализе на основе ECL (общие антитела) и MOPA (функциональные антитела) в день 15	• Титры антител к ExPEC10V, определенные посредством мультиплексного иммуноанализа на основе ECL и MOPA в день 15
• Оценить дозозависимую иммуногенность ExPEC10V в дни 30 и 181 у участников в возрасте от ≥ 60 до ≤ 85 лет	• Титры антител к ExPEC10V, определенные посредством мультиплексного иммуноанализа на основе ECL и MOPA в дни 30 и 181

Цели	**Конечные точки**
• Оценить в период долгосрочного последующего наблюдения (LTFU) безопасность дозы ExPEC10V, выбранной для дополнительного клинического исследования на основании первичного анализа в день 30 у участников в возрасте от ≥ 60 до ≤ 85 лет	• SAE, связанные с исследуемой вакциной или процедурами исследования, собранные от дня 182 до конца исследования
• Оценить в период LTFU иммуногенность дозы ExPEC10V, выбранной для дополнительного клинического исследования на основании первичного анализа в день 30	• Титры антител к ExPEC10V, определенные посредством мультиплексного иммуноанализа на основе ECL и MOPA в год 1 (день 366), год 2 (день 731) и год 3 (день 1096)

[0370] КОГОРТА 2 — период двойного слепого исследования с периодом двойного слепого долгосрочного последующего наблюдения (N=420)

Цели	Конечные точки
Первичные	
• Оценить безопасность и реактогенность выбранной дозы ExPEC10V у участников в возрасте ≥ 60 лет с UTI в анамнезе за последние 5 лет	• Зафиксированные в процессе опроса местные и системные AE, собранные в течение 14 дней после вакцинации (от дня 1 до дня 15) • Сообщаемые добровольно AE, собранные с момента введения исследуемой вакцины до 29 дней после вакцинации (от дня 1 до дня 30) • SAE, собранные от момента введения исследуемой вакцины до дня 181
• Оценить иммуногенность выбранной дозы ExPEC10V в день 30 у участников в возрасте ≥ 60 лет с UTI в анамнезе за последние 5 лет	• Титры антител к ExPEC10V, определенные посредством мультиплексного иммуноанализа на основе ECL и MOPA в день 30
Вторичные	
• Оценить корреляцию между титрами в сыворотке крови в мультиплексном иммуноанализе на основе ECL (общие антитела) и MOPA (функциональные антитела) в день 30 у участников в возрасте ≥ 60 лет с UTI в анамнезе за последние 5 лет	• Титры антител к ExPEC10V, определенные посредством мультиплексного иммуноанализа на основе ECL и MOPA в день 30
• Оценить иммуногенность выбранной дозы ExPEC10V в дни 15 и 181 у участников в возрасте ≥ 60 лет с UTI в анамнезе за последние 5 лет	• Титры антител к ExPEC10V, определенные посредством мультиплексного иммуноанализа на основе ECL в дни 15 и 181 и MOPA в день 181

Цели	Конечные точки
• Оценить в период LTFU безопасность выбранной дозы ExPEC10V у участников в возрасте ≥ 60 лет с UTI в анамнезе за последние 5 лет	• SAE, связанные с исследуемой вакциной или процедурами исследования, собранные от дня 182 до конца исследования
• Оценить в период LTFU иммуногенность выбранной дозы ExPEC10V у участников в возрасте ≥ 60 лет с UTI в анамнезе за последние 5 лет	• Титры антител к ExPEC10V, определенные посредством мультиплексного иммуноанализа на основе ECL и MOPA в год 1 (день 366), год 2 (день 731) (не применимо для MOPA) и год 3 (день 1096)
Поисковые	
• Оценить эффект ExPEC10V в отношении микробиома кишечника (стул) посредством метагеномного анализа.	• Метагеномное исследование образцов стула от выбранной подгруппы участников для оценки эффекта ExPEC10V в отношении: – преобладания патогенов (например, *Clostridium difficile*) в кишечной микрофлоре; – преобладания серотипов ExPEC10V в кишечной микрофлоре

ОБЩИЙ ПЛАН

[0371] Это рандомизированное многоцентровое интервенционное исследование, включающее две когорты.

[0372] Для когорты 1 исследование имеет слепой для наблюдателя контролируемый по активному препарату план, и в него включены в общей сложности 404 взрослых участника в возрасте от ≥ 60 до ≤ 85 лет со стабильным состоянием здоровья с UTI в анамнезе или без нее. План исследования для когорты 1 состоит из трех периодов: максимум 28-дневный скрининговый период, 181-дневный период слепого для наблюдателя последующего наблюдения с вакцинацией в день 1 и период открытого LTFU, который длится от дня 182 до 3 лет (дня 1096) после вакцинации

(фиг. 3A). В период LTFU переходят только участники из группы с выбранной дозой ExPEC10V (примерно 100 участников) и участники из группы Prevnar 13. Концом исследования в когорте 1 является визит последнего участника в год 3 (день 1096).

[0373] Для когорты 2 исследование имеет двойной слепой плацебо-контролируемый план, и в него были включены в общей сложности примерно 420 взрослых участников в возрасте ≥ 60 лет со стабильным состоянием здоровья и с UTI в анамнезе за последние 5 лет. Включение в исследование начиналось после завершения первичного анализа фазы 1/2a и выбора дозы ExPEC10V в когорте 1. План исследования для когорты 2 состоит из трех периодов: максимум 28-дневный скрининговый период, 181-дневный период двойного слепого последующего наблюдения с вакцинацией в день 1 и период двойного слепого LTFU, который длится от дня 182 до 3 лет (дня 1096) после вакцинации (фиг. 3B). Все участники когорты 2 переходят в период LTFU. Концом исследования в когорте 2 является визит последнего участника в год 3 (день 1096).

Когорта 1: фаза 1

[0374] В фазе 1 когорты 1 всего 84 участника были включены в исследование в подходе с разнесением по времени после поэтапных процедур повышения дозы с локальными оценками безопасности до перехода от одной стадии к другой. Внутренней Комиссии по контролю данных (DRC) для этого исследования было поручено рассмотреть данные физикального осмотра (на исходном уровне, а также целевые), демографические данные на исходном уровне и данные в отношении безопасности через 14 дней после вакцинации (включая зафиксированные в процессе опроса местные и системные AE, сообщаемые добровольно AE, SAE, клинико-лабораторные данные и показатели жизненно важных функций) у этих 84 участников фазы 1. В этой фазе исследования участники были включены в исследование и рандомизированы за шесть стадий.

Стадия 1: были включены в исследование и рандомизированы четыре участника из сигнальной когорты; два участника в группе низкой дозы ExPEC10V (таблица 11) и по одному участнику в каждой из групп ExPEC4V и Prevnar 13.

Стадия 2: были включены в исследование и рандомизированы двадцать четыре участника; 18 участников в группе низкой дозы ExPEC10V (таблица 11) и по три участника в каждой из групп ExPEC4V и Prevnar 13.

Стадия 3: были включены в исследование и рандомизированы четыре участника из сигнальной когорты; два участника в группе средней дозы ExPEC10V (таблица 11) и

по одному участнику в каждой из групп ExPEC4V и Prevnar 13.

Стадия 4: были включены в исследование и рандомизированы двадцать четыре участника; 18 участников в группе средней дозы ExPEC10V (таблица 11) и по три участника в каждой из групп ExPEC4V и Prevnar 13.

Стадия 5: были включены в исследование и рандомизированы четыре участника из сигнальной когорты; два участника в группе высокой дозы ExPEC10V (таблица 11) и по одному участнику в каждой из групп ExPEC4V и Prevnar 13.

Стадия 6: были включены в исследование и рандомизированы двадцать четыре участника; 18 участников в группе высокой дозы ExPEC10V (таблица 11) и по три участника в каждой из групп ExPEC4V и Prevnar 13.

[0375] Все участники получали однократную внутримышечную (IM) инъекцию либо ExPEC10V (1 из 3 доз), либо ExPEC4V, либо Prevnar 13 в день 1 согласно назначенным исследуемым группам вакцинации. С четырьмя участниками из сигнальной когорты на каждой из стадий 1, 3 и 5 связывались по телефону через 24 часа после вакцинации для сбора информации в отношении безопасности. Слепые данные в отношении безопасности за период 24 часов после вакцинации в каждой группе из четырех участников из сигнальной когорты рассматривались главным исследователем (PI), ответственным врачом-исследователем (SRP) и главным спонсором медицинского исследования (SML). Рандомизацию дополнительных участников для следующей стадии приостанавливали до завершения этой оценки безопасности в сигнальной когорте в день 2.

[0376] При отсутствии каких-либо клинически значимых результатов были включены в исследование еще 24 участника (для стадий 2, 4 и 6), которые были рандомизированы в одну из трех исследуемых групп вакцинации (таблица 11) для получения однократной IM инъекции ExPEC10V (1 из 3 доз), ExPEC4V либо Prevnar 13 в день 1.

[0377] После вакцинации дополнительных 24 участников на каждом уровне дозы (низкая доза на стадии 2, средняя доза на стадии 4 и высокая доза на стадии 6) данные в отношении безопасности через 14 дней после вакцинации для всех 28 (4+24) участников на каждом уровне дозы рассматривались DRC перед переходом к следующему уровню дозы или фазе 2a.

<u>Когорта 1: фаза 2a</u>

[0378] На основании приемлемой безопасности и реактогенности (при отсутствии каких-либо опасений в отношении безопасности или каких-либо явлений, отвечающих конкретному правилу приостановки исследования), как определено DRC после рассмотрения данных в отношении безопасности за период 14 дней после вакцинации для первоначальных 84 участников, остальных 320 участников из когорты 1 рандомизировали, и вводили им дозы в фазе 2а исследования. Этих дополнительных 320 участников включали в исследование и рандомизировали параллельно в соотношении 2:2:2:1:1 в одну из пяти исследуемых групп вакцинации для получения однократной IM инъекции ExPEC10V (1 из 3 доз), ExPEC4V либо Prevnar 13 в день 1 (таблица 11). В дополнение к проведению 14-дневного рассмотрения безопасности для первоначальных 84 участников, DRC также оценивает данные в отношении безопасности когорты 1 в ходе исследования и анализирует любые явления, которые соответствуют конкретному правилу приостановки вакцинации в исследовании или любым другим проблемам безопасности, которые могут возникать.

[0379] Для когорты 1 первичный анализ проводился, когда все участники завершали визит в день 30 (визит 4) или прекращали участие раньше. Окончательный анализ выполнялся, когда все участники завершали визит в день 181 или прекращали участие раньше. Для участников, переходящих к периоду открытого долгосрочного последующего наблюдения (LTFU) (группа с выбранной дозой ExPEC10V и группа Prevnar 13), ежегодные анализы последующего наблюдения включают данные в отношении безопасности и иммуногенности (мультиплексный иммуноанализ на основе ECL и MOPA), собранные до момента визита в год 1 (день 366), год 2 (день 731) и год 3 (день 1096) после вакцинации.

Когорта 2

[0380] В когорте 2 безопасность, реактогенность и иммуногенность выбранной дозы ExPEC10V (на основании результатов первичного анализа когорты 1 была выбрана высокая доза) оценивают у участников в возрасте ≥ 60 лет со стабильным состоянием здоровья и с UTI в анамнезе за последние 5 лет. Для когорты 2 исследование имеет двойной слепой плацебо-контролируемый план, и в общей сложности примерно 420 участников были включены в исследование и рандомизированы параллельно в соотношении 2:1 (примерно 280 участников в группе ExPEC10V и примерно 140 в группе плацебо).

[0381] Все участники получали однократную IM инъекцию выбранной дозы ExPEC10V либо плацебо в день 1 согласно назначенным исследуемым группам вакцинации (таблица 12).

[0382] Для когорты 2 первичный анализ включает данные в отношении безопасности и иммуногенности и выполняется, когда все участники завершают визит в день 30 (визит 4) или прекращают участие раньше. Окончательный анализ выполнялся, когда все участники завершали визит в день 181 или прекращали участие раньше. Для всех участников ежегодные анализы последующего наблюдения включают данные в отношении безопасности и иммуногенности (мультиплексный иммуноанализ на основе ECL и MOPA), собранные до момента визита в год 1 (день 366), год 2 (день 731) (не применимо для MOPA) и год 3 (день 1096) после вакцинации.

[0383] Анализ образцов стула проводится у выбранной подгруппы участников для оценки эффекта ExPEC10V в отношении преобладания патогенов (например, *Clostridium difficile*) и серотипов ExPEC10V в кишечной микрофлоре с использованием метагеномики.

КОЛИЧЕСТВО УЧАСТНИКОВ

[0384] В исследование было включено в общей сложности примерно 824 участников: 404 участника в когорте 1 и примерно 420 участников в когорте 2.

ИНТЕРВЕНЦИОННЫЕ ГРУППЫ: описание интервенций

[0385] **ExPEC10V**: биоконъюгированная вакцина *E. coli* в фосфатно-буферном растворе, содержащая O-антигенные PS серотипов O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75 ExPEC, по отдельности биоконъюгированные с белком-переносчиком EPA. Однократная IM (в дельтовидную мышцу) инъекция 0,5 мл одной из трех доз ExPEC10V в день 1.

[0386] **ExPEC4V**: биоконъюгированная вакцина *E. coli* в буферном физиологическом растворе, содержащая O-антигенные PS серотипов O1A, O2, O6A, O25B ExPEC (4:4:4:8 мкг PS/серотип ExPEC), по отдельности биоконъюгированные с белком-переносчиком EPA. Однократная IM (в дельтовидную мышцу) инъекция 0,5 мл ExPEC4V в день 1.

[0387] **Prevnar 13**: стерильная суспензия сахаридов капсульных антигенов серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F *Streptococcus pneumoniae*, по отдельности связанных с нетоксичным дифтерийным белком CRM197. Однократная IM (в дельтовидную мышцу) инъекция 0,5 мл в день 1, поставляется в предварительно заполненном шприце с однократной дозой.

[0388] **Плацебо**: нормальный физиологический раствор. Однократная IM (в дельтовидную мышцу) инъекция 0,5 мл плацебо в день 1.

[0389] Материалы интервенционного исследования ExPEC описаны в таблице 9.

Таблица 9. Исследуемые вакцины ExPEC BAC1001MV

Группа исследования	**O1A** (мкг)	**O2** (мкг)	**O4** (мкг)	**O6A** (мкг)	**O8** (мкг)	**O15** (мкг)	**O16** (мкг)	**O18A** (мкг)	**O25B** (мкг)	**O75** (мкг)	**EPA** (мкг)	**PS (всего)** (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 детоксифицированная форма экзотоксина A, полученная из *Pseudomonas aeruginosa*; PS = полисахарид

ExPEC4V состоит из полисахаридных (PS) O-антигенов серотипов O1A, O2, O6A и O25B ExPEC, биоконъюгированных по отдельности с белком-переносчиком EPA.

ExPEC10V состоит из полисахаридных (PS) O-антигенов серотипов O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75 ExPEC, биоконъюгированных по отдельности с белком-переносчиком EPA.

Доза указана в расчете только на PS. EPA (мкг) являются измеренными значениями.

[0390] ExPEC10V состоит из 10 моновалентных лекарственных субстанций (DS). Для данного клинического исследования получают 2 различные концентрации (среднюю и высокую) лекарственного продукта (DP) (таблица 10). Третью (низкую) концентрацию получают в клинических условиях путем разбавления высокой концентрации 1:1 с помощью буфера для разбавления, который является точно таким же, как буфер для составления. Каждый DP составлен в натрий/калий-фосфатном буфере при pH 7,0 (0,02% [вес/вес] полисорбата 80, 5% [вес/вес] сорбита, 10 мМ метионина).

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

Ингредиент	**Количество (мкг/мл)[a]**		
Активный ингредиент[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-переносчик			
EPA	320	441	640

Вспомогательные вещества	
KH_2PO_4	6,19 мМ
Na_2HPO_4	3,81 мМ
Сорбит	5% (вес/вес)
Метионин	10 мМ
Полисорбат 80	0,02% (вес/вес)

EPA = генетически детоксифицированный экзотоксин A *P. aeruginosa*, используемый в качестве белка-переносчика.

[a] Активный ингредиент представляет собой биологически синтезированный конъюгат, состоящий из PS- антигена и белка-переносчика (EPA); доза рассчитана только для PS-фрагмента.

[b] "Низкую концентрацию" получают в клинических условиях путем разбавления "высокой концентрации" 1:1 с помощью буфера для разбавления.

ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ

[0391] Ключевые оценки безопасности включают зафиксированные в процессе опроса местные и системные AE, сообщаемые добровольно AE, SAE, данные физикального осмотра, измерения показателей жизненно важных функций и клинико-лабораторные тесты.

ОЦЕНКИ ИММУНОГЕННОСТИ

[0392] Ключевые оценки иммуногенности собранной сыворотки крови включают оценку уровней общих антител IgG, специфичных в отношении серотипов ExPEC10V и ExPEC4V, вырабатываемых в ответ на вакцину, согласно измерениям в мультиплексном иммуноанализе на основе ECL, а также уровней функциональных антител, специфичных в отношении серотипов ExPEC10V и ExPEC4V, согласно измерениям в анализе опсонофагоцитарного уничтожения (OPKA) в мультиплексном формате (MOPA). Оценки иммуногенности титров антител к пневмококкам, вырабатываемых в ответ на Prevnar 13, не проводились.

[0393] Уровни антител в сыворотке крови, индуцированных ExPEC10V, измеряют посредством мультиплексного электрохемилюминесцентного иммуноанализа (ECL). В этом анализе объединены углеродные электроды с высоким связыванием в формате многопятенного 96-луночного микропланшета, который покрыт различными

антигенами O-LPS *E. coli* или белком-переносчиком EPA. Уровни антиген-специфических антител, присутствующих в образцах сыворотки крови, выявляют с использованием вторичного антитела (антитела к IgG человека), меченного с помощью SULFO-TAG. SULFO-TAG испускает свет в присутствии электрической стимуляции с интенсивностью, которая увеличивается пропорционально количеству связавшихся антител IgG. Этот анализ был квалифицирован в соответствии с рекомендациями Международной конференции по гармонизации (ICH).

[0394] Уровни функциональных антител, индуцированных ExPEC10V, измеряют посредством мультиплексного опсонофагоцитарного анализа (MOPA). Вкратце, образцы сыворотки крови, инактивированные нагреванием, подвергают серийному разведению и инкубируют с различными штаммами *E. coli*, которые демонстрируют специфическую устойчивость к различным типам антибиотиков. После этого к реакционной смеси добавляют человеческий комплемент и фагоцитарные клетки (HL60), и после второго периода инкубации аликвоту реакционной смеси переносят на различные фильтровальные планшеты с гидрофильной мембраной из PVDF, содержащие среды с добавлением специфического антибиотика, который обеспечивает избирательный рост штамма, устойчивого к этому конкретному антибиотику. После роста в течение ночи подсчитывают колониеобразующие единицы (КОЕ) для определения количества выживших бактерий. Этот анализ был квалифицирован в соответствии с рекомендациями ICH.

[0395] Для антител к серотипу ExPEC10V, как измерено посредством мультиплексного иммуноанализа на основе ECL и MOPA, и EPA, как измерено посредством только мультиплексного иммуноанализа на основе ECL, следующие показатели иммуногенности оцениваются и заносятся в таблицы согласно исследуемым группам вакцинации для всех моментов времени иммуногенности:

- доля участников с ≥ 2-кратным и ≥ 4-кратным увеличением титров антител в сыворотке крови с дня 1 (до вакцинации);
- среднее геометрическое титра (GMT);
- GMR – кратность изменения по сравнению с исходным уровнем, рассчитанная из соотношения значений после исходного уровня/на исходном уровне.

Для периода LTFU для каждого серотипа представлены описательные обобщенные сведения в отношении иммуногенности.

[0396] При выборе дозы для более поздних фаз учитывается совокупность свидетельств, доступных на момент первичного анализа когорты 1 (результаты в день 30).

Таблица 11. Когорта 1: график вакцинации

		Фаза 1						**Фаза 2a**	**Всего**
		Стадия 1	**Стадия 2**	**Стадия 3**	**Стадия 4**	**Стадия 5**	**Стадия 6**	**Стадия 7**	
Исследуемая группа вакцинации	**Вакцинация в день 1**	**Участники из сигнальной когорты (низкая доза)**	**Дополнительные участники (низкая доза)**	**Участники из сигнальной когорты (средняя доза)**	**Дополнительные участники (средняя доза)**	**Участники из сигнальной когорты (высокая доза)**	**Дополнительные участники (высокая доза)**	**Дополнительные участники фазы 2a**	
G1	Низкая доза ExPEC10V*	2	18					80	100
G2	Средняя доза ExPEC10V*			2	18			80	100
G3	Высокая доза ExPE					2	18	80	100

	C10V *								
G4	ExPEC4V**	1	3	1	3	1	3	40	52
G5	Prevnar 13***	1	3	1	3	1	3	40	52
Всего		**4**	**24**	**4**	**24**	**4**	**24**	**320**	**404**

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

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

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

Таблица 12. Когорта 2: график вакцинации

Исследуемая группа вакцинации	**Вакцинация в день 1**	**Всего**
G6	ExPEC10V[a]	280
G7	Плацебо	140
Всего		**420**

[a] ExPEC10V состоит из полисахаридных (PS) О-антигенов серотипов O1A, O2, O4, O6A, O8, O15, O16, O18A, O25B и O75 ExPEC, биоконъюгированных по отдельности с

белком-переносчиком — генетически детоксифицированной формой экзотоксина А (EPA), полученного из *Pseudomonas aeruginosa*.

[0397] Соотношение рандомизации для участников, включенных в когорту 2 исследования, составляет 2:1 (ExPEC10V:плацебо). Доза ExPEC10V, используемая в когорте 2, была определена на основании результатов первичного анализа (день 30) в когорте 1, и она является высокой дозой, которая использовалась в когорте 1.

СТАТУС

[0398] Включение в исследование и вакцинация когорты 1 вышеописанного исследования были завершены. Серьезных проблем с безопасностью выявлено не было, и вакцина ExPEC10V характеризуется приемлемым профилем безопасности.

[0399] Был проведен анализ иммуногенности клинических образцов из когорты 1, и результаты описаны ниже.

[0400] Вакцинацию когорты 2 начинали с использованием высокой дозы ExPEC10V, и эта часть исследования продолжается.

РЕЗУЛЬТАТЫ В ОТНОШЕНИИ БЕЗОПАСНОСТИ И ИММУНОГЕННОСТИ ДЛЯ КОГОРТЫ 1

[0401] Эти результаты, представленные в данном документе, относятся к клиническому исследованию BAC1001 (группа 1). В полной выборке для анализа было 416 участников. Каждый участник был рандомизирован для получения либо 1 из 3 однократных внутримышечных доз ExPEC10V, либо 1 из 2 доз активного контроля ExPEC4V или Prevnar; 104 были вакцинированы с помощью низкой дозы ExPEC10V, 102 – с помощью средней дозы ExPEC10V, 104 – с помощью высокой дозы ExPEC10V, 52 – с помощью вакцины ExPEC4V (4:4:4:8 мкг полисахарида O1A, O2, O6A и O25B/доза) и 54 – с помощью Prevnar. Всего 413 участников завершили визит в день 30. В анализ иммуногенности в день 15 согласно протоколу было включено 392 (94,2%) участника.

Безопасность

[0402] В целом, все дозы ExPEC10V хорошо переносились. Наблюдалась тенденция к увеличению реактогенности при высоких дозах, при этом реактогенность высоких доз ExPEC10V была ниже, чем у Prevnar, или сопоставима с ней, за исключением эритемы, отека и тошноты. В отличие от Prevnar, в группах ExPEC10V наблюдалась местная реактогенность с более поздним началом, при этом об эритеме и отеке в участке инъекции сообщалось как о явлениях с поздним началом у > 90%

участников, у которых наблюдались эти местные явления. Однако профиль реактогенности ExPEC10V является приемлемым по сравнению с другими лицензированными вакцинами, применяемыми в популяциях пожилых людей.

Иммуногенность

[0403] Иммунные ответы, индуцированные вакциной, оценивали на исходном уровне (день 1 до вакцинации) и в день 15 после вакцинации с использованием мультиплексного электрохемилюминесцентного (ECL) иммуноанализа, с помощью которого измеряют уровни специфичных в отношении серотипа антител в сыворотке крови (общий иммуноглобулин G [IgG]), и мультиплексного анализа опсонофагоцитарного уничтожения (MOPA), с помощью которого измеряют опосредованное антителами опсонофагоцитарное уничтожение бактерий.

Уровни антиген-специфических антител в сыворотке крови (ECL)

[0404] Уровни антител, специфичных к O-антигенам, в сыворотке крови (общий IgG) значительно увеличивались в день 15 после вакцинации для всех тестируемых доз ExPEC10V и всех вакцинных серотипов. Было замечено, что у по меньшей мере 80% субъектов, получавших высокую дозу вакцины ExPEC10V, наблюдалось двукратное или большее увеличение титров антител, специфичных к O-антигенам, до дня 15 после вакцинации для 8 из 10 серотипов, которые включают O25B, O6A, O2, O1A, O4, O15, O16 и O18A. В группе средней дозы ExPEC10V у по меньшей мере 80% субъектов наблюдается двукратное или большее увеличение титров антител, специфичных к O-антигенам, до дня 15 после вакцинации для 5 из 10 серотипов, которые включают O25B, O2, O1A, O4 и O15; и в группе низкой дозы ExPEC10V для 4 из 10 серотипов, которые включают O25B, O2, O15 и O16 (фиг. 4, таблица 13). Минимальные изменения GMT от дня 1 до дня 15 наблюдались в группе субъектов, получавших Prevnar или ExPEC4V (для серотипов, отличных от ExPEC4V) (фиг. 4, таблица 13).

[0405] Для анализа ECL все субъекты были проанализированы и включены в полную подгруппу для оценки иммуногенности. Субъекты с серьезными нарушениями в соответствии с критериями исключения из протокола исключались из анализов согласно протоколу. Среднее геометрическое титра (GMT), FI GMT (кратность увеличения среднего геометрического титра) и процентная доля участников с по меньшей мере 2- и 4-кратным увеличением по сравнению с исходным уровнем в иммуноанализе на основе ECL обобщены в таблице 13 ниже.

[0406]

Таблица 13. Данные ECL BAC1001 для когорты 1

Серотип O1A

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V, низкая доза**	**ExPEC10V, средняя доза**	**ExPEC10V, высокая доза**	**ExPEC4V**	**Prevnar**
GMT	День 1	1226879,8 (1030417,6; 1460800,0)	1193952,5 (978207,8; 1457279,9)	1202227,3 (999407,5; 1446207,5)	1072873,1 (798770,8; 1441035,1)	1310616,9 (1010870,8; 1699244,5)
GMT	День 15	5328463,0 (4620273,9; 6145202,3)	6351780,5 (5647000,4; 7144521,5)	6379531,1 (5682021,0; 7162665,7)	6539744,0 (5315259,2; 8046315,4)	1650517,3 (1228541,5; 2217432,2)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	4,35 (3,646; 5,198)	5,26 (4,361; 6,345)	5,19 (4,310; 6,256)	5,99 (4,459; 8,043)	1,27 (1,094; 1,485)
% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	78,0% (68,61%; 85,67%)	84,4% (75,54%; 90,98%)	81,6% (72,53%; 88,74%)	80,0% (66,28%; 89,97%)	10,4% (3,47%; 22,66%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	56,0% (45,72%; 65,92%)	61,5% (50,97%; 71,22%)	64,3% (53,97%; 73,71%)	66,0% (51,23%; 78,79%)	6,3% (1,31%; 17,20%)

Серотип O2

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V, низкая доза**	**ExPEC10V, средняя доза**	**ExPEC10V, высокая доза**	**ExPEC4V**	**Prevnar**
GMT	День 1	510014,8 (424544,1; 612692,6)	465679,8 (393668,5; 550863,6)	534252,7 (456163,2; 625710,3)	477186,7 (365264,4; 623403,6)	467863,4 (354874,1; 616827,7)
GMT	День 15	4846804,8 (4088473,9; 5745791,1)	4779406,7 (4015130,7; 5689162,0)	6505196,8 (5820337,7; 7270640,9)	6174400,7 (4983834,3; 7649376,5)	431229,4 (334539,7; 555864,6)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	9,48 (7,955; 11,306)	10,09 (8,389; 12,132)	12,46 (10,686; 14,516)	12,70 (9,383; 17,196)	1,01 (0,952; 1,067)
% 2-	День 15 по	93,0%	93,8%	99,0%	90,0%	0,0%

кратного[2]	сравнению с днем 1	(86,11%; 97,14%)	(86,89%; 97,67%)	(94,45%; 99,97%)	(78,19%; 96,67%)	(0,00%; 7,40%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	83,0% (74,18%; 89,77%)	84,4% (75,54%; 90,98%)	92,9% (85,84%; 97,08%)	82,0% (68,56%; 91,42%)	0,0% (0,00%; 7,40%)

Серотип O4

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V, низкая доза**	**ExPEC10V, средняя доза**	**ExPEC10V, высокая доза**	**ExPEC4V**	**Prevnar**
GMT	День 1	461135,6 (394351,8; 539229,2)	492816,2 (420242,9; 577922,5)	449573,2 (396266,8; 510050,4)	462018,9 (378746,2; 563600,3)	429691,9 (352681,9; 523517,5)
GMT	День 15	2876992,7 (2312781,5; 3578845,2)	2776953,7 (2271070,8; 3395522,4)	4135064,0 (3466612,3; 4932410,4)	479974,7 (389335,0; 591716,0)	556386,8 (418115,4; 740384,7)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	6,26 (5,080; 7,716)	5,52 (4,543; 6,717)	9,15 (7,568; 11,063)	1,06 (1,006; 1,124)	1,29 (1,085; 1,524)
% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	77,0% (67,51%; 84,83%)	81,3% (72,00%; 88,49%)	90,8% (83,28%; 95,71%)	2,0% (0,05%; 10,65%)	10,4% (3,47%; 22,66%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	64,0% (53,79%; 73,36%)	63,5% (53,09%; 73,13%)	79,6% (70,26%; 87,07%)	0,0% (0,00%; 7,11%)	4,2% (0,51%; 14,25%)

Серотип O6A

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V, низкая доза**	**ExPEC10V, средняя доза**	**ExPEC10V, высокая доза**	**ExPEC4V**	**Prevnar**
GMT	День 1	1220500,4 (1060415,0; 1404753,0)	1143877,4 (965179,1; 1355660,9)	1127737,5 (987356,6; 1288077,7)	1178385,6 (934832,4; 1485392,0)	943745,8 (776652,7; 1146788,3

						)
GMT	День 15	4314596,8 (3748795,9 ; 4965793,3)	5145946,5 (4369752,3 ; 6060015,3)	5839456,8 (5126873,3 ; 6651082,1)	4930272,7 (3947184,1 ; 6158210,2)	1012716,0 (821125,5 ; 1249009,7)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	3,55 (3,033; 4,145)	4,45 (3,691; 5,370)	5,06 (4,355; 5,869)	4,38 (3,407; 5,618)	1,04 (0,986; 1,088)
% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	72,0% (62,13%; 80,52%)	77,1% (67,39%; 85,05%)	85,7% (77,19%; 91,96%)	78,0% (64,04%; 88,47%)	0,0% (0,00%; 7,40%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	43,0% (33,14%; 53,29%)	52,1% (41,64%; 62,39%)	65,3% (55,02%; 74,64%)	52,0% (37,42%; 66,34%)	0,0% (0,00%; 7,40%)

Серотип O8

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V, низкая доза**	**ExPEC10V, средняя доза**	**ExPEC10V, высокая доза**	**ExPEC4V**	**Prevnar**
GMT	День 1	1534906,4 (1315284, 3; 1791200,5)	1732564,1 (1488898, 1; 2016107,4)	1535536,4 (1319371, 4; 1787117,9)	1537793,8 (1250768, 0; 1890686,4)	1339640,3 (1061371, 9; 1690864,7)
GMT	День 15	5052165,0 (4405019,	5600945,1 (4902756,	6178848,4 (5511236,	1709293,2 (1392733,	1374269,5 (1075143,

		0; 5794383,9)	3; 6398561,1)	6; 6927332,3)	5; 2097805,0)	6; 1756617,9)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	3,35 (2,896; 3,871)	3,26 (2,777; 3,832)	3,94 (3,381; 4,584)	1,07 (1,034; 1,116)	1,05 (0,994; 1,111)
% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	73,0% (63,20%; 81,39%)	72,9% (62,89%; 81,48%)	73,5% (63,59%; 81,88%)	0,0% (0,00%; 7,11%)	2,1% (0,05%; 11,07%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	42,0% (32,20%; 52,29%)	39,6% (29,75%; 50,08%)	52,0% (41,71%; 62,24%)	0,0% (0,00%; 7,11%)	0,0% (0,00%; 7,40%)

Серотип O15

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V, низкая доза**	**ExPEC10V, средняя доза**	**ExPEC10V, высокая доза**	**ExPEC4V**	**Prevnar**
GMT	День 1	871316,5 (728072,4; 1042743,2)	865326,5 (733883,5; 1020311,8)	869436,4 (742857,9; 1017583,0)	847989,9 (659076,0; 1091053,0)	839725,1 (668057,1; 1055505,9)
GMT	День 15	5145327,6 (4381397,1 ; 6042455,2)	4658173,1 (3991308,2 ; 5436457,2)	5502286,9 (4828131,0 ; 6270575,8)	859569,9 (666001,9; 1109397,0)	1208928,4 (882681,8; 1655758,5)
FI GM[1]	День 15 по	5,93 (4,945;	5,37 (4,496;	6,24 (5,276;	1,01 (0,973;	1,48 (1,227;

	сравнению с днем 1	7,100)	6,408)	7,391)	1,055)	1,797)
% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	88,0% (79,98%; 93,64%)	83,3% (74,35%; 90,16%)	87,8% (79,59%; 93,51%)	0,0% (0,00%; 7,11%)	22,9% (12,03%; 37,31%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	61,0% (50,73%; 70,60%)	63,5% (53,09%; 73,13%)	68,4% (58,20%; 77,39%)	0,0% (0,00%; 7,11%)	10,4% (3,47%; 22,66%)

Серотип O16

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V, низкая доза**	**ExPEC10V, средняя доза**	**ExPEC10V, высокая доза**	**ExPEC4V**	**Prevnar**
GMT	День 1	860263,7 (725964,5; 1019407,5)	853674,6 (740655,4; 983939,8)	803233,9 (691840,6; 932562,7)	675579,3 (572649,9; 797009,5)	706903,3 (568193,4; 879475,6)
GMT	День 15	4265641,1 (3633602,0; 5007618,8)	3973364,4 (3373538,4; 4679841,3)	5630267,2 (4906785,0; 6460423,5)	750895,2 (615148,2; 916598,0)	744487,3 (588274,4; 942181,5)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	5,00 (4,262; 5,870)	4,56 (3,794; 5,489)	6,93 (5,817; 8,249)	1,11 (0,991; 1,247)	1,08 (1,002; 1,154)
% 2-кратного[2]	День 15 по	86,0% (77,63%;	77,1% (67,39%;	87,8% (79,59%;	2,0% (0,05%;	2,1% (0,05%;

	сравнению с днем 1	92,13%)	85,05%)	93,51%)	10,65%)	11,07%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	63,0% (52,76%; 72,44%)	57,3% (46,78%; 67,34%)	72,4% (62,50%; 80,99%)	2,0% (0,05%; 10,65%)	0,0% (0,00%; 7,40%)

Серотип O18A

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V, низкая доза**	**ExPEC10V, средняя доза**	**ExPEC10V, высокая доза**	**ExPEC4V**	**Prevnar**
GMT	День 1	934049,6 (819694,2; 1064358,5)	963410,7 (838467,8; 1106971,8)	923828,6 (816988,8; 1044640,1)	948044,5 (795966,9; 1129178,2)	979084,2 (788765,0; 1215325,0)
GMT	День 15	3517970,2 (2948912,8; 4196839,6)	3585716,9 (3003087,3; 4281382,5)	4539608,6 (3893880,0; 5292419,4)	972430,2 (803752,4; 1176507,2)	1087640,8 (828956,9; 1427049,5)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	3,79 (3,219; 4,470)	3,62 (3,020; 4,341)	4,85 (4,130; 5,702)	1,04 (0,996; 1,086)	1,14 (1,029; 1,256)
% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	72,0% (62,13%; 80,52%)	70,8% (60,67%; 79,67%)	83,7% (74,84%; 90,37%)	0,0% (0,00%; 7,11%)	4,2% (0,51%; 14,25%)
% 4-кратного[2]	День 15 по	49,0% (38,86%;	41,7% (31,68%;	61,2% (50,85%;	0,0% (0,00%;	2,1% (0,05%;

	сравнению с днем 1	59,20%)	52,18%)	70,90%)	7,11%)	11,07%)

Серотип O25B

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V, низкая доза**	**ExPEC10V, средняя доза**	**ExPEC10V, высокая доза**	**ExPEC4V**	**Prevnar**
GMT	День 1	246235,1 (205202,9; 295472,1)	240586,0 (200618,4; 288515,9)	243305,0 (204854,9; 288972,0)	189072,4 (149829,5; 238593,9)	267582,0 (207517,9; 345031,0)
GMT	День 15	1413686,1 (1100919,7; 1815308,2)	2275453,1 (1768282,1; 2928088,7)	2047161,5 (1617468,8; 2591005,3)	2026104,2 (1428854,6; 2872999,1)	270695,3 (202827,4; 361272,4)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	5,78 (4,732; 7,054)	9,61 (7,509; 12,298)	8,19 (6,474; 10,363)	10,36 (7,430; 14,445)	1,03 (0,929; 1,136)
% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	82,0% (73,05%; 88,97%)	87,5% (79,18%; 93,37%)	83,7% (74,84%; 90,37%)	86,0% (73,26%; 94,18%)	4,2% (0,51%; 14,25%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	58,0% (47,71%; 67,80%)	76,0% (66,25%; 84,17%)	69,4% (59,26%; 78,30%)	76,0% (61,83%; 86,94%)	2,1% (0,05%; 11,07%)

Серотип O75

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V, низкая доза**	**ExPEC10V, средняя доза**	**ExPEC10V, высокая доза**	**ExPEC4V**	**Prevnar**
GMT	День 1	1258387,9 (1054541,9; 1501637,9)	1329257,4 (1126527,2; 1568471,0)	1284187,5 (1101597,2; 1497042,2)	1107038,5 (902508,7; 1357919,5)	1373337,6 (1061821,6; 1776245,9)
GMT	День 15	2952821,0 (2468576,2; 3532057,1)	3102330,4 (2620338,5; 3672981,2)	3923938,0 (3410142,4; 4515145,6)	1317142,3 (1048701,5; 1654297,0)	1368220,0 (1042053,0; 1796478,7)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	2,34 (2,019; 2,715)	2,36 (2,039; 2,734)	3,01 (2,579; 3,510)	1,14 (1,023; 1,260)	1,04 (0,942; 1,139)
% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	51,0% (40,80%; 61,14%)	49,0% (38,61%; 59,37%)	67,3% (57,13%; 76,48%)	6,0% (1,25%; 16,55%)	2,1% (0,05%; 11,07%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	21,0% (13,49%; 30,29%)	25,0% (16,72%; 34,88%)	32,7% (23,52%; 42,87%)	4,0% (0,49%; 13,71%)	2,1% (0,05%; 11,07%)

Когорта 1: выходные данные для первичного анализа.

[1] = FI GM по сравнению с исходным уровнем (день 1).

[2] = процентная доля участников с кратностью увеличения по сравнению с исходным уровнем (день 1).

CI = доверительный интервал; GM = среднее геометрическое, GMT = среднее геометрическое титра; FI = кратность увеличения.
95% CI для GMT и FI GM определен на основании t-распределения.
95% CI для процентной доли участников с 2- и 4-кратным увеличением получен с применением метода Клоппера-Пирсона.

[0407] Из данных видно (фиг. 4), что общий ответ с образованием IgG на полисахаридный антиген O75 является более низким по сравнению с другими антигенами, вводимыми в таком же количестве (например, более низкая процентная доля субъектов с по меньшей мере двукратным увеличением в день 15 по сравнению с днем 1), что являлось неожиданным результатом. Данные также показывают, что увеличение количества полисахаридного антигена O75 в композиции (т. е. введение 8 мкг в высокой дозе по сравнению с 4 мкг в низкой и средней дозах) усиливало индуцированный иммунный ответ на полисахаридный антиген O75.

Функциональность антител в сыворотке крови (MOPA)

[0408] Частичные данные были включены в анализ MOPA когорты 1. В таблице 14 показано количество участников, включенных в анализ MOPA GMT в день 15. Хотя для оценки функциональности ответа с образованием антител, индуцированного ExPEC10V, использовались частичные данные, выводы из анализа не изменялись, когда был доступен полный набор данных.

Таблица 14. Количество участников, включенных в анализ MOPA GMT

Серотип	**Низкая доза**	**Средняя доза**	**Высокая доза**	**ExPEC4V**	**Prevnar**
Ожидаемое количество	100	96	98	50	48
O25B	93 (93%)	94 (98%)	93 (95%)	48 (96%)	46 (96%)
O6A	98 (98%)	94 (98%)	97 (99%)	48 (96%)	48 (100%)
O2	59 (59%)	54 (56%)	44 (45%)	24 (48%)	45 (94%)
O1A	92 (92%)	94 (98%)	88 (90%)	40 (80%)	46 (96%)
O4	98 (98%)	93 (97%)	97 (99%)	50 (100%)	47 (98%)
O8	99 (98%)	94 (98%)	96 (98%)	50 (100%)	46 (96%)
O15	85 (85%)	90 (94%)	92 (94%)	49 (98%)	45 (94%)

Серотип	Низкая доза	Средняя доза	Высокая доза	ExPEC4V	Prevnar
O16	100 (100%)	94 (98%)	96 (98%)	50 (100%)	48 (100%)
O18A	89 (89%)	87 (91%)	92 (94%)	45 (90%)	43 (90%)
O75	95 (95%)	92 (96%)	89 (91%)	47 (94%)	46 (96%)

[0409] Уровни опсонофагоцитарных антител, измеренные посредством MOPA, в целом соответствовали уровням антител, специфичных к O-антигенам (общему IgG), измеренным посредством иммуноанализа на основе ECL. Повышенные уровни функциональных антител наблюдались в день 15 для девяти из десяти серотипов ExPEC10V во всех тестируемых дозовых группах (фиг. 5).

[0410] В отличие от других серотипов ExPEC10V, для серотипа O8 квалифицированный анализ MOPA не смог продемонстрировать опосредованное вакциной увеличение содержания функциональных антител в день 15 после вакцинации с помощью ExPEC10V в день 1 (фиг. 5), хотя наблюдалось увеличение титров общего IgG для серотипа O8 (фиг. 4). Были начаты исследования, чтобы определить, действительно ли квалифицированный анализ не может выявить функциональные антитела к O8. Последующие эксперименты с модифицированным анализом MOPA и сыворотками в день 1 и в день 15 успешно продемонстрировали увеличение содержания функциональных антител в день 15 в 2 раза или больше (данные не показаны), демонстрируя, что вакцина ExPEC10V действительно индуцировала функциональные антитела также и к серотипу O8. Для клинической разработки потребуется повторная квалификация модифицированного анализа MOPA O8 и повторное тестирование клинических образцов, что занимает значительное время, и было решено сначала приступить к разработке вакцинной композиции, которая не содержит полисахаридный антиген O8. Однако из последующих экспериментов стало ясно, что биоконъюгат O8 в составе 10-валентной вакцинной композиции ExPEC действительно индуцирует функциональные антитела к серотипу O8 *E. coli*, и, следовательно, такой биоконъюгат, вероятно, может быть успешно добавлен к девятивалентным вакцинным композициям, описанным в примере ниже.

[0411] Наиболее высокие уровни опсонофагоцитарных антител наблюдались для серотипа O2; у 95% субъектов, которые были вакцинированы высокой дозой этой вакцины, наблюдалось 2-кратное или большее увеличение титров опсонических

антител к O2 в день 15 после вакцинации. За исключением серотипа O8, для которого были выявлены ограниченные уровни функциональных антител, как обсуждалось выше, самые низкие уровни опсонофагоцитарных антител наблюдались для серотипа O75; у 36% субъектов, вакцинированных высокой дозой вакцины, в день 15 после вакцинации наблюдалось 2-кратное или большее увеличение титров опсонических антител к O75. Таким образом, данные MOPA для серотипа O75 согласуются с вышеописанными данными ECL для данного серотипа, подтверждая относительно более низкую иммуногенность конъюгатов полисахаридного антигена O75 *E. coli* по сравнению с несколькими другими конъюгатами в композиции в такой же концентрации, например, конъюгатами O6, O1 или O2 *E. coli*. Кроме того, минимальные изменения GMT от дня 1 до дня 15 наблюдались в группе субъектов, получавших Prevnar или ExPEC4V (для серотипов, отличных от ExPEC4V) (фиг. 5), что соответствует ожиданиям для серотипов, отсутствующих в соответствующих вакцинных композициях.

[0412] Средние геометрические значения титров (GMT), средние геометрические значения кратности увеличения (FI GMR) и процентная доля участников с по меньшей мере 2- и 4-кратным увеличением в MOPA по сравнению с исходным уровнем обобщены в таблице 15 для каждого из 10 серотипов.

Таблица 15. Данные MOPA BAC1001 для когорты 1

Серотип O1A

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V, низкая доза**	**ExPEC10V, средняя доза**	**ExPEC10V, высокая доза**	**ExPEC4V**	**Prevnar**
GMT	День 1	221,5 (179,7; 272,9)	154,8 (125,5; 190,8)	171,3 (136,7; 214,8)	255,1 (179,2; 363,2)	201,1 (154,1; 262,5)
GMT	День 15	606,2 (469,6; 782,5)	748,5 (584,4; 958,8)	995,9 (738,1; 1343,7)	974,5 (620,4; 1530,7)	226,3 (167,0; 306,7)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	2,67 (2,068; 3,455)	4,41 (3,473; 5,589)	5,63 (4,102; 7,739)	4,29 (2,868; 6,406)	1,12 (0,895; 1,413)

% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	48,9% (38,05%; 59,75%)	72,5% (62,17%; 81,37%)	72,0% (60,94%; 81,32%)	72,5% (56,11%; 85,40%)	13,3% (5,05%; 26,79%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	28,4% (19,30%; 39,02%)	48,4% (37,74%; 59,07%)	51,2% (39,92%; 62,42%)	47,5% (31,51%; 63,87%)	2,2% (0,06%; 11,77%)

Серотип O2

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V, низкая доза**	**ExPEC10V, средняя доза**	**ExPEC10V, высокая доза**	**ExPEC4V**	**Prevnar**
GMT	День 1	370,7 (298,5; 460,4)	305,7 (239,5; 390,2)	385,2 (312,2; 475,3)	403,5 (287,3; 566,6)	370,0 (272,5; 502,5)
GMT	День 15	1951,9 (1436,3; 2652,5)	1535,4 (1116,0; 2112,5)	3455,8 (2424,9; 4925,1)	2810,9 (1502,2; 5259,6)	349,6 (261,6; 467,2)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	5,77 (4,283; 7,778)	6,38 (4,434; 9,172)	11,18 (7,676; 16,272)	8,28 (3,432; 19,966)	1,05 (0,901; 1,212)
% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	83,9% (71,67%; 92,38%)	75,5% (61,72%; 86,24%)	95,2% (83,84%; 99,42%)	71,4% (47,82%; 88,72%)	9,1% (2,53%; 21,67%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	62,5% (48,55%; 75,08%)	60,4% (46,00%; 73,55%)	76,2% (60,55%; 87,95%)	57,1% (34,02%; 78,18%)	0,0% (0,00%; 8,04%)

Серотип O4

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V, низкая доза**	**ExPEC10V, средняя доза**	**ExPEC10V, высокая доза**	**ExPEC4V**	**Prevnar**
GMT	День 1	116,4 (96,5; 140,4)	82,1 (66,8; 100,9)	89,8 (77,2; 104,4)	101,6 (73,2; 141,0)	93,8 (72,9; 120,8)

GMT	День 15	359,7 (269,3; 480,5)	296,9 (222,6; 395,8)	458,3 (350,9; 598,5)	104,1 (75,4; 143,8)	98,4 (75,1; 129,0)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	3,22 (2,526; 4,114)	3,20 (2,557; 3,993)	4,96 (3,915; 6,283)	1,00 (0,874; 1,140)	1,09 (0,916; 1,294)
% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	59,2% (48,79%; 69,01%)	59,1% (48,46%; 69,23%)	73,2% (63,24%; 81,68%)	4,0% (0,49%; 13,71%)	12,8% (4,83%; 25,74%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	35,7% (26,29%; 46,03%)	37,6% (27,79%; 48,28%)	55,7% (45,23%; 65,76%)	2,0% (0,05%; 10,65%)	4,3% (0,52%; 14,54%)

Серотип O6A

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V, низкая доза**	**ExPEC10V, средняя доза**	**ExPEC10V, высокая доза**	**ExPEC4V**	**Prevnar**
GMT	День 1	632,8 (489,5; 818,0)	559,0 (431,0; 724,9)	628,0 (505,0; 781,0)	495,8 (338,8; 725,6)	623,6 (458,6; 848,1)
GMT	День 15	1454,0 (1109,3; 1905,8)	2146,6 (1651,0; 2791,0)	2227,9 (1685,7; 2944,7)	1984,9 (1335,8; 2949,3)	695,0 (489,5; 986,7)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	2,24 (1,833; 2,733)	3,74 (2,764; 5,069)	3,59 (2,798; 4,597)	4,11 (2,773; 6,084)	1,20 (1,023; 1,397)
% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	46,9% (36,78%; 57,29%)	54,3% (43,66%; 64,58%)	62,9% (52,48%; 72,48%)	66,7% (51,59%; 79,60%)	10,4% (3,47%; 22,66%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	23,5% (15,50%; 33,11%)	41,5% (31,41%; 52,12%)	41,2% (31,33%; 51,69%)	39,6% (25,77%; 54,73%)	2,1% (0,05%; 11,07%)

Серотип O8

Конечная точка (95% CI)	Момент времени	ExPEC10V, низкая доза	ExPEC10V, средняя доза	ExPEC10V, высокая доза	ExPEC4V	Prevnar
GMT	День 1	967,6 (764,2; 1225,1)	699,2 (538,5; 907,9)	896,3 (714,1; 1125,1)	710,0 (535,1; 941,9)	891,8 (684,4; 1162,1)
GMT	День 15	1205,4 (945,7; 1536,5)	859,9 (657,8; 1124,2)	937,3 (748,9; 1173,0)	758,4 (558,5; 1029,9)	930,0 (698,3; 1238,6)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	1,22 (1,055; 1,422)	1,22 (1,102; 1,346)	1,09 (0,961; 1,226)	1,04 (0,845; 1,271)	1,03 (0,846; 1,242)
% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	18,4% (11,26%; 27,47%)	12,9% (6,85%; 21,45%)	8,3% (3,67%; 15,76%)	8,2% (2,27%; 19,60%)	10,9% (3,62%; 23,57%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	4,1% (1,12%; 10,12%)	3,2% (0,67%; 9,14%)	3,1% (0,65%; 8,86%)	4,1% (0,50%; 13,98%)	2,2% (0,06%; 11,53%)

Серотип O15

Конечная точка (95% CI)	Момент времени	ExPEC10V, низкая доза	ExPEC10V, средняя доза	ExPEC10V, высокая доза	ExPEC4V	Prevnar
GMT	День 1	579,8 (443,0; 758,7)	440,5 (322,1; 602,5)	517,6 (394,8; 678,6)	720,2 (472,1; 1098,6)	528,0 (370,3; 752,9)
GMT	День 15	2509,1 (1742,6; 3612,8)	2747,1 (1887,8; 3997,5)	3355,7 (2272,3; 4955,5)	641,2 (432,6; 950,4)	777,6 (498,7; 1212,6)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	4,30 (2,989; 6,199)	6,40 (4,355; 9,408)	6,70 (4,508; 9,948)	0,96 (0,697; 1,331)	1,54 (1,077; 2,206)
% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению	57,3% (45,91%;	69,3% (58,58%;	70,3% (59,84%;	13,0% (4,94%;	25,6% (13,52%;

	с днем 1	68,18%)	78,71%)	79,45%)	26,26%)	41,17%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	39,0% (28,44%; 50,43%)	54,5% (43,58%; 65,20%)	56,0% (45,25%; 66,44%)	8,7% (2,42%; 20,79%)	14,0% (5,30%; 27,93%)

Серотип O16

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V, низкая доза**	**ExPEC10V, средняя доза**	**ExPEC10V, высокая доза**	**ExPEC4V**	**Prevnar**
GMT	День 1	215,7 (170,2; 273,4)	186,7 (149,3; 233,6)	173,0 (139,4; 214,6)	227,6 (164,3; 315,4)	189,2 (146,1; 244,9)
GMT	День 15	1367,2 (1005,3; 1859,5)	942,6 (697,1; 1274,4)	1591,7 (1190,4; 2128,3)	217,7 (150,4; 315,2)	175,7 (130,1; 237,3)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	5,90 (4,428; 7,852)	5,00 (3,655; 6,845)	9,12 (6,807; 12,223)	0,92 (0,778; 1,092)	0,99 (0,832; 1,175)
% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	76,0% (66,43%; 83,98%)	71,0% (60,64%; 79,92%)	84,4% (75,54%; 90,98%)	8,2% (2,27%; 19,60%)	8,3% (2,32%; 19,98%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	55,0% (44,73%; 64,97%)	50,5% (39,97%; 61,07%)	75,0% (65,12%; 83,28%)	2,0% (0,05%; 10,85%)	4,2% (0,51%; 14,25%)

Серотип O18A

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V, низкая доза**	**ExPEC10V, средняя доза**	**ExPEC10V, высокая доза**	**ExPEC4V**	**Prevnar**
GMT	День 1	65,6 (51,3; 83,9)	51,8 (39,0; 68,9)	52,7 (42,1; 66,1)	63,6 (42,2; 95,8)	52,8 (39,4; 70,8)
GMT	День 15	251,0 (180,9;	248,8 (184,9;	310,0 (221,7;	68,3 (45,2;	62,4 (40,1;

		348,1)	334,7)	433,4)	103,4)	97,1)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	3,91 (2,946; 5,193)	4,52 (3,259; 6,256)	5,65 (4,190; 7,624)	1,10 (0,930; 1,309)	1,24 (0,961; 1,609)
% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	66,3% (55,28%; 76,12%)	65,4% (54,04%; 75,66%)	76,4% (66,22%; 84,76%)	7,1% (1,50%; 19,48%)	9,5% (2,66%; 22,62%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	44,2% (33,48%; 55,30%)	46,9% (35,73%; 58,33%)	55,1% (44,14%; 65,62%)	4,8% (0,58%; 16,16%)	7,1% (1,50%; 19,48%)

Серотип O25B

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V, низкая доза**	**ExPEC10V, средняя доза**	**ExPEC10V, высокая доза**	**ExPEC4V**	**Prevnar**
GMT	День 1	157,9 (121,4; 205,3)	145,0 (109,6; 191,8)	149,8 (117,6; 191,0)	147,1 (105,5; 204,9)	162,2 (115,8; 227,2)
GMT	День 15	399,1 (303,8; 524,2)	497,4 (375,7; 658,4)	387,9 (295,5; 509,2)	460,1 (312,1; 678,3)	245,0 (154,5; 388,6)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	2,23 (1,792; 2,768)	2,70 (2,117; 3,453)	2,28 (1,833; 2,826)	2,83 (1,932; 4,143)	1,42 (1,004; 2,015)
% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	45,7% (35,22%; 56,37%)	48,9% (38,34%; 59,56%)	46,2% (35,64%; 56,92%)	52,2% (36,95%; 67,11%)	15,2% (6,34%; 28,87%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	23,9% (15,63%; 33,94%)	31,5% (22,23%; 42,04%)	26,4% (17,69%; 36,65%)	39,1% (25,09%; 54,63%)	4,3% (0,53%; 14,84%)

Серотип O75

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V, низкая доза**	**ExPEC10V, средняя доза**	**ExPEC10V, высокая доза**	**ExPEC4V**	**Prevnar**

GMT	День 1	< LLOQ (< LLOQ; 39,3)	< LLOQ (< LLOQ; < LLOQ)	< LLOQ (< LLOQ; < LLOQ)	< LLOQ (< LLOQ; 37,2)	< LLOQ (< LLOQ; 40,1)
GMT	День 15	77,1 (60,6; 98,1)	55,6 (44,6; 69,4)	71,0 (53,9; 93,7)	<LLOQ (<LLOQ; 37,2)	<LLOQ (<LLOQ; 44,0)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	1,88 (1,548; 2,275)	1,65 (1,404; 1,941)	2,10 (1,700; 2,596)	1,04 (0,944; 1,147)	1,04 (0,945; 1,156)
% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	33,7% (24,17%; 44,30%)	27,5% (18,63%; 37,83%)	36,0% (25,97%; 47,12%)	2,3% (0,06%; 12,02%)	4,4% (0,54%; 15,15%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	15,2% (8,58%; 24,21%)	15,4% (8,67%; 24,46%)	22,1% (13,86%; 32,33%)	2,3% (0,06%; 12,02%)	0,0% (0,00%; 7,87%)

Когорта 1: выходные данные для первичного анализа.

[1] = FI GM по сравнению с исходным уровнем (день 1).

[2] = процентная доля участников с кратностью увеличения по сравнению с исходным уровнем (день 1).

CI = доверительный интервал; GM = среднее геометрическое, GMT = среднее геометрическое титра; FI = кратность увеличения.

95% CI для GMT и FI GM определен на основании t-распределения.

95% CI для процентной доли участников с 2- и 4-кратным увеличением получен с применением метода Клоппера-Пирсона.

Выбор дозы

[0413] Алгоритм выбора дозы для оценки иммуногенности на основании среднего log10 кратности увеличения от исходного уровня до дня 15 для каждой дозовой группы идентифицировал высокую дозу ExPEC10V для когорты 2 данного испытания с учетом двух анализируемых выборок (PPI и FAS) и двух анализов (ECL и MOPA).

[0414] Для серотипов O2, O4, O15, O16 и O18A группа высокой дозы характеризовалась более высокими GMT, GMR и процентной долей участников с 2-кратным и 4-кратным увеличениями в день 15 по сравнению с 2 другими дозами

ExPEC10V в обоих анализах. Для серотипа O25B группа средней дозы обычно характеризовалась более высокими GMT, GMR и процентной долей участников с 2-кратным и 4-кратным увеличениями среди 3 дозовых групп ExPEC10V; для данного серотипа доза O-антигена была одинаковой (16 мкг) для групп как средней, так и высокой дозой ExPEC10V. Как для серотипа O1A, так и для O6A результаты были неоднозначными между высокой и средней дозами. В случае с серотипом O75 наблюдался поддающийся измерению ответ с образованием функциональных антител для доз ExPEC10V. Поддающиеся измерению ответы с образованием функциональных антител не были выявлены в квалифицированном анализе для серотипа O8, как обсуждалось выше. В случае с серотипами, отличными от ExPEC4V, слабые ответы с образованием функциональных антител наблюдались для 2 активных контролей; ответ с образованием антител был обусловлен ранее существовавшими антителами, а не ответом, индуцированным вакциной. На основании этих результатов была выбрана высокая доза ExPEC10V для когорты 2 клинического испытания BAC1001.

Выводы

[0415] Вакцина ExPEC10V индуцировала устойчивые ответы с образованием антител, увеличение содержания антител, специфичных к O-антигенам, в сыворотке крови наблюдалось для всех вакцинных серотипов в день 15 после вакцинации по сравнению с титрами на исходном уровне (день 1). Индуцированные ExPEC10V функциональные антитела, опосредующие опсонофагоцитарное уничтожение *E. coli*, были выявлены в квалифицированном MOPA для всех вакцинных серотипов, за исключением серотипа O8. В случае с серотипом O8 с помощью последующих исследований с модифицированным MOPA все же измеряли ответ с образованием функциональных антител. Примечательно, что ответ на O75 был слабее при дозах 4 мкг и 8 мкг, чем для других серотипов при такой же дозе, что было неожиданным и непредсказуемым результатом данного исследования. Для улучшения иммунного ответа на O75 *E. coli*, создаваемого поливалентными гликоконъюгатными композициями, в одном аспекте в настоящем изобретении увеличивают дозу полисахаридного антигена серотипа O75, например, в приблизительно 1,2-8 раз по сравнению с дозой некоторых других серотипов, например, в приблизительно 1,5-4 раза, например, в приблизительно 1,5-2,5 раза, например, в приблизительно 2 раза по сравнению с дозой некоторых других серотипов, таких как O6 или O1, например, до приблизительно 16 мкг, что выше, чем, например, для трех наиболее значимых и преобладающих серотипов O1A, O2 и O6A, и сходно с полисахаридным антигеном

серотипа O25B. Следует отметить, что в более ранних экспериментах (см., например, в данном примере выше, а также примеры 5 и 6, т. е. до того, как стали доступны клинические данные о вакцине ExPEC10V, раскрытой в данном документе) доза полисахаридного антигена O75 была в лучшем случае такой же высокой, как дозы полисахаридных антигенов O1A, O2 и O6A, а фактически в некоторых тестируемых группах даже в два раза ниже, чем для полисахаридных антигенов O1A и O6A, и даже в 2-4 раза ниже, чем для полисахаридных антигенов O25B. В отличие от этого, в определенных аспектах настоящего изобретения доза O75, таким образом, фактически увеличена по сравнению с дозой O1, O2 и/или O6.

РЕЗУЛЬТАТЫ В ОТНОШЕНИИ БЕЗОПАСНОСТИ И ИММУНОГЕННОСТИ ДЛЯ КОГОРТЫ 2

[0416] В когорту 2 данного исследования были включены в общей сложности примерно 420 участников в возрасте ≥ 60 лет со стабильным состоянием здоровья и UTI в анамнезе за последние 5 лет, которые были рандомизированы параллельно в соотношении 2:1 (выборка, в которой были проведены анализы с полными результатами, включала 278 участников в группе ExPEC10V (высокая доза) и 138 участников в группе плацебо).

Безопасность

[0417] В целом вакцина ExPEC10V хорошо переносилась. Профиль реактогенности в целом был сопоставим с профилем, который наблюдался при средних и высоких дозах ExPEC10V в когорте 1. Наиболее частыми зафиксированными в процессе опроса AE были боль/болезненность, а наиболее частыми системными AE, о которых сообщалось, были миалгия, головная боль и утомляемость. Эритема и отек в участке инъекции были наиболее частыми явлениями с поздним началом (время до первого проявления > 5 дней после вакцинации). Профиль реактогенности ExPEC10V является приемлемым по сравнению с другими лицензированными вакцинами, применяемыми в популяциях пожилых людей.

Иммуногенность

[0418] Индуцированные вакциной ответы с образованием антител оценивались на исходном уровне (день 1 до вакцинации), а также в день 15 и в день 30 после вакцинации с использованием мультиплексного иммуноанализа на основе ECL, с помощью которого измеряют уровни специфичных в отношении серотипа антител в сыворотке крови (общий IgG).

Уровни антиген-специфических антител в сыворотке крови (ECL, день 1, день 15 и день 30)

Вакцина ExPEC10V была иммуногенной для всех серотипов, исходя из увеличивающегося значения GMT, FI GMT и процентной доли участников с по меньшей мере 2-кратным увеличением титра по сравнению с исходным уровнем от дня 1 до дня 15. Наблюдались минимальные изменения во всех трех показателях от дня 15 до дня 30.

Наиболее сильные ответы с образованием антител наблюдались для серотипов O2, O4, O15 и O16 у по меньшей мере 80% участников, вакцинированных с помощью ExPEC10V, у которых демонстрировалось двукратное или большее усиление ответов с образованием антител к дню 15 и дню 30 после вакцинации. Для серотипов O1A, O6A и O25B у по меньшей мере 70% участников демонстрируется двукратное или большее усиление ответа с образованием антител, а для серотипов O8 и O18A у по меньшей мере 60% участников демонстрируется двукратное или большее усиление ответа с образованием антител. Для серотипа O75 наблюдались более слабые ответы с образованием антител, тем не менее, у по меньшей мере 50% участников наблюдалось двукратное или большее усиление антиген-специфического ответа с образованием антител. В группе субъектов, получавших плацебо, наблюдались минимальные изменения GMT от дня 1 до дня 15 и дня 30 (таблица 16).

[0419] Среднее геометрическое титра (GMT), FI GMT (кратность увеличения среднего геометрического титра) и процентная доля участников с по меньшей мере 2- и 4-кратным увеличением по сравнению с исходным уровнем в иммуноанализе на основе ECL обобщены в таблице 16 ниже.

Таблица 16. Данные ECL BAC1001 для когорты 2 (день 1, день 15 и день 30)

Серотип O1A

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V**	**Плацебо**
GMT	День 1	1466300,6 (1309861,4; 1641423,6)	1714154,2 (1463104,9; 2008280,3)
GMT	День 15	6474621,3 (5996773,2; 6990546,4)	1696032,9 (1445852,1; 1989503,3)

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V**	**Плацебо**
GMT	День 30	6363928,5 (5918207,5; 6843218,4)	1773323,4 (1515713,5; 2074716,7)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	4,38 (3,908; 4,902)	0,99 (0,966; 1,023)
FI GM[1]	День 30 по сравнению с днем 1	4,35 (3,915; 4,843)	1,02 (0,954; 1,094)
% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	75,9% (70,13%; 81,03%)	0,0% (0,00%; 2,84%)
% 2-кратного[2]	День 30 по сравнению с днем 1	77,6% (72,04%; 82,46%)	1,5% (0,19%; 5,45%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	54,5% (48,19%; 60,79%)	0,0% (0,00%; 2,84%)
% 4-кратного[2]	День 30 по сравнению с днем 1	54,4% (48,14%; 60,50%)	0,8% (0,02%; 4,21%)

Серотип O2

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V**	**Плацебо**
GMT	День 1	739313,9 (659799,6; 828410,8)	768325,6 (648274,3; 910608,6)

Конечная точка (95% CI)	Момент времени	ExPEC10V	Плацебо
GMT	День 15	6001149,0 (5522390,3; 6521413,2)	759366,1 (637561,8; 904440,8)
GMT	День 30	5995886,9 (5530975,6; 6499876,9)	747487,9 (627602,8; 890273,4)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	8,02 (7,105; 9,043)	1,00 (0,933; 1,061)
FI GM[1]	День 30 по сравнению с днем 1	8,16 (7,244; 9,182)	0,98 (0,910; 1,054)
% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	88,9% (84,40%; 92,52%)	0,8% (0,02%; 4,28%)
% 2-кратного[2]	День 30 по сравнению с днем 1	89,4% (84,98%; 92,81%)	1,5% (0,19%; 5,45%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	78,7% (73,09%; 83,54%)	0,8% (0,02%; 4,28%)
% 4-кратного[2]	День 30 по сравнению с днем 1	77,6% (72,04%; 82,46%)	1,5% (0,19%; 5,45%)

Серотип O4

Конечная точка (95% CI)	Момент времени	ExPEC10V	Плацебо

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V**	**Плацебо**
GMT	День 1	678578,0 (616370,1; 747064,4)	744119,6 (646038,0; 857092,0)
GMT	День 15	3746755,5 (3336959,5; 4206876,5)	760274,2 (652833,0; 885397,7)
GMT	День 30	3570627,3 (3188275,4; 3998832,6)	806768,3 (691960,6; 940624,6)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	5,60 (4,965; 6,309)	1,03 (0,992; 1,067)
FI GM[1]	День 30 по сравнению с днем 1	5,31 (4,743; 5,955)	1,09 (1,014; 1,166)
% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	82,6% (77,37%; 87,07%)	1,6% (0,19%; 5,53%)
% 2-кратного[2]	День 30 по сравнению с днем 1	81,7% (76,54%; 86,23%)	2,3% (0,48%; 6,60%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	62,1% (55,77%; 68,06%)	0,8% (0,02%; 4,28%)
% 4-кратного[2]	День 30 по сравнению с днем 1	58,9% (52,73%; 64,94%)	1,5% (0,19%; 5,45%)

Серотип O6A

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V**	**Плацебо**
GMT	День 1	1491643,9 (1353036,8; 1644450,1)	1836907,8 (1582827,3; 2131774,0)
GMT	День 15	5624986,5 (5131740,4; 6165641,6)	1881936,5 (1613534,0; 2194986,4)
GMT	День 30	5516879,9 (5049584,3; 6027419,7)	1934121,0 (1657028,0; 2257550,3)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	3,92 (3,548; 4,339)	1,03 (0,991; 1,073)
FI GM[1]	День 30 по сравнению с днем 1	3,64 (3,295; 4,026)	1,06 (0,991; 1,135)
% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	74,7% (68,88%; 79,94%)	0,8% (0,02%; 4,28%)
% 2-кратного[2]	День 30 по сравнению с днем 1	73,0% (67,21%; 78,27%)	2,3% (0,48%; 6,60%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	50,2% (43,87%; 56,52%)	0,0% (0,00%; 2,84%)
% 4-кратного[2]	День 30 по сравнению с днем 1	44,5% (38,38%; 50,72%)	0,8% (0,02%; 4,21%)

Серотип O8

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V**	**Плацебо**
GMT	День 1	2145103,2 (1937289,9; 2375208,6)	2335274,5 (2038224,0; 2675617,0)
GMT	День 15	6281926,9 (5810107,0; 6792061,6)	2380959,0 (2063441,9; 2747334,9)
GMT	День 30	6286969,0 (5832409,6; 6776955,4)	2303456,2 (2002524,6; 2649610,7)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	2,95 (2,669; 3,253)	1,03 (0,992; 1,073)
FI GM[1]	День 30 по сравнению с днем 1	2,94 (2,676; 3,239)	1,01 (0,965; 1,058)
% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	62,8% (56,57%; 68,82%)	1,6% (0,19%; 5,53%)
% 2-кратного[2]	День 30 по сравнению с днем 1	64,6% (58,53%; 70,41%)	1,5% (0,19%; 5,45%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	37,5% (31,56%; 43,83%)	1,6% (0,19%; 5,53%)
% 4-кратного[2]	День 30 по сравнению с днем 1	38,4% (32,50%; 44,58%)	1,5% (0,19%; 5,45%)

Серотип O15

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V**	**Плацебо**
GMT	День 1	1178299,6 (1056703,9; 1313887,4)	1188287,9 (1014882,9; 1391321,1)
GMT	День 15	5790439,7 (5353107,3; 6263500,7)	1198106,9 (1021376,8; 1405416,7)
GMT	День 30	5728512,6 (5308296,8; 6181993,5)	1204454,0 (1026963,7; 1412620,0)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	4,97 (4,461; 5,545)	1,02 (0,974; 1,070)
FI GM[1]	День 30 по сравнению с днем 1	4,98 (4,477; 5,544)	1,02 (0,961; 1,075)
% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	82,6% (77,37%; 87,07%)	0,8% (0,02%; 4,28%)
% 2-кратного[2]	День 30 по сравнению с днем 1	84,0% (79,03%; 88,24%)	1,5% (0,19%; 5,45%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	59,3% (52,96%; 65,40%)	0,8% (0,02%; 4,28%)
% 4-кратного[2]	День 30 по сравнению с днем 1	58,6% (52,34%; 64,57%)	0,8% (0,02%; 4,21%)

Серотип O16

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V**	**Плацебо**
GMT	День 1	1040760,3 (957123,1; 1131706,2)	1089930,0 (964478,4; 1231699,4)
GMT	День 15	5395867,2 (4945129,5; 5887688,6)	1068317,6 (948255,2; 1203581,7)
GMT	День 30	5148889,9 (4731805,0; 5602738,7)	1119689,3 (994125,9; 1261112,1)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	5,20 (4,673; 5,785)	1,03 (0,987; 1,083)
FI GM[1]	День 30 по сравнению с днем 1	5,03 (4,565; 5,539)	1,06 (0,992; 1,124)
% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	86,6% (81,73%; 90,51%)	0,8% (0,02%; 4,28%)
% 2-кратного[2]	День 30 по сравнению с днем 1	86,3% (81,56%; 90,23%)	1,5% (0,19%; 5,45%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	63,2% (56,97%; 69,19%)	0,8% (0,02%; 4,28%)
% 4-кратного[2]	День 30 по сравнению с днем 1	62,0% (55,81%; 67,87%)	1,5% (0,19%; 5,45%)

Серотип O18A

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V**	**Плацебо**
GMT	День 1	1190203,0 (1087258,8; 1302894,3)	1302260,8 (1143295,8; 1483328,6)
GMT	День 15	4279941,4 (3862457,1; 4742550,6)	1343837,5 (1178013,2; 1533004,1)
GMT	День 30	4072329,3 (3684419,9; 4501079,2)	1356020,6 (1188694,1; 1546900,9)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	3,65 (3,282; 4,058)	1,06 (1,025; 1,097)
FI GM[1]	День 30 по сравнению с днем 1	3,41 (3,095; 3,758)	1,07 (1,014; 1,128)
% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	69,2% (63,08%; 74,80%)	0,8% (0,02%; 4,28%)
% 2-кратного[2]	День 30 по сравнению с днем 1	69,2% (63,24%; 74,73%)	1,5% (0,19%; 5,45%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	47,8% (41,53%; 54,17%)	0,0% (0,00%; 2,84%)
% 4-кратного[2]	День 30 по сравнению с днем 1	43,0% (36,90%; 49,19%)	0,8% (0,02%; 4,21%)

Серотип O25B

Конечная точка (95% CI)	Момент времени	ExPEC10V	Плацебо
GMT	День 1	386797,7 (340192,1; 439788,2)	374962,9 (316641,9; 444025,8)
GMT	День 15	2214631,7 (1915515,0; 2560457,0)	362651,4 (304024,4; 432583,7)
GMT	День 30	2124158,2 (1851850,8; 2436507,4)	372616,7 (314118,4; 442009,2)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	5,96 (5,129; 6,937)	1,02 (0,965; 1,073)
FI GM[1]	День 30 по сравнению с днем 1	5,57 (4,851; 6,389)	1,04 (0,963; 1,114)
% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	77,9% (72,24%; 82,83%)	0,8% (0,02%; 4,28%)
% 2-кратного[2]	День 30 по сравнению с днем 1	77,9% (72,44%; 82,81%)	2,3% (0,48%; 6,60%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	58,9% (52,56%; 65,02%)	0,8% (0,02%; 4,28%)
% 4-кратного[2]	День 30 по сравнению с днем 1	56,7% (50,43%; 62,73%)	1,5% (0,19%; 5,45%)

Серотип O75

Конечная точка (95% CI)	**Момент времени**	**ExPEC10V**	**Плацебо**
GMT	День 1	1610037,7 (1463566,9; 1771167,0)	1522567,0 (1323219,9; 1751946,3)
GMT	День 15	3874235,9 (3529397,7; 4252766,2)	1527849,3 (1311522,5; 1779857,8)
GMT	День 30	3753012,6 (3419195,0; 4119421,0)	1572632,2 (1362470,9; 1815211,0)
FI GM[1]	День 15 по сравнению с днем 1	2,44 (2,236; 2,671)	1,02 (0,977; 1,073)
FI GM[1]	День 30 по сравнению с днем 1	2,32 (2,136; 2,526)	1,04 (0,979; 1,109)
% 2-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	53,0% (46,61%; 59,25%)	1,6% (0,19%; 5,53%)
% 2-кратного[2]	День 30 по сравнению с днем 1	51,0% (44,74%; 57,14%)	2,3% (0,48%; 6,60%)
% 4-кратного[2]	День 15 по сравнению с днем 1	25,3% (20,06%; 31,12%)	1,6% (0,19%; 5,53%)
% 4-кратного[2]	День 30 по сравнению с днем 1	23,6% (18,58%; 29,18%)	2,3% (0,48%; 6,60%)

Конечная точка (95% CI)	Момент времени	ExPEC10V	Плацебо

Когорта 2: выходные данные для первичного анализа.

1 = FI GM по сравнению с исходным уровнем (день 1).

2 = процентная доля участников с кратностью увеличения по сравнению с исходным уровнем (день 1).

CI = доверительный интервал; GM = среднее геометрическое, GMT = среднее геометрическое титра; FI = кратность увеличения.

95% CI для GMT и FI GM определен на основании t-распределения.

95% CI для процентной доли участников с 2- и 4-кратным увеличением получен с применением метода Клоппера-Пирсона.

Величина ответа в день 15 (GMT) была сходной между когортами 1 и 2 для всех серотипов.

Пример 8. Новые композиции ExPEC и иммуногенность у кроликов

[0420] Было разработано новое исследование, которое включало 2 адаптированные композиции (также называемые в данном документе адаптированными составами) вакцины ExPEC (ExPEC9V a и b, таблица 17). Эти адаптированные составы обеднены полисахаридом серотипа O8 и имеют повышенное содержание полисахаридов серотипа O75 *E. coli* (ExPEC9V b), поскольку для этих антигенов наблюдалась низкая иммуногенность в ходе анализа когорты 1 из клинического испытания фазы 1/2a. В качестве контроля для проверки описанных выше более ранних экспериментов также оценивали композицию ExPEC10V. Также был включен контроль с физиологическим раствором (невакцинированная группа).

[0421] Общая цель исследования состояла в том, чтобы оценить, влияют ли каким-либо образом изменения в вакцинной композиции по сравнению с вышеописанными ExPEC10V (обедненность полисахаридом O8 и увеличение дозы, в частности, полисахаридного антигена O75) на иммунный ответ, индуцированный вакциной. В частности, цель состояла в том, чтобы увидеть, действительно ли увеличение количества конъюгата полисахаридного антигена O75 *E. coli* по сравнению, например, с конъюгатом полисахаридного антигена O6 *E. coli* в поливалентных

конъюгированных вакцинных композициях приводит к избирательному улучшению иммунного ответа на серотип O75 *E. coli* и, таким образом, приводит к более равномерному усилению иммунного ответа среди составляющих серотипов *E. coli*. Для этого ответы с образованием антител, индуцированные различными составами вакцины ExPEC, оценивали в установленной доклинической модели иммуногенности с использованием новозеландских белых кроликов (NZW).

План эксперимента

[0422] Новозеландские белые кролики (NZW, возраст 13 недель в начале исследования) получали 3 внутримышечные иммунизации (500 мкл/инъекция) с помощью различных составов вакцины ExPEC или физиологического раствора, вводимых с интервалом в 2 недели (таблица 17). Исследование включало 4 различные группы (таблица 18): группа 1 (ExPEC10V) получала 8 мкг/доза O1A, O2, O6A, O4, O8, O15, O16, O18 и O75 и 16 мкг/доза O25B (т. е. 0,5 мл композиции, содержащей по 16 мкг/мл каждого из полисахаридных антигенов O1A, O2, O6A, O4-Glc+, O8, O15, O16, O18A и O75 и 32 мкг/мл полисахаридного антигена O25B, при этом каждый полисахаридный антиген по отдельности биоконъюгирован с белком-переносчиком EPA, см. примеры выше); группа 2 (ExPEC9V a) получала 8 мкг/доза O1A, O2, O6A, O4, O15, O16, O18A и O75 и 16 мкг/доза O25B (т. е. 0,5 мл композиции, содержащей по 16 мкг/мл каждого из полисахаридных антигенов O1A, O2, O6A, O4-Glc+, O15, O16, O18A и O75 и 32 мкг/мл полисахаридного антигена O25B, при этом каждый полисахаридный антиген по отдельности биоконъюгирован с белком-переносчиком EPA, см. примеры выше); группа 3 (ExPEC9V b) получала 8 мкг/доза O1A, O2, O6A, O4, O15, O16 и O18A и 16 мкг/доза O75 и O25B (т. е. 0,5 мл композиции, содержащей по 16 мкг/мл каждого из полисахаридных антигенов O1A, O2, O6A, O4-Glc+, O15, O16 и O18A и 32 мкг/мл полисахаридных антигенов O25B и O75, при этом каждый полисахаридный антиген по отдельности биоконъюгирован с белком-переносчиком EPA, см. примеры выше).

[0423] Буфер, используемый для составления смеси, содержал 6,19 мМ KH2PO4, 3,81 мМ Na2HPO4, 5% сорбита (вес/вес), 10 мМ метионина, 0,02% PS80 (вес/вес), pH 7,0. Животные из контрольной группы (группа 4) получали физиологический раствор (0,9% (вес/об.) раствор хлорида натрия). Каждая экспериментальная группа содержала по 10 животных. Уровни антител в сыворотке крови, измеренные посредством ELISA (общий IgG), оценивали до иммунизации (день 0) и после иммунизации (дни 14, 28 и 42).

Таблица 17. Различные поливалентные вакцинные композиции ExPEC

Серотипы	ExPEC10V	ExPEC9V a	ExPEC9V b
O1A	8	8	8
O2	8	8	8
O4	8	8	8
O6A	8	8	8
O8	8	0	0
O15	8	8	8
O16	8	8	8
O18A	8	8	8
O25B	16	16	16
O75	8	8	16
Всего PS (мкг)	88	80	88

Таблица 18. Экспериментальные группы

Группы	Обработка	Введение доз в дни	Число животных
1	ExPEC10V	0, 14, 28	10
2	ExPEC9V a (O75:O6 в соотношении 1:1)	0, 14, 28	10
3	ExPEC9V b (O75:O6 в соотношении 2:1)	0, 14, 28	10
4	Физиологический раствор	0, 14, 28	10

[0424] Потенциальные реакции в участке инъекции контролировали с использованием балльной системы Дрейза перед каждой дозой через примерно 6 часов после дозы в каждый день введения доз и ежедневно в течение 7 дней после инъекции. Если наблюдались случайные эффекты в участке инъекции, то ежедневные наблюдения продолжались до тех пор, пока баллы не возвращались к 0.

[0425] Животных взвешивали индивидуально (в граммах) один раз в ходе периода перед обработкой, ежедневно в течение 3 дней после введения каждой дозы, а затем один раз в неделю. Животных осматривали по меньшей мере один раз в день в

отношении ухудшения их состояния здоровья или неблагоприятных клинических эффектов. В дни введения доз животных исследовали в отношении реакции на обработку перед введением дозы и через примерно 6 часов после обработки (одновременно с осмотром участка инъекции). Температуру тела контролировали с использованием ректального цифрового термометра и регистрировали до введения дозы, через 6 ч. и через 24 ч. после каждой дозы. При выходе температуры тела за пределы нормального для кроликов диапазона 38-40°C ежедневно проводились дополнительные измерения до тех пор, пока температура тела не возвращалась в диапазон, определенный этими значениями.

[0426] Животные получали 3 внутримышечные иммунизации ExPEC10V, ExPEC9V a, ExPEC9V b или физиологический раствор, вводимые с интервалом в 2 недели. Уровни антител измеряли посредством ELISA в день 0 (до вакцинации) и дни 14, 28 и 42 (после вакцинации).

[0427] Уровни антител в сыворотке крови, индуцированные каждым из O-антигенов, включенных в вакцинные композиции ExPEC, анализировали посредством ELISA с использованием программного обеспечения Gen 5. OD при 450 нм анализировали в 4-параметрической (4PL) модели нелинейной регрессии. Полумаксимальная эффективная концентрация (EC50) рассчитывалась для каждого отдельного образца на основании двух повторностей кривых 12-стадийного титрования. Результаты для образцов выражены в виде титров EC50.

[0428] Оценка ответа с образованием антиген-специфических антител в сыворотке крови у кроликов NZW показала, что все тестируемые вакцинные композиции ExPEC (ExPEC10V, ExPEC9V a и ExPEC9V b) индуцировали значительное усиление ответов с образованием антител ко всем вакцинным антигенам в дни 14, 28 и 42 после вакцинации по сравнению с контрольным физиологическим раствором (фиг. 6). Вторая доза всех тестируемых вакцинных композиций ExPEC стимулировала ответы с образованием антител, о чем свидетельствует значительное усиление антиген-специфических ответов с образованием антител от дня 14 до дня 28 после вакцинации. Дополнительный бустерный эффект третьей дозы вакцины ExPEC был очевидным для определенных антигенов и композиций.

Средние геометрические титров антител (GMT) к антигену O75 увеличивались с повышением концентрации полисахарида O75 (фиг. 6). Композиция ExPEC9V b, содержащая повышенную концентрацию полисахарида O75 (16 мкг), индуцировала более высокую кратность увеличения GMT и GMT для O75 в дни 14, 28 и 42 после

вакцинации по сравнению с композициями ExPEC9V a и ExPEC10V, которые содержат только 8 мкг полисахарида O75 (таблица 19).

Таблица 19. Оценка ответов с образованием антител к O75 в различных вакцинных композициях ExPEC

Обработка	Ответы с образованием антител к O75	Момент времени после вакцинации			
		День 0	День 14	День 28	День 42
ExPEC10V	GMT	38	288	5322	15052
	95% CI	26,7 – 53,2	115,0 – 720,4	2430,2 – 11653,4	7569,2 – 29930,8
	Кратность увеличения GMT	na	7,6	141,2	399,4
ExPEC9V a	GMT	41	192	7116	20798
	95% CI	20,1 – 84,5	83,9 – 439,6	3769,1 – 13436,4	16368,0 – 26425,8
	Кратность увеличения GMT	na	4,7	172,7	504,7
ExPEC9V b	GMT	42	585	20303	30269
	95% CI		264,3 – 1296,6	9403,1 – 43836,5	20294,9 – 45146,3
	Кратность увеличения GMT	na	14,0	486,9	726,0

n.a.: не применимо; GMT: средние геометрические титров антител; CI: доверительный интервал; кратность увеличения GMT по сравнению с днем 0 (исходным уровнем до вакцинации).

[0429] Оценка веса тела, температуры тела и реакций в участке инъекции показывает, что все тестируемые вакцинные композиции ExPEC хорошо переносились животными (данные не показаны).

[0430] В заключение следует отметить, что все тестируемые вакцинные композиции ExPEC были иммуногенными у кроликов NZW, при этом значительное усиление ответов с образованием антиген-специфических антител в сыворотке крови наблюдалось в дни 14, 28 и 42 после вакцинации по сравнению с контрольным физиологическим раствором. Все тестируемые вакцинные композиции ExPEC были способны стимулировать ответы с образованием антител, специфичных к полисахаридам. Кроме того, все тестируемые вакцинные композиции на основе ExPEC хорошо переносились животными, при этом нежелательные явления, связанные с вакциной, не наблюдались. Важно отметить, что композиция ExPEC9V b, содержащая повышенную концентрацию полисахарида O75, индуцировала более сильные ответы с образованием антител к O75 (кратность увеличения GMT и GMT) по сравнению с

композициями, которые содержат более низкую концентрацию полисахарида O75 (ExPEC9Va и ExPEC10V). Таким образом, повышенная доза O75 в композиции ExPEC9V b улучшает иммунный ответ на серотип O75, и поэтому такая композиция приводит к более равномерному усилению иммунного ответа среди серотипов в композиции ExPEC9V b.

Пример 9. Испытание эффективности фазы 3 у людей с применением новой композиции ExPEC9V

[0431] Исследование эффективности у людей проводили с 9-валентной вакцинной композицией ExPEC, имеющей повышенную концентрацию полисахаридного антигена O75. Исследование имеет следующее название: "рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое многоцентровое исследование фазы 3 для оценки эффективности, безопасности и иммуногенности вакцинации с помощью ExPEC9V для предупреждения инвазивного заболевания, вызываемого внекишечной патогенной Escherichia coli, у взрослых людей в возрасте 60 лет и старше с инфекцией мочевыводящих путей в анамнезе за последние 2 года", и в данном документе оно будет называться исследованием "BAC3001".

[0432] ExPEC9V представляет собой находящуюся в разработке 9-валентную вакцину-кандидат для предупреждения инвазивного заболевания, вызываемого внекишечной патогенной *Escherichia coli* (ExPEC) (IED), у взрослых людей в возрасте 60 лет и старше. ExPEC9V состоит из полисахаридных (PS) O-антигенов серотипов O1A, O2, O4, O6A, O15, O16, O18A, O25B и O75 ExPEC, биоконъюгированных по отдельности с белком-переносчиком — генетически детоксифицированной формой экзотоксина A (EPA), полученного из *Pseudomonas aeruginosa*, как подробно описано в предыдущих примерах. Вакцина ExPEC9V охватывает 9 указанных серотипов *E. coli*, которые являются одними из наиболее преобладающих O-серотипов ExPEC, отвечающие за приблизительно 65% всех случаев IED.

ЦЕЛИ И КОНЕЧНЫЕ ТОЧКИ

Цели	Конечные точки
Первичные	
• Продемонстрировать эффективность ExPEC9V по сравнению с плацебо в предупреждении первого события IED с микробиологическим подтверждением на основе анализа крови, других стерильных сред или мочи, вызываемого O-серотипами O1A, O2, O4, O6A, O15, O16, O18A, O25B и O75 ExPEC9V	• Первое событие IED с микробиологическим подтверждением на основе анализа крови, других стерильных сред или мочи, вызываемое O-серотипами O1A, O2, O4, O6A, O15, O16, O18A, O25B и O75 ExPEC9V
• Продемонстрировать эффективность ExPEC9V по сравнению с плацебо в предупреждении первого события IED с микробиологическим подтверждением на основе анализа крови или других стерильных сред, вызываемого O-серотипами ExPEC9V	• Первое событие IED с микробиологическим подтверждением на основе анализа крови или других стерильных сред, вызываемое O-серотипами ExPEC9V

Цели	Конечные точки
Вторичные	
• Продемонстрировать эффективность ExPEC9V по сравнению с плацебо в предупреждении всех IED (включая несколько IED у одного участника), вызываемых O-серотипами ExPEC9V	• Все IED (включая несколько IED у одного участника), вызываемые O-серотипами ExPEC9V
• Продемонстрировать эффективность ExPEC9V по сравнению с плацебо в предупреждении первого события IED с госпитализацией, вызываемого O-серотипами ExPEC9V	• Первое событие IED с госпитализацией, вызываемое O-серотипами ExPEC9V
• Продемонстрировать эффективность ExPEC9V по сравнению с плацебо в предупреждении первого события IED, отвечающего критериям сепсиса, вызываемого O-серотипами ExPEC9V	• Первое событие IED, отвечающее критериям сепсиса, вызываемое O-серотипами ExPEC9V
• Продемонстрировать эффективность ExPEC9V по сравнению с плацебо в предупреждении первого события бактериемического (т. е. с микробиологическим подтверждением на основе анализа крови) IED, вызываемого O-серотипами ExPEC9V	• Первое событие бактериемического IED, вызываемое O-серотипами ExPEC9V
• Продемонстрировать эффективность ExPEC9V по сравнению с плацебо в предупреждении первого события пиелонефрита, вызываемого O-серотипами ExPEC9V	• Первое событие пиелонефрита, вызываемое O-серотипами ExPEC9V
• Продемонстрировать эффективность ExPEC9V по сравнению с плацебо в предупреждении первого события UTI, вызываемого O-серотипами ExPEC9V	• Первое событие UTI, вызываемое O-серотипами ExPEC9V

Цели	Конечные точки
• Продемонстрировать эффективность ExPEC9V по сравнению с плацебо в предупреждении всех UTI (включая несколько UTI у одного участника), вызываемых O-серотипами ExPEC9V	• Все UTI (включая несколько UTI у одного участника), вызываемые O-серотипами ExPEC9V
• Продемонстрировать эффективность ExPEC9V по сравнению с плацебо в предупреждении первого события IED, вызываемого любым O-серотипом ExPEC	• Первое событие IED, вызываемое любым O-серотипом ExPEC
• Продемонстрировать эффективность ExPEC9V по сравнению с плацебо в предупреждении первого события пиелонефрита, вызываемого любым O-серотипом ExPEC	• Первое событие пиелонефрита, вызываемое любым O-серотипом ExPEC
• Продемонстрировать эффективность ExPEC9V по сравнению с плацебо в предупреждении первого события UTI, вызываемого любым O-серотипом ExPEC	• Первое событие UTI, вызываемое любым O-серотипом ExPEC
• Оценить иммуногенность ExPEC9V в подгруппе для оценки иммуногенности	• Титры антител к вакцинным антигенам O-серотипов в подгруппе для оценки иммуногенности, определенные посредством мультиплексного электрохемилюминесцентного иммуноанализа (ECL) и мультиплексного анализа опсонофагоцитарного уничтожения (MOPA) в день 30, день 181, год 1, год 2 и год 3

Цели	Конечные точки
• Оценить безопасность и реактогенность ExPEC9V	• Зафиксированные в процессе опроса местные и системные AE (собранные в течение 14 дней после вакцинации [от дня 1 до дня 15] в подгруппе для оценки безопасности) • Сообщаемые добровольно AE (собранные в течение 29 дней после вакцинации [от дня 1 до дня 30] у всех участников) • Серьезные нежелательные явления (SAE) у всех участников
• Оценить сохранение состояния здоровья и качества жизни, связанного со здоровьем (HRQoL), у получавших ExPEC9V по сравнению с плацебо согласно измерению с помощью опросника в виде краткой формы оценки здоровья-36 (SF-36) и 5-уровневой описательной системы в виде опросника EuroQol из 5 категорий (EQ-5D-5L). • Оценить влияние IED, вызываемого O-серотипами ExPEC9V, на физическое и психическое здоровье и общее HRQoL согласно измерению с помощью SF-36 • Оценить влияние UTI, вызываемого O-серотипами ExPEC9V, на физическое и психическое здоровье и общее HRQoL согласно измерению с помощью SF-36	• Ответы согласно SF-36 и EQ-5D-5L в запланированные моменты времени

Цели	Конечные точки
• Оценить степень уязвимости у участников, получавших ExPEC9V, по сравнению с плацебо на исходном уровне, в год 1, год 2, год 3 и во время IED	• Индекс уязвимости как мера уязвимости на исходном уровне, в год 1, год 2, год 3 и во время IED
• Определить использование медицинских ресурсов в случае событий IED и UTI, вызываемых любым O-серотипом ExPEC	• Использование медицинских ресурсов в случае событий IED • Использование медицинских ресурсов в случае событий UTI (только в подгруппе для оценки иммуногенности) и событий острого бактериального простатита (ABP) (только в подгруппе для оценки иммуногенности) • Госпитализация и продолжительность пребывания в больнице в связи с событиями IED, UTI или ABP
• Определить смертность, ассоциированную с IED	• Смертность, связанная с IED, и смертность от всех причин
Поисковые	
• Оценить эффективность ExPEC9V по сравнению с плацебо в предупреждении первого события IED, вызываемого O-серотипами ExPEC9V, устойчивыми к ≥ 1, ≥ 2 и ≥ 3 антибиотикам	• Первое событие IED, вызываемое O-серотипами ExPEC9V, демонстрирующими устойчивость к ≥ 1, ≥ 2 и ≥ 3 антибиотикам в микробиологическом профиле

Цели	Конечные точки
• Оценить эффективность ExPEC9V по сравнению с плацебо в предупреждении первых событий UTI без осложнений, с осложнениями и рецидивирующих событий UTI, вызываемых O-серотипами ExPEC9V	• Первое событие UTI без осложнений, вызываемое O-серотипами ExPEC9V • Первое событие UTI с осложнениями, вызываемое O-серотипами ExPEC9V • Первое рецидивирующее событие UTI (rUTI), вызываемое O-серотипами ExPEC9V • Первое рецидивирующее событие UTI без осложнений, вызываемое O-серотипами ExPEC9V
• Оценить эффективность ExPEC9V по сравнению с плацебо в предупреждении первого события ABP, вызываемого O-серотипами ExPEC9V	• Первое событие ABP, вызываемое O-серотипами ExPEC9V
• Оценить титры антител к вакцинным антигенам O-серотипов у участников с IED	• Титры антител к ExPEC9V, определенные посредством мультиплексного иммуноанализа на основе ECL и анализов MOPA у участников с IED, где сыворотка крови получена во время диагностики при подозрении на IED
• Оценить тяжесть IED	• Тяжесть IED (наличие сепсиса или септического шока) у участников с IED

Цели	Конечные точки
• Определить коррелят защиты для опосредованного вакциной иммунного ответа, связанный с эффективностью вакцины	• Титры антител к ExPEC9V, определенные посредством мультиплексного иммуноанализа на основе ECL и анализов MOPA в день 1 перед вакцинацией, день 30 и во время диагностики при подозрении на IED (у всех участников) или во время события UTI или ABP (только в подгруппе для оценки иммуногенности), в связи с эффективностью вакцины
• Оценить эффективность ExPEC9V по сравнению с плацебо в предупреждении первого события инвазивного заболевания, вызываемого *P. aeruginosa*, и первого UTI, вызываемого *P. aeruginosa*	• Первое инвазивное заболевание, вызываемое *P. aeruginosa* • Первое событие UTI, вызываемое *P. aeruginosa*

ОБЩИЙ ПЛАН

[0433] Данное исследование представляет собой рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое многоцентровое интервенционного исследование фазы 3 с параллельными группами, которое должно проводиться с участием примерно 18556 стабильных с медицинской точки зрения взрослых людей в возрасте ≥ 60 лет и с UTI в анамнезе за последние 2 года.

[0434] Все участники включены в исследование и рандомизированы параллельно в соотношении 1:1 для получения ExPEC9V либо плацебо и получают исследуемую вакцину (внутримышечная инъекция 0,5 мл (в дельтовидную мышцу)) в день 1. Окончательный анализ по первой первичной конечной точке (с микробиологическим подтверждением на основе анализа крови, других стерильных сред или мочи) проводится тогда, когда в исследовании будут наблюдаться 72 события IED, вызванные вакцинными серотипами, или не позднее чем тогда, когда последний участник пройдет период последующего наблюдения в течение вплоть до 36 месяцев

после вакцинации. Вторая первичная конечная точка (с микробиологическим подтверждением на основе анализа крови или других стерильных сред) тестируется иерархически, когда первая первичная конечная точка продемонстрирует статистическую значимость. Для окончательного анализа по второй первичной конечной точке (с микробиологическим подтверждением на основе анализа крови или других стерильных сред) должны наблюдаться 53 события IED, вызванные вакцинными серотипами, в соответствии со второй первичной конечной точкой. Вакцинная композиция ExPEC9V содержит 16 мкг/мл каждого из полисахаридных антигенов O1A, O2, O6A, O4-Glc+, O15, O16 и O18A и 32 мкг/мл полисахаридных антигенов O25B и O75, при этом каждый полисахаридный антиген по отдельности биоконъюгирован с белком-переносчиком EPA, см. примеры выше (например, это такая же композиция, как используемая в группе 3 иммунизаций кроликов в примере 8 выше; вспомогательные вещества являются такими же, как описано для вакцины ExPEC10V, используемой в исследовании BAC1001 из примера 7). Плацебо представляет собой 0,9% вес/об. хлорида натрия.

ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ

[0435] Ключевые оценки безопасности включают SAE, физикальный осмотр и показатели жизненно важных функций. Кроме того, зафиксированные в процессе опроса местные и системные AE и сообщаемые добровольно AE регистрируются для участников в "подгруппе для оценки безопасности", т. е. приблизительно 4000 участников из выбранных исследовательских центров, которые до рандомизации дали информированное согласие на проведение дополнительных оценок.

ОЦЕНКИ ИММУНОГЕННОСТИ

[0436] Для оценки иммуногенности уровни антител к IgG, вырабатываемых в ответ на вакцину против каждого из 9 вакцинных O-серотипов и белка-переносчика EPA, измеряют с помощью мультиплексного иммуноанализа на основе ECL, а уровни специфичных в отношении серотипа функциональных антител измеряют посредством MOPA. Анализ иммуногенности выполняется для участников в "подгруппе для оценки иммуногенности", т. е. для примерно 1200 участников из выбранных исследовательских центров, которые до рандомизации дали информированное согласие на проведение дополнительных оценок иммуногенности, а также для всех участников с подтвержденным событием IED и для участников в подгруппе для оценки иммуногенности с событием UTI или острого бактериального простатита (ABP).

ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ

[0437] Основная цель состоит в том, чтобы продемонстрировать эффективность ExPEC9V по сравнению с плацебо в предупреждении первых событий IED, вызываемых серотипами ExPEC O1A, O2, O4, O6A, O15, O16, O18A, O25B и O75. События, определенные как IED, UTI или ABP, собираются для всех участников в течение всей продолжительности исследования (1096 дней; 3 года). Ожидается, что во время последующего наблюдения в рамках исследования участники проинформируют исследовательский центр как можно скорее, если они будут ощущать какие-либо признаки или симптомы UTI или ABP или если у них произойдет какое-либо первичное выявление или ухудшение симптомов, которые могли быть вызваны системной инфекцией. Кроме того, все участники будут опрошены в отношении прошлых госпитализаций или медицинских явлений, которые могли представлять собой UTI, ABP или потенциальные IED и которые не были зафиксированы исследовательским центром в режиме реального времени. Собираются данные об использовании медицинских ресурсов, связанные с обращениями за медицинской помощью по причине IED (у всех участников) и по причине UTI или ABP (только в подгруппе для оценки иммуногенности). Для измерения качества жизни, связанного со здоровьем, используются два инструмента оценки результатов на основе опроса пациентов (PRO): SF-36 версии 2 и EQ-5D-5L. Кроме того, уязвимость оценивается с использованием SPPB и шкалы оценки индекса уязвимости.

ОЦЕНКИ ИММУНОГЕННОСТИ

[0438] Для оценки иммуногенности уровни антител к IgG, вырабатываемых в ответ на вакцину против каждого из 9 вакцинных O-серотипов и белка-переносчика EPA, измеряют с помощью мультиплексного иммуноанализа на основе ECL, а уровни специфичных в отношении серотипа функциональных антител измеряют посредством MOPA. Анализ иммуногенности выполняется для участников в "подгруппе для оценки иммуногенности", т. е. для примерно 1200 участников из выбранных исследовательских центров, которые до рандомизации дали информированное согласие на проведение дополнительных оценок иммуногенности, а также для всех участников с подтвержденным IED и для участников в подгруппе для оценки иммуногенности с событием UTI или ABP. Образцы крови для оценки иммуногенности в день 1 и день 30 собирают у всех участников.

ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ

[0439] Ключевые оценки безопасности включают SAE, физикальный осмотр и показатели жизненно важных функций. Кроме того, зафиксированные в процессе

опроса местные и системные AE и сообщаемые добровольно AE регистрируются для участников в "подгруппе для оценки безопасности", т. е. приблизительно 4000 участников из выбранных исследовательских центров, которые до рандомизации дали информированное согласие на проведение дополнительных оценок.

АНАЛИЗЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ

[0440] При первичном анализе по первой первичной конечной точке оценивается количество участников с по меньшей мере 1 событием IED, вызванным серотипами O1A, O2, O4, O6A, O15, O16, O18A, O25B и O75 ExPEC, с началом через по меньшей мере 29 дней после вакцинации в группе активной вакцины (ExPEC9V) по сравнению с группой плацебо в популяции для оценки эффективности без нарушений протокола (PPE). При первичном анализе по второй первичной конечной точке оценивается количество участников с по меньшей мере 1 событием IED с микробиологическим подтверждением на основе анализа крови или других стерильных сред, вызванным серотипами O1A, O2, O4, O6A, O15, O16, O18A, O25B и O75 ExPEC, с началом через по меньшей мере 29 дней после вакцинации (с дня 30) в группе активной вакцины (ExPEC9V) по сравнению с группой плацебо в популяции PPE. Также учитывается период последующего наблюдения. Для участников с событием IED период последующего наблюдения определяется как период между вакцинацией и возникновением первого события. Для участников без события IED он представляет собой период между вакцинацией и последним визитом (или последним контактом для участников, прекративших участие в исследовании). Нулевая гипотеза VE $\leq$ 20% тестируется в сравнении с альтернативной гипотезой VE > 20%.

[0441] Стратегия постадийного иерархического тестирования применяется в отношении следующих конечных точек.

Первичные:

- Первое IED с микробиологическим подтверждением на основе анализа крови, других стерильных сред или мочи, вызываемое O-серотипами ExPEC9V
- Первое IED с микробиологическим подтверждением на основе анализа крови или других стерильных сред, вызываемое O-серотипами ExPEC9V

Вторичные

- Все IED (включая несколько IED у одного участника), вызываемые O-серотипами ExPEC9V
- Первое событие IED с госпитализацией, вызываемое O-серотипами ExPEC9V

- Первое событие IED, отвечающее критериям сепсиса, вызываемое O-серотипами ExPEC
- Первое событие бактериемического IED, вызываемое O-серотипами ExPEC9V
- Первое событие пиелонефрита, вызываемое O-серотипами ExPEC9V
- Первая UTI, вызываемая O-серотипами ExPEC9V
- Все UTI (включая несколько UTI у одного участника), вызываемые O-серотипами ExPEC9V
- Первое событие IED, вызываемое любым O-серотипом ExPEC
- Первое событие пиелонефрита, вызываемое любым O-серотипом ExPEC
- Первая UTI, вызываемая любым O-серотипом ExPEC

[0442] В данной стратегии тестирования вторая первичная конечная точка тестируется только тогда, когда первая первичная конечная точка продемонстрировала статистическую значимость. В случае, если первая первичная конечная точка продемонстрировала статистическую значимость с 72 событиями, выполняется промежуточный анализ по второй первичной конечной точке (с микробиологическим подтверждением на основе анализа крови или других стерильных сред), если в это время наблюдаются менее чем 53 события. Если вторая первичная конечная точка не демонстрирует значимость, то окончательный анализ по второй первичной конечной точке выполняют в случае, если наблюдаются 53 события IED, вызванные вакцинными серотипами, в соответствии с определением второй первичной конечной точки. Кроме того, первая ключевая вторичная конечная точка тестируется только тогда, когда обе первичные конечные точки демонстрируют статистическую значимость. Первая ключевая вторичная конечная точка включает все события IED, вызываемые ExPEC9V, с началом через по меньшей мере 29 дней после вакцинации (PPE) до конца периода последующего наблюдения.

[0443] Считается, что у участника имеется IED, если нижеследующие критерии удовлетворяются и подтверждаются независимым комитетом по экспертной оценке конечных точек (IEAC).

[0444] Взрослый участник с диагностированным IED является любым участником, имеющим:

- признаки и симптомы системной бактериальной инфекции, на которые указывает наличие любого из следующего:
  - температура < 36,0°C (96,8°F) или > 38,0°C (100,4°F),

- тахикардия (HR) > 90 уд./мин.,
- тахипноэ (RR) > 20 вдохов/мин. или
- количество лейкоцитов < 4 или > 12 x 10^9/л или 10% незрелых (палочкоядерных) форм

И

- микробиологическое подтверждение с помощью посева:
  - *E. coli* в крови или в любой другой стерильной среде (например, в спинномозговой жидкости [CSF], плевре)

    И/ИЛИ
  - *E. coli* в моче (≥ 10^5 колониеобразующих единиц/мл) с признаками/симптомами UTI и без другого идентифицируемого очага инфекции и с острым изменением общего балла динамической оценки органной недостаточности (SOFA) на ≥ 2 по сравнению с исходным уровнем.

[0445] Для первичных и вторичных конечных точек с IED, вызываемым любым из O-серотипов ExPEC9V (т. е. O1A, O2, O4, O6A, O15, O16, O18A, O25B или O75), должно быть доступно O-серотипирование, и IED должно подтверждаться как положительное по O1A, O2, O4, O6A, O15, O16, O18A, O25B или O75. Для вторичных конечных точек, связанных с любым O-серотипом ExPEC, O-серотипирование не обязательно должно быть доступным. Случаи с несколькими патогенами в результатах посева не учитываются для первичных или вторичных конечных точек, если системная инфекция не может объясняться только *E. coli*, согласно заключению IEAC. Случаи со смесью патогенов и наличием *E. coli* включены в анализы чувствительности.

[0446] Если участник обращался к своему врачу и/или в исследовательский центр с признаками и симптомами UTI, то участник определяется как имеющий симптоматическую UTI, если нижеследующие критерии удовлетворяются и подтверждаются IEAC для случаев пиелонефрита.

[0447] Взрослый человек с подтвержденной пиурией (количество лейкоцитов (WBC) ≥ 10 клеток/мм^3) и микробиологическим подтверждением путем посева *E. coli* в моче (≥ 10^5 колониеобразующих единиц/мл) с одним из следующих определений в отношении признаков и симптомов:

- для UTI без осложнений — по меньшей мере 2 из следующих признаков или симптомов:
  - дизурия,
  - учащенное мочеиспускание,
  - неотложные позывы к мочеиспусканию или
  - боль в надлобковой области;
- для UTI с осложнениями (cUTI):
  - по меньшей мере 2 из следующих признаков или симптомов:
    - озноб, дрожь или жар, ассоциированные с лихорадкой (например, температура ≥ 38,0°C),
    - дизурия, учащенное мочеиспускание или неотложные позывы к мочеиспусканию,
    - боль внизу живота или боль в области таза или
    - тошнота или рвота,

    И
  - по меньшей мере 1 из следующих осложняющих факторов:
    - задержка мочеиспускания в анамнезе (у участников мужского пола),
    - применяемый в настоящее время постоянный мочевой катетер,
    - обструктивная уропатия или
    - любая соответствующая функциональная или анатомическая аномалия;
- для пиелонефрита (независимо от первопричинной аномалии мочевыводящих путей) с по меньшей мере 2 из следующих симптомов:
  - озноб, дрожь или жар, ассоциированные с лихорадкой (например, температура ≥38,0°C), или
  - боль в боку или болезненность в реберно-позвоночном углу при физикальном осмотре, или
  - тошнота или рвота;
- для рецидивирующей UTI (rUTI):
  - рецидив UTI без осложнений и/или с осложнениями с частотой, составляющей два UTI за последние шесть месяцев, или
  - рецидив UTI без осложнений и/или с осложнениями с частотой, составляющей по меньшей мере три UTI в год.

[0448] Для вторичных конечных точек с UTI, вызываемой любым из O-серотипов ExPEC9V (т. е. O1A, O2, O4, O6A, O15, O16, O18A, O25B или O75), должно быть доступно O-серотипирование, и UTI должна подтверждаться как положительная по O1A, O2, O4, O6A, O15, O16, O18A, O25B или O75. Для вторичных конечных точек, связанных с любым O-серотипом ExPEC, O-серотипирование не обязательно должно быть доступным. Случаи с несколькими патогенами в результатах посева и с наличием *E. coli* не учитываются для вторичных конечных точек. Эти случаи включены в анализы чувствительности.

[0449] В качестве поисковой конечной точки сообщалось, что у участников, соответствующих приведенному выше определению IED (за исключением микробиологического подтверждения *E. coli*) или UTI, но с образцами (мочи в случае UTI), положительными по *P. aeruginosa* ($\geq 10^5$ колониеобразующих единиц/мл в случае UTI), имеется инвазивное заболевание, обусловленное *P. aeruginosa*, или UTI, вызванная *P. aeruginosa*, соответственно. Серотипирование для *P. aeruginosa* не выполнялось. Образцы со смесью патогенов и наличием *P. aeruginosa* не учитываются для данной поисковой конечной точки.

[0450] В качестве поисковой конечной точки эффективности для ABP сообщалось о событиях, вызываемых серотипами O1A, O2, O4, O6A, O15, O16, O18A, O25B и O75 ExPEC.

[0451] Если участник обращается к своему врачу и/или в исследовательский центр с признаками и симптомами UTI, то участник определяется как имеющий симптоматический ABP, если удовлетворяются нижеследующие критерии.

[0452] Взрослый человек с подтвержденной пиурией (количество WBC $\geq$ 10 клеток/мм^3) и микробиологическим подтверждением путем посева *E. coli* в моче ($\geq 10^5$колониеобразующих единиц/мл) с лихорадкой и острым началом следующего.

- симптомы раздражающего мочеиспускания:
    - дизурия,
    - учащенное мочеиспускание,
    - неотложные позывы к мочеиспусканию или
- симптомы обструктивного мочеиспускания:
    - затрудненное начало мочеиспускания,
    - неполное мочеиспускание,
    - напряжение при мочеиспускании,

- слабая струя и

- боль в надлобковой области, области прямой кишки или промежности.

[0453] Специалистам в данной области будет понятно, что в описанные выше варианты осуществления могут быть внесены изменения без отступления от общей идеи изобретения. Таким образом, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными раскрытыми вариантами осуществления, но предусматривает охват модификаций в рамках сущности и объема настоящего изобретения, определенных настоящим раскрытием.

Последовательности

SEQ ID NO: 1 (консенсусная последовательность гликозилирования)

Asn-X-Ser(Thr), где X может представлять собой любую аминокислоту, 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-переносчик 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)

MNNLIMNNWCKLSIFIIAFILLWLRRPDILTNAQFWAEDSVFWYKDAYENGFLSSLTT PRNGYFQTVSTFIVGLTALLNPDYAPFVSNFFGIMIRSVIIWFLFTERFNFLTLTTRIFLS IYFLCMPGLDEVHANITNAHWYLSLYVSMILIARNPSSKSWRFHDIFFILLSGLSGPFII FILAASCFKFINNCKDHISVRSFINFYLRQPYALMIVCALIQGTSIILTFNGTRSSAPLGF SFDVISSIISSNIFLFTFVPWDIAKAGWDNLLLSYFLSVSILSCAAFVFVKGTWRMKVF ATLPLLIIIFSMAKPQLTDSAPQLPTLINGQGSRYFVNIHIAIFSLLCVYLLECVRGKVA TLFSKIYLTILLFVMGCLNFVITPLPNMNWREGATLINNAKTGDVISIQVLPPGLTLEL RKK

SEQ ID NO: 5 (пример последовательности нуклеиновой кислоты *gtrS* O4)

ATGAATAATTTAATTATGAATAACTGGTGTAAATTATCTATATTTATTATTGCATT
TATTTTGCTATGGCTTAGAAGGCCGGATATACTCACAAACGCACAATTTTGGGCA
GAAGATTCCGTTTTCTGGTATAAGGACGCCTATGAGAACGGATTCTTAAGTTCAC
TAACAACGCCTAGGAATGGGTATTTCCAGACTGTTTCTACATTTATAGTTGGTCT
GACTGCTTTATTAAATCCAGATTATGCACCTTTTGTTTCTAATTTTTTTGGCATAA
TGATTCGCTCAGTAATTATATGGTTTTTATTTACAGAAAGATTCAACTTCCTCACA
TTGACTACTAGGATTTTCTTATCTATTTATTTTCTATGCATGCCTGGATTGGATGA
AGTTCATGCAAATATAACAAATGCACATTGGTATTTGTCATTATATGTATCAATG
ATCCTGATAGCTCGCAATCCAAGTTCAAAATCATGGAGGTTTCATGATATATTCT
TTATCTTGCTATCCGGGCTCAGTGGCCCATTTATAATTTTCATTTTAGCAGCTTCA
TGCTTTAAATTTATAAATAATTGTAAAGATCATATTAGTGTAAGATCTTTCATAA
ATTTCTACTTGCGTCAGCCATACGCATTAATGATTGTTTGCGCTTTAATTCAAGGA
ACTTCTATAATTCTAACTTTCAATGGCACACGTTCCTCAGCACCGCTAGGATTCA
GTTTTGATGTGATTTCGTCTATTATATCATCGAATATTTTTTATTTACATTTGTCC
CATGGGATATTGCAAAGGCTGGGTGGGATAATTTACTGTTATCTTATTTTTTGTCT
GTTTCGATTTTGTCGTGTGCGGCCTTTGTTTTTGTTAAAGGTACGTGGCGAATGAA
AGTATTTGCAACTTTACCATTGCTAATTATAATATTTTCAATGGCAAAACCACAA
TTGACAGACTCGGCACCTCAATTGCCAACACTTATTAATGGGCAAGGTTCAAGAT
ACTTCGTAAATATACATATTGCGATATTCTCTTTGCTATGTGTTTACTTACTTGAG
TGCGTCAGGGGGAAAGTGGCAACTTTATTTTCCAAAATATACTTAACAATTTTGC
TATTCGTGATGGGATGTTTGAATTTTGTTATCACCCCACTCCCAAACATGAACTG
GAGGGAAGGTGCTACTTTGATTAATAATGCAAAAACTGGTGATGTCATTTCGATT
CAAGTGCTACCACCTGGCCTAACACTTGAACTAAGGAAAAAATAA

SEQ ID NO: 6 (пример последовательности PglB ("дикого типа")

MLKKEYLKNPYLVLFAMIILAYVFSVFCRFYWVWWASEFNEYFFNNQLMIISNDGY
AFAEGARDMIAGFHQPNDLSYYGSSLSALTYWLYKITPFSFESIILYMSTFLSSLVVIP
TILLANEYKRPLMGFVAALLASIANSYYNRTMSGYYDTDMLVIVLPMFILFFMVRMI
LKKDFFSLIALPLFIGIYLWWYPSSYTLNVALIGLFLIYTLIFHRKEKIFYIAVILSSLTLS
NIAWFYQSAIIVILFALFALEQKRLNFMIIGILGSATLIFLILSGGVDPILYQLKFYIFRSD
ESANLTQGFMYFNVNQTIQEVENVDLSEFMRRISGSEIVFLFSLFGFVWLLRKHKSMI
MALPILVLGFLALKGGLRFTIYSVPVMALGFGFLLSEFKAIMVKKYSQLTSNVCIVFA
TILTLAPVFIHIYNYKAPTVFSQNEASLLNQLKNIANREDYVVTWWDYGYPVRYYSD
VKTLVDGGKHLGKDNFFPSFALSKDEQAAANMARLSVEYTEKSFYAPQNDILKTDIL
QAMMKDYNQSNVDLFLASLSKPDFKIDTPKTRDIYLYMPARMSLIFSTVASFSFINLD

TGVLDKPFTFSTAYPLDVKNGEIYLSNGVVLSDDFRSFKIGDNVVSVNSIVEINSIKQG
EYKITPIDDKAQFYIFYLKDSAIPYAQFILMDKTMFNSAYVQMFFLGNYDKNLFDLVI
NSRDAKVFKLKI

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

MLKLFAKYTSIGVLNTLIHWVVFGVCIYVAHTNQALANFAGFVVAVSFSFFANAKFT
FKASTTTMRYMLYVGFMGTLSATVGWAADRCALPPMITLVTFSAISLVCGFVYSKFI
VFRDAK

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

MKISLVVPVFNEEEAIPIFYKTVREFEELKSYEVEIVFINDGSKDATESIINALAVSDPL
VVPLSFTRNFGKEPALFAGLDHATGDAIIPIDVDLQDPIEVIPHLIEKWQAGADMVLA
KRSDRSTDGRLKRKTAEWFYKLHNKISNPKIEENVGDFRLMSRDVVENIKLMPERNL
FMKGILSWVGGKTDIVEYVRAERIAGDTKFNGWKLWNLALEGITSFSTFPLRIWTYI
GLVVASVAFIYGAWMILDTIIFGNAVRGYPSLLVSILFLGGIQMIGIGVLGEYIGRTYIE
TKKRPKYIIKRVKK

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

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGC
CTGCCACTAAGGCGATACCCAAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGA
TTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAAGAAATCCTCCTGGT
AACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTA
GAATCACTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCC
ATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATGAACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTT
TAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCATTTGTCGT
GGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAA
CCTTGCTGCCATGATTGCACGTTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCA
AAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCCGTCATCCAGACTAAAGAGCCGC
TGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGATC
AGCCGCAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTCGCTATGTGCTTTCTGC
CGATATTTGGCCGGAACTGGAACGTACTCAGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAG
CTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCCGTTGATGCAATGCTGA
TGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTG
TGAAGTATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTG

AGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAATCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAA
AATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAATCTTCCTG
CCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATT
CAAAGTTTTCCAGGATTTTCCTTGTTTCCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCG
TTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTAACGCTCGTCACATCATAGGCATG
CATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATACCTC
TATTAATCAAACTGAGAGCCGCTTATTTCACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAA
TAAATTAAGTGAAAATACTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTGGTTCAGCTGT
AGTTCGTCACATTATAAATAATACGCAGGATAGTGTTGTTAATGTCGATAAATTA
ACGTACGCCGGAAACCGGGAATCACTTGCTGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATG
TTTTTGAACATGCGGATATTTGCGATGCACCTGCAATGGCACGGATTTTTGCTCA
GCATCAGCCGGATGCAGTGATGCACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTCA
ATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTTGGTACTTATGTCCTTTT
GGAAGCCGCTCGCAATTACTGGTCTGCTCTTGATAGCGACAAGAAAAATAGCTTC
CGTTTTCATCATATTTCTACTGACGAAGTATATGGTGATTTGCCTCATCCTGACGA
GGTAAATAATACAGAAGAATTACCCTTATTTACTGAGACAACAGCTTACGCGCCA
AGCAGCCCTTATTCCGCATCCAAAGCATCCAGCGATCATTTAGTCCGCGCGTGGA
AACGTACCTATGGTTTACCGACCATTGTGACTAATTGCTCTAACAATTATGGTCCT
TATCATTTCCCGGAAAAATTGATTCCATTGGTTATTCTCAATGCTCTGGAAGGTA
AAGCATTACCTATTTATGGTAAAGGGGATCAAATTCGCGACTGGCTGTATGTTGA
AGATCATGCGCGTGCGTTATATACCGTCGTAACCGAAGGTAAAGCGGGTGAAAC
TTATAACATTGGTGGGCACAACGAAAAGAAAAACATAGATGTAGTGCTCACTAT
TTGTGATTTGCTGGATGAGATTGTACCGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAAATC
ACTTATGTTGCCGATCGTCCGGGACACGATCGCCGTTATGCGATTGATGCTGAGA
ATATTGGTCGCGAATTGGGATGGAAACCACAGGAAACGTTTGAGAGCGGGATTC
GGAAGACAGTGGAATGGTATCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAATGTGAAAA
GTGGTGCCTATCAATCGTGGATTGAAGAGAACTATGAGGGCCGCCAGTAATGAA
TATCCTCCTTTTTGGCAAAACAGGGCAGGTAGGTTGGGAACTACAGCGTGCTCTG
GCACCTCTGGGTAACTTGATTGCTCTTGATGTTCATTCCACTGATTATTGTGGCGA
TTTCAGTAACCCCGAAGGTGTGGCTGAAACCGTCAAAAAAATTCGCCCAGATGTT
ATTGTTAATGCTGCTGCTCATACCGCGGTAGATAAGGCTGAGTCAGAACCAGAAT
TTGCACAATTACTCAATGCGACCAGCGTTGAAGCAATTGCAAAAGCGGCTAATG
AAGTTGGGGCTTGGGTAATTCATTACTCAACTGACTACGTCTTCCCTGGAAATGG
CGACATGCCATGGCTCGAGACTGATGTAACCGCTCCGCTCAATGTTTATGGCAAA

ACCAAATTGGCTGGAGAAAGAGCATTACAAGAACATTGCGCAAAGCATCTTATT
TTCCGTACCAGCTGGGTATATGCAGGTAAAGGAAATAACTTTGCCAAAACAATGT
TACGTCTGGCAAAAGAGCGCGAAGAACTGGCTGTGATAAACGATCAGTTTGGCG
CACCAACAGGTGCTGAATTGCTGGCTGATTGCACCGCTCATGCCATTCGCGTGGC
ATTAAAAAAACCAGAAGTTGCTGGCTTGTACCATCTGGTAGCAAATGGCACAAC
AACCTGGCACGATTACGCCGCGCTAGTATTCGAAGAAGCCCGTAAAGCAGGGAT
TGACCTTGCACTTAACAAACTCAACGCCGTACCAACAACGGCTTATCCTACTCCA
GCCCGCCGTCCTCATAATTCTCGCCTCAATACCGAAAAGTTTCAGCAGAACTTTG
CGCTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTGGGCGTGAAACGTATGCTCAACGAATTATT
TACGACTACGGCAATTTAACAAATTTTTGCATCTCGCTCATGATGCCAGAGCGGG
ATGAATTAAAAGGAATGGTGAAATGAAAACGCGTAAAGGTATTATTCTGGCTGG
TGGTTCCGGCACTCGTCTTTATCCTGTGACGATGGCAGTGAGTAAACAACTGCTG
CCGATTTATGATAAGCCGATGATTTATTATCCGCTTTCAACGCTTATGTTAGCGGG
TATTCGCGATATTCTTATTATCAGTACGCCACAGGATACACCGCGTTTCCAACAA
TTGTTGGGGGACGGGAGTCAGTGGGGGCTTAATCTACAGTATAAAGTACAACCG
AGTCCGGATGGCCTGGCGCAAGCGTTTATTATTGGTGAAGACTTTATTGGTGGTG
ATGATTGTGCACTCGTACTTGGCGATAATATCTTCTATGGACACGACTTGCCGAA
ATTAATGGAAGCTGCTGTTAACAAAGAAATCGGTGCAACGGTATTTGCTTATCAC
GTCAATGATCCTGAACGTTATGGTGTCGTGGAGTTTGATAATAACGGTACTGCAA
TTAGCCTGGAAGAAAAACCGCTGGAACCAAAAAGTAACTATGCGGTTACTGGGC
TTTATTTCTATGACAATGATGTTGTAGAAATGGCGAAAAACCTTAAGCCTTCTGC
CCGTGGCGAACTGGAAATTACCGATATTAACCGTATTTATATGGAGCAGGGACGT
TTGTCTGTCGCTATGATGGGGCGTGGTTATGCCTGGTTGGATACTGGTACACATC
AAAGTCTTATTGAAGCAAGTAACTTCATTGCCACCATTGAAGAGCGTCAGGGATT
AAAGGTATCTTGCCCGGAAGAGATTGCTTACCGTAAAGGGTTTATTGATGCTGAG
CAGGTGAAAGTATTAGCCGAACCGCTGAAGAAAAATGATTATGGTCAGTATCTG
CTAAAAATGATTAAAGGTTATTAATAAAATGAACGTAATTAAAACTGAAATTCCT
GATGTGCTGATTTTTGAACCAAAAGTTTTTGGTGATGAACGTGGCTTCTTTTTTGA
GAGTTTTAACCAGAAAGTATTTGAAGAAGCTGTAGGACGGAAGGTTGAATTTGTT
CAGGATAACCATTCTAAGTCTAAAATAAATGTATTGCGTGGGATGCATTATCAAA
CACAAAATACTCAAGGAAAACTGGTTCGGGTAATTTCTGGTTCAGTATATGATGT
TGCCGTAGATTTAAGAGAAAAATCAAAGACATTTGGCAAATGGGTGGGTGTAGA
ATTATCTGGGAATAATAAAAGACAATTGTGGATCCCCGAAGGTTTTGCCCATGGT
TTTTATGTGTTGGAGGAGAATACCGAATTTGTTTATAAATGTACCGATACTTATA

ACCCTGCTCATGAACACACATTGCTATGGAATGATCCAACTATCAATATAAGTTG
GCCAATCATACAAAACTGCAAGCCAATTATTTCTGAAAAAGATGCTAATGGACA
TCTTTTTTCACATAAAACCTATTTCTGAAATGCAATATTATGAGTTTAATTAGAAA
CAGTTTCTATAATATTGCTGGTTTTGCTGTGCCGACATTAGTTGCAGTCCCTGCTT
TGGGGATTCTTGCCAGGCTGCTTGGACCGGAGAATTTTGGACTTTTCACACTAGC
ATTCGCTTTGATAGGATATGCAAGTATTTTCGACGCCGGGATTAGTCGAGCTGTA
ATCAGAGAAATCGCTCTTTATCGAGAAAGTGAAAAAGAGCAAATACAAATTATT
TCGACAGCAAGTGTAATCGTACTATTCTTAGGGGTGGTTGCAGCTTTGTTACTTTA
TTTTAGTAGTAATAAAGTTGTTGAGTTATTGAATGTTAGTTCCGTTTATATTGAAA
CAGCAGTGCGTGCATTCTCTGTTATTTCATTTATAATACCTGTGTATCTGATTAAC
CAGATTTGGCTTGGTTATCTGGAAGGGCTAGAAAAATTTGCAAATATAAATGTTC
AGAGAATGATTTCTAGCACAAGCTTGGCTATATTACCAGTGATATTTTGTTATTA
CAATCCCTCGTTGCTTTATGCTATGTATGGGTTGGTGGTTGGGCGTGTGATTTCAT
TTTTGATTAGCGCAATAATTTGTCGAGATATTATTCTTAAAAGTAAACTTTACTTT
AATGTGGCAACTTGCAATCGTCTTATCTCTTTTGGTGGATGGATAACAGTTAGTA
ATATCATAAGCCCAATCATGGCATATTTCGACCGCTTTATCATCTCTCATATTATG
GGGGCTTCGAGAATTGCATTTTATACAGCGCCCTCAGAGGGTGTATCAAGGTTAA
TTAATATCCCATATGCTTTGGCAAGAGCTCTATTTCCTAAATTGGCATATAGCAAT
AATGATGATGAACGAAAAAAATTACAACTACAGAGCTACGCAATTATAAGCATT
GTATGTCTACCCATAGTTGTTATTGGTGTCATTTTTGCCTCATTCATAATGACAAC
ATGGATGGGACCTGATTATGCCTTAGAAGCAGCAACTATCATGAAAATACTTCTT
GCTGGTTTTTTCTTTAACTCTTTAGCGCAAATACCTTATGCATACTTGCAATCTAT
CGGAAAGTCAAAAATTACCGCATTTGTGCATCTCATAGAACTTGCGCCATACTTA
TTATTATTGTATTACTTCACAATGCATTTCGGCATAATTGGCACGGCAATCGCTTG
GTCACTTAGAACATTTTGTGATTTTGTTATACTACTTTCGATATCGAGAAGAAAAT
GATTGCGGTTGATATTGCGCTTGCAACCTACAATGGTGCTAATTTTATTCGGCAA
CAGATTGAATCTATCCAGAAACAAACTTATAGAAATTGGCGTCTTATAATAAGTG
ATGATAACTCGAGTGATGATACTGTTGATATTATTAAGGATATGATGTCTAACGA
CAGTCGTATCTATTTGGTAGGAAATAAAAGACAAGGAGGGGTTATTCAGAACTTT
AATTATGCTCTTTCACAAACTACATCTGAAATTGTGTTACTATGTGACCAGGATG
ACATTTGGCCGGAGGAGCGTCTGGAAATTCTTATAGATAAATTTAAGGCCTTGCA
GCGTAATGATTTTGTTCCGGCAATGATGTTTACTGATTTGAAATTAGTAGACGAA
AATAATTGTTTGATTGCAGAAAGTTTTTATCGAACGAATAATATTAATCCACAAG
ATAATCTGAAAAATAATAATCTTCTCTGGCGTTCAACGGTATATGGCTGTACTTG

CATCATGAATAAGAAACTTGTTGATATTGCATTGCCTATACCTACATATGCACAT
ATGCATGATCAATGGTTGGCATTATTAGCGAAGCAATATGGTAACATTTTTTATT
TCGACTATGCGTCTGTTCGTTATAGGCAACATTCTACAAATGTTGTTGGTGGTAG
AAATAAAACGCCATTTCAAAAATTTAATTCCATACAAAAAAACCTAAAAAGGAT
TAATTTGCTAGTGGATAGAACTGTTGCTTTAATTAAATCAAATAACGATTTCTATC
CAGGGAATAAAATGGAAAATAAAATTGATTACTTAAAATTTGGAGTGAATGAAG
TATTACCTTATCTTTTTAAAGGAAACAAGAAAGTTTTTTCACTTTGTGTATTAATT
AGTTTGGCATTACAAAAATGATATATTTATTATTTTTTTTTGCACTGTTTATGATC
TGTACGTTTTTAACACACAGGCGACAGGCATTATATGTTGTATCTGCGTTAGTATT
TCTTTTTTTGGCTTTAACCTATCCATCAGGAGGGGACTGGATAGGTTATTTTCTCC
ATTATGACTGCATGGTTAATGAGCAGTGTAATAATGGTTTTATAATGTTTGAACC
TGGATATGAATTAATTGTTTCCTTATTTGGATATTTGGGATTTCAGACAATTATTA
TTTTTATAGCCGCTGTAAATGTAATTCTAATATTAAATTTTGCAAAGCATTTTGAA
AACGGAAGTTTTGTTATTGTTGCGATAATGTGCATGTTCCTTTGGAGTGTTTATGT
TGAGGCGATTAGACAGGCTCTGGCCTTATCTATAGTTATATTTGGGATTCATTCTC
TTTTTTTGGGTAGAAAAAGGAAATTTATAACATTAGTATTATTTGCGTCAACTTTC
CATATAACTGCTTTGATTTGTTTTCTTCTAATGACTCCTCTATTTTCAAAGAAATT
AAGCAAGATAATAAGTTATAGCCTATTAATTTTCAGTAGCTTCTTTTTCGCTTTTT
CTGAAACCATATTAAGTGCACTCCTTGCAATTTTGCCAGAAGGATCCATTGCCAG
TGAAAAATTAAGTTTTTACTTAGCAACCGAGCAATACAGGCCACAGTTATCTATT
GGGAGTGGCACTATTCTTGACATTATACTTATTTTTCTGATATGTGTAAGTTTTAA
ACGAATAAAGAAATATATGCTCGCTAATTATAATGCTGCAAATGAGATATTGCTT
ATTGGTTGCTGTCTTTATATTTCTTTCGGTATTTTTATCGGGAAAATGATGCCAGT
TATGACTCGCATTGGTTGGTATGGTTTTCCATTTGTTATAGTACTTCTTTATATTA
ACTTGGGTTATTCAGAATATTTTAAGAGGTATATAAATAAAAGAGGGTGTGGGTA
TAGCAAATTATTAATTGCTTTTTATTTTTTGCTACAAATTTTGCGACCATTAACAT
ATGATTATAGCTATTATAATATAATGCACCAGGATACTTTGCTGAATAGGTTTGA
TGCATTAGATGATGCATCATTAAGACAATCAGCGAAGAGAAAATGTTTCGATTTG
GGAAAGATAGGATATGGTTTCTTATGTAGTATATAATATCCTGCATTCATTCGGA
TAATTTCCTATGGAAGTGTCCTTTGCTCTGTCTGTCCTCATTTGTTGAAATTTTATG
TTAATAAGAAGCTTTAGATAACCACTTAGGAACTGTATGTTTGATCTGTCCAAAA
ATTATATTATTGTAAGTGCGACGGCGCTGGCTTCCGGAGGTGCATTAACTATATT
AAAGCAATTTATAAAACATGCATCACAAAATTCAAATGACTATATTATGTTTGTA
TCTGCGGGATTGGAGTTGCCGGTCTGTGATAACATCATTTACATAGAAAACACAC

CAAAAGGATGGTTGAAAAGAATATATTGGGATTGGTTCGGTTGTCGGAAGTTTAT
CTCGGAACATAAGATTAACGTTAAGAAAGTAATTTCTCTACAAAATTCCAGTTTG
AATGTTCCTTACGAACAGATTATTTACTTGCACCAGCCAATTCCTTTTAGTAAAGT
TGATTCTTTTTTAAAAAATATCACATCCGATAACGTAAAGCTTTTTTTATATAAAA
5 AGTTTTATTCCTATTTTATATTTAAATATGTGAATGCCAATACAACCATCGTAGTG
CAAACGAATTGGATGAAAAAAGGAGTGCTGGAGCAATGTGATAAAATTAGTACC
GAAAGGGTCCTTGTTATAAAACCTGATATCAAAGCATTTAATAATACTAATTTTG
ATGTAGATATGGATGTATCTGCAAAAACACTCTTATATCCAGCGACACCACTTAC
CTATAAAAATCATTTGGTCATTCTGAAGGCGTTGGTTATTTTAAAGAAAAAGTAT
10 TTTATAGATGATCTGAAATTCCAAGTGACTTTTGAAAAGAATAGGTACAAAAATT
TTGATAAGTTTGTGCAATTAAATAACTTAAGCAAAAACGTTGATTATCTCGGCGT
TCTTTCATACTCGAACTTGCAAAAAAAATATATGGCGGCATCTTTAATCGTTTTTC
CTAGCTATATCGAATCATATGGGTTACCACTCATCGAAGCTGCTAGTTTAGGAAA
AAAAATCATTAGTAGTGATCTTCCTTATGCCCGGGATGTTTTAAAGGATTATAGC
15 GGCGTAGATTTTGTAATTTACAATAATGAAGATGGCTGGGCTAAGGCGTTGTTTA
ATGTTTTAAATGGCAATTCGAAGCTCAATTTTAGGCCTTATGAAAAAGATAGTCG
TTCATCTTGGCCACAGTTCTTCTCTATTTTGAAATAAGGTGTATTATGTTTAATGG
TAAAATATTGTTAATTACTGGTGGTACGGGGTCTTTCGGTAATGCTGTTCTAAGA
CGTTTTCTTGACACTGATATCAAAGAAATACGTATTTTTTCCCGGGATGAAAAAA
20 AACAAGATGACATGAGGAAAAAATATAATAATCCGAAACTTAAGTTCTATATAG
GTGATGTTCGCGACTATTCGAGTATCCTCAATGCTTCTCGAGGTGTTGATTTTATT
TATCATGCTGCAGCTCTGAAGCAAGTACCTTCCTGCGAATTCCACCCAATGGAAG
CTGTAAAAACGAATGTTTTAGGTACGGAAAACGTACTGGAAGCGGCAATAGCTA
ATGGAGTTAGGCGAATTGTATGTTTGAGTACAGATAAAGCTGTATATCCTATCAA
25 TGCAATGGGTATTTCCAAAGCGATGATGGAAAAAGTAATGGTAGCAAAATCGCG
CAATGTTGACTGCTCTAAAACGGTTATTTGCGGTACACGTTATGGCAATGTAATG
GCATCTCGTGGTTCAGTTATCCCATTATTTGTCGATCTGATTAAATCAGGTAGACC
AATGACGATAACAGACCCTAATATGACTCGTTTCATGATGACTCTCGAAGACGCT
GTTGATTTGGTTCTTTACGCATTTGAACATGGCAATAATGGTGATATTTTTGTCCA
30 AAAGGCACCTGCGGCTACCATCGAAACGTTGGCTATTGCACTCAAAGAATTACTT
AATGTAAACCAACACCCTGTAAATATAATCGGCACCCGACACGGGGAAAAACTG
TACGAAGCGTTATTGAGCCGAGAGGAAATGATTGCAGCGGAGGATATGGGTGAT
TATTATCGTGTTCCACCAGATCTCCGCGATTTGAACTATGGAAAATATGTGGAAC
ATGGTGACCGTCGTATCTCGGAAGTGGAAGATTATAACTCTCATAATACTGATAG

GTTAGATGTTGAGGGAATGAAAAAATTACTGCTAAAACTTCCTTTTATCCGGGCA
CTTCGGTCTGGTGAAGATTATGAGTTGGATTCATAATATGAAAATTTTAGTTACT
GGCGCTGCAGGGTTTATCGGTCGAAATTTGGTATTCCGGCTTAAGGAAGCTGGAT
ATAACGAACTCATTACGATAGATCGTAACTCTTCTTTGGCGGATTTAGAGCAGGG
ACTTAAGCAGGCAGATTTTATTTTTCACCTTGCTGGGGTAAATCGTCCCGTGAAG
GAGTGTGAATTTGAAGAGGGAAATAGTAATCTAACTCAACAGATTGTTGATATCC
TGAAAAAAAACAATAAAAATACTCCTATCATGCTGAGTTCTTCCATCCAGGCTGA
ATGTGATAACGCTTATGGAAAGAGTAAAGCAGCTGCGGAAAAAATCATTCAGCA
GTATGGGGAAACGACAAACGCTAAATATTATATTTATCGCTTGCCGAATGTATTC
GGTAAGTGGTGTCGACCAAATTATAACTCCTTTATAGCAACTTTCTGCCATCGCA
TTGCAAATGATGAAGCTATTACAATTAATGATCCTTCAGCAGTTGTAAATCTGGT
GTATATAGATGACTTTTGTTCTGACATATTAAAGCTATTAGAAGGAGCGAACGAA
ACTGGTTACAGGACATTTGGTCCAATTTATTCTGTTACTGTTGGTGAAGTGGCAC
AATTAATTTACCGGTTTAAAGAAAGTCGCCAAACATTAATCACCGAAGATGTAG
GTAATGGATTTACACGTGCATTGTACTCAACATGGTTAAGTTACCTGTCTCCTGA
ACAGTTTGCGTATACGGTTCCTTCTTATAGTGATGACAGAGGGGTATTCTGTGAA
GTATTGAAAACGAAAAACGCGGGCCAGTTTTCGTTCTTTACTGCGCATCCAGGAA
TTACTCGGGGTGGTCATTATCATCATTCCAAAAATGAGAAATTTATTGTCATCCG
AGGAAGTGCTTGTTTCAAATTTGAAAATATTGTCACGAGTGAACGATATGAACTT
AATGTTTCCTCTGATGATTTTAAAATTGTTGAAACAGTTCCGGGATGGACGCATA
ACATTACTAATAATGGCTCGGATGAGCTAGTTGTTATGCTTTGGGCAAATGAAAT
ATTTAATCGTTCTGAACCAGATACTATAGCGAGAGTTTTATCGTGAAAAAATTGA
AAGTCATGTCGGTTGTTGGGACTCGTCCAGAAATTATTCGACTCTCGCGTGTCCTT
GCAAAATTAGATGAATATTGTGACCACCTTATTGTTCATACCGGGCAAAACTACG
ATTATGAACTGAATGAAGTTTTTTTCAAAGATTTGGGTGTTCGCAAACCTGATTA
TTTTCTTAATGCCGCAGGTAAAAATGCAGCAGAGACTATTGGACAAGTTATCATT
AAAGTTGATGAGGTCCTTGAACAGGAAAAACCAGAAGCCATGTTAGTACTTGGC
GATACTAACTCCTGTATTTCAGCAATACCAGCAAAGCGTCGAAGAATTCCGATCT
TCCATATGGAGGCTGGGAATCGTTGTTTTGACCAACGCGTACCGGAAGAAACTA
ACAGAAAAATAGTTGATCATACCGCTGATATCAATATGACATATAGTGATATCGC
GCGTGAATATCTTCTGGCTGAAGGTGTACCAGCCGATAGAATTATTAAAACCGGT
AGCCCAATGTTTGAAGTACTCACTCATTATATGCCGCAGATTGATGGTTCCGATG
TACTTTCTCGCCTGAATTTAACACCTGGGAATTTCTTTGTGGTAAGTGCCCACAGA
GAAGAAAATGTTGATACCCCTAAACAACTTGTGAAACTGGCGAATATACTTAAT

ACCGTGGCTGAAAAATATGATGTCCCGGTAGTTGTTTCTACTCATCCTCGCACTC
GTAACCGCATCAACGAAAACGGTATTCAATTCCATAAAAATATCTTGCTTCTTAA
GCCATTAGGATTTCACGATTACAACCATCTGCAAAAAAATGCACGTGCTGTTTTA
TCGGATAGTGGGACTATTACAGAAGAGTCCTCCATTATGAACTTCCCTGCACTCA
ATATACGAGAAGCGCACGAACGCCCGGAAGGCTTCGAAGAAGGGGCAGTAATG
ATGGTCGGTCTTGAATCTGATCGCGTTTTACAGGCATTAGAAATTATTGCAACAC
AGCCTCGTGGAGAAGTACGCTTACTTCGTCAGGTTAGTGACTATAGCATGCCAAA
TGTTTCAGATAAAGTTCTGCGTATTATCCATTCATATACTGACTACGTTAAACGG
GTTGTCTGGAAGCAATACTAATGAAACTTGCATTAATCATTGATGATTATTTGCC
CCATAGCACACGCGTTGGGGCTAAAATGTTTCATGAGTTAGGCCTTGAATTACTG
AGCAGAGGCCATGATGTAACTGTAATTACGCCTGACATCTCATTACAAGCAATTT
ATTCTATTAGTATGATTGATGGTATAAAGGTTTGGCGTTTCAAAAGTGGACCTTT
AAAGGATGTAGGTAAGGCTAAACGTGCCATAAATGAAACTCTTTTATCTTTTCGC
GCATGGCGCGCATTTAAGCACCTCATTCAACATGATACATTTGATGGTATCGTTT
ATTATTCCCCCTCTATTTTTTGGGGCGACTTGGTTAAAAAAATAAAACAACGATG
CCAGTGCCCAAGCTATCTGATCCTAAGGGATATGTTTCCACAGTGGGTCATTGAT
GCAGGTATGTTGAAAGCCGGTTCACCAATTGAAAAATATTTTAGGTATTTTGAAA
AAAAGTCATATCAGCAGGCTGGCCGGATAGGGGTAATGTCTGATAAGAATCTTG
AGATATTTCGCCAGACCAATAAAGGTTATCCGTGTGAAGTTTTACGTAATTGGGC
CTCAATGACTCCTGTGTCTGCCAGCGATGATTATCATTCACTTCGTCAAAAATAC
GATCTAAAAGATAAAGTCATTTTTTTCTATGGCGGTAATATTGGGCATGCTCAGG
ATATGGCAAACTTAATGCGCCTTGCGCGTAATATGATGCGTTATCATGATGCTCA
TTTCCTGTTTATAGGGCAGGGTGATGAAGTTGAGCTGATAAAATCTCTTGCTGCA
GAATGGAATTTAACTAATTTCACTCATCTACCTTCAGTGAACCAGGAAGAGTTTA
AATTAATTTTATCTGAAGTTGATGTCGGCCTGTTCTCCCTTTCATCTCGCCATTCTT
CACATAATTTCCCCGGAAAATTACTAGGGTATATGGTTCAATCAATCCCGATCCT
TGGGAGTGTGAATGGCGGCAATGATTTAATGGATGTAATTAATAAGCACAGAGC
CGGTTTCATTCATGTTAATGGTGAAGATGATAAACTGTTTGAATCTGCACAATTG
CTTCTTAGTGATTCAGTTTTAAGAAAACAGCTAGGTCAGAACGCTAATGTGTTGT
TAAAGTCTCAATTTTCGGTTGAATCGGCGGCACATACTATCGAAGTCCGACTGGA
GGCTGGAGAATGCGTTTAGTTGATGACAATATTCTGGATGAACTTTTTCGCACTG
CAGCAAATTCTGAACGTTTGCGCGCTCATTATTTATTGCACGCATCTCATCAGGA
GAAGGTTCAACGTTTACTTATTGCATTTGTACGCGACAGCTATGTTGAACCCCAT
TGGCATGAGTTACCGCATCAGTGGGAAATGTTTGTCGTCATGCAAGGGCAATTAG

AAGTTTGTTTGTATGAGCAAAATGGTGAGATCCAAAAACAGTTTGTTGTTGGAGA
CGGTACGGGAATAAGCGTCGTGGAATTTTCCCCAGGAGATATACATAGTGTCAA
ATGCCTGTCACCAAAAGCCCTTATGTTGGAGATAAAGGAGGGGCCATTTGACCC
ACTCAAAGCTAAGGCTTTTTCTAAGTGGTTATAGGGCGATACACCACCGTTTATT
CTTCTATCTTATTCTATACATGCTGGGTTACCATCTTAGCTTCTTCAAGCCGCGCA
ACCCCGCGGTGACCACCCCTGACAGGAGTAGCTAGCATTTGACCACCCCTGACA
GGATTAGCTAGCATATGAGCTCGAGGATATCTACTGTGGGTACCCGGGATCCGTG
TAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAA
TAGGAACTAAGGAGGATATTCATAT

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

MKKIWLALAG LVLAFSASA

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

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGC
CTGCCACTAAGGCGATACCCAAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGA
TTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAAGAAATCCTCCTGGT
AACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTA
GAATCACTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCC
ATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATGAACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTT
TAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCATTTGTCGT
GGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAA
CCTTGCTGCCATGATTGCACGTTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCA
AAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCCGTCATCCAGACTAAAGAGCCGC
TGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGATC
AGCCGCAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTCGCTATGTGCTTTCTGC
CGATATTTGGCCGGAACTGGAACGTACTCAGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAG
CTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCCGTTGATGCAATGCTGA
TGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTG
TGAAGTATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTG
AGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAATCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAA
AATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAATCTTCCTG
CCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATT
CAAAGTTTTCCAGGATTTTCCTTGTTTCCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCG
TTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTAACGCTCGTCACATCATAGGCATG

CATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATACCTC
TATTAATCAAACTGAGAGCCGCTTATTTCACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAA
TAAATTAAGCTAGCGTGAAGATACTTGTTACTAGGGGCGCAGGATTTATTGGTTC
TGCTGTAGTTCGTCACATTATAAATAATACGCAGGATAGTGTTGTTAATGTCGAT
AAATTAACGTACGCCGGAAACCTGGAATCACTTGCTGATGTTTCTGACTCTGAAC
GCTATGTTTTTGAACATGCGGATATTTGCGATGCTGCTGCAATGGCGCGGATTTTT
GCTCAGCATCAGCCGGATGCAGTGATGCACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTGGAT
CGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTTGGTACTTATGT
CCTTTTGGAAGCGGCTCGCAATTACTGGTCTGCTCTTGATGGCGACAAGAAAAAT
AGCTTCCGTTTTCATCATATTTCTACTGACGAAGTCTATGGTGATTTGCCTCATCC
TGACGAAGTAAATAATAAAGAACAATTACCCCTCTTTACTGAGACGACAGCTTAC
GCGCCTAGTAGTCCTTATTCCGCATCAAAAGCATCCAGCGATCATTTAGTCCGCG
CGTGGAAACGTACCTATGGTTTACCGACTATTGTGACTAACTGTTCGAATAACTA
CGGTCCTTATCACTTTCCGGAAAAATTGATTCCACTAGTAATTCTTAATGCTCTGG
AAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAAAGGGGATCAAATTCGTGACTGGCTGTA
TGTTGAAGATCATGCGCGTGCGTTATATACCGTAGTTACTGAAGGTCAAGCGGGT
GAAACCTATAACATTGGCGGACACAACGAAAAGAAAAACATCGATGTTGTGCTG
ACTATTTGTGATTTGTTGGACGAGATAGTCCCGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGC
AAATTACTTATGTTGCTGATCGCCCAGGGCATGATCGCCGTTATGCGATTGATGC
TGAGAAGATTGGTCGCGAATTGGGATGGAAACCACAGGAAACGTTTGAGAGTGG
GATTCGTAAAACGGTGGAATGGTATTTGGCTAATGCAAAATGGGTTGATAATGTG
AAAAGTGGTGCCTATCAATCGTGGATTGAACAGAACTATGAGGGCCGCCAGTAA
TGAATATCCTCCTTTTTGGCAAAACAGGGCAGGTAGGTTGGGAACTACAGCGTGC
TCTGGCACCTCTGGGTAATTTGATTGCTCTTGATGTTCACTCCACTGATTACTGTG
GTGATTTTAGTAACCCTGAAGGTGTGGCTGAAACAGTCAAAAGAATTCGACCTG
ATGTTATTGTTAATGCTGCGGCTCACACCGCAGTAGATAAGGCTGAGTCAGAACC
CGAATTTGCACAATTACTCAATGCGACTAGCGTTGAATCAATTGCAAAAGCGGCA
AATGAAGTTGGGGCTTGGGTAATTCATTACTCAACTGACTACGTATTCCCTGGAA
ATGGCGACACGCCATGGCTGGAGATGGATGCAACCGCACCGCTAAATGTTTACG
GTGAAACCAAGTTAGCTGGAGAAAAAGCATTACAAGAGCATTGTGCGAAGCACC
TAATTTTCCGTACCAGCTGGGTCTATGCAGGTAAAGGAAATAATTTCGCCAAAAC
GATGTTGCGTCTGGCAAAAGAGCGTGAAGAACTAGCCGTTATTAATGATCAGTTT
GGTGCGCCAACAGGTGCTGAACTGCTGGCTGATTGTACGGCACATGCCATTCGTG
TCGCACTGAATAAACCGGATGTCGCAGGCTTGTACCATTTGGTAGCCAGTGGTAC

CACAACCTGGTACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAATGCAGGC
ATTCCTCTTGCACTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAACAACTGCCTATCCTACAC
CAGCTCGTCGTCCACATAACTCTCGCCTTAATACAGAAAAATTTCAGCAGAATTT
TGCGCTTGTATTGCCTGACTGGCAGGTTGGTGTGAAACGCATGCTCAACGAATTA
TTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTGATGGTGGAGCAA
GATGAATTAAAAGGAATGATGAAATGAAAACGCGTAAAGGTATTATTTTAGCGG
GTGGTTCTGGTACTCGTCTTTATCCTGTGACTATGGTCGTCAGTAAACAGCTATTA
CCTATATATGATAAACCGATGATCTATTATCCGCTTTCTACACTGATGTTAGCGG
GTATTCGCGATATTCTGATTATTAGTACGCCACAGGATACTCCTCGTTTTCAACAA
CTGCTGGGTGACGGTAGCCAGTGGGGCCTGAATCTTCAGTACAAAGTGCAACCG
AGTCCGGATGGTCTTGCGCAGGCATTTATTATCGGTGAAGAGTTTATTGGTGGTG
ATGATTGTGCTTTGGTACTTGGTGATAATATCTTCTACGGTCACGACCTGCCTAAG
TTAATGGATGCCGCTGTTAACAAAGAAAGTGGTGCAACGGTATTTGCCTATCACG
TTAATGATCCTGAACGCTATGGTGTCGTTGAGTTTGATAAAAACGGTACGGCGAT
CAGCCTGGAAGAAAAACCGCTACAACCAAAAAGTAATTATGCGGTAACCGGGCT
TTATTTTTATGATAACGACGTTGTCGAAATGGCGAAAAATCTTAAGCCTTCTGCC
CGCGGTGAACTGGAAATTACCGATATTAACCGTATCTATATGGAACAAGGGCGTT
TATCTGTTGCCATGATGGGGCGTGGTTATGCGTGGTTAGACACGGGGACACATCA
GAGCCTGATTGAGGCAAGCAACTTTATTGCAACAATTGAAGAGCGTCAGGGGCT
GAAAGTTTCCTGCCCGGAAGAAATTGCTTACCGTAAAGGGTTTGTTGATGCTGAG
CAGGTGAAAGTATTAGCTGAACCTCTGAAAAAAAATGCTTATGGTCAGTATCTGC
TGAAAATGATTAAAGGTTATTAATAAAATGAACGTAATTAAAACAGAAATTCCT
GATGTACTGATTTTTGAACCGAAAGTTTTTGGTGATGAGCGTGGTTTCTTTTTTGA
GAGCTTTAACCAGAAGGTTTTTGAGGAAGCTGTAGGCCGCAAAGTTGAATTTGTT
CAGGATAACCATTCGAAGTCTAGTAAAGGTGTTTTACGCGGGCTGCATTATCAGT
TGGAACCTTATGCACAAGGAAAATTGGTGCGTTGCGTTGTCGGTGAAGTTTTTGA
CGTAGCTGTTGATATTCGTAAATCGTCATCGACTTTTGGCAAATGGGTTGGGGTG
AATTTATCTGCTGAGAATAAGCGGCAATTGTGGATTCCTGAGGGATTTGCACATG
GTTTTTTAGTGCTGAGTGAGACGGCGGAGTTTTTGTATAAGACGACAAATTATTA
TCATCCTCAGAGTGATAGAGGAATAAAATGGGATGATCCAAGCATCAATATTTC
ATGGCCAGTCGATTCACAAGTGCTGCTATCAGCTAAAGATAATAAGCATCCTCCA
TTAACAAAGATTGAAATGTATAGTTAAGATCACGATAAATCTTGGAAGGGTTGC
AAAATTGAATAAAATAGTGAGCAAAAGTGAAATAAGGAACGTAATCCACAATGC
TGGCTATATGATGATTACTCAGATAGCTTTATATGTTGCACCATTATTTATACTGA

GTTATCTGTTAAAAACACTGGGGGTTGCACAGTTTGGTAATTATGCCTTAATACT
ATCAATCGTTGCATATTTACAGATTATAACGGATTATGGTTTTTCTTTTAGTGCAA
GTCGTGCGATCTCACAGAATAGAGAGGACAAAGAATATATATCAAAAATTTATC
TGTCAACTATGACTATCAAGTTGGCGATATGCGCTTTCTTATTCTTATTGCTCATG
CTATTTTTAAATCTTTTGCCTGTGCAAGCTGAATTAAAACAAGGAATATTATATG
GATATCTTCTTGTAATAGGAAATACTTTCCAACCACAATGGTTTTTCCAAGGTATC
GAAAAATTAAAAATCATAGCCCTTTCTAATGTTATATCAAGATGCGCCGCGTGTT
TACTTGTATTTATCTATGTGAGGAATAGCGAGGATTTACAAAAAGCACTTTTAGT
ACAGTCACTTCCATTAGTAATTTCTGCGATTGGATTAAATATATTTATATTGAAAT
ATATCAATATTATTTTTCCGGAAAAAAAATTATTTAAGGTAATTTTAAAAGAAGG
TAAGGATTTTTTTCTTGCATCACTTTATTCTGTTATTCTCAATAATAGTGGCATTTT
TCTATTAGGGATTTTTACTAATCCTGTTATTGTTGGTGTATATGCCGCCGCTGAAA
AGATAGTCAAGGCCGTATTGTCGCTATTTACACCACTGACGCAAGCTATATATCC
TTATAATTGTCGTAAGTTTTCACTATCCGTATTTGACGGCATTGAGGCAGCAAAA
AAAACTGGTATACCAATTATAATTTTAGCATTTATAGCTGCTGTTATCGTTGCAAT
TACCTTACCTGTTGCAATCGACTATCTTAATTTTCCAAAAGAAACAATTTTTGTAG
GTCAAATATTAAGTGCATGGATCTTTTTTGGTGTTCTTAATAATGTATTCGGCATT
CAGATATTGAGTGCATCAGGAAGAAGTAAAATATATAGTAGGATGGTATTCGTA
TCAGCGCTTATAACATTACTTTTGATTACTCTATTATTGCAGTTTTGTAACGCCAC
TGGAGTGGCATGTGCAATATTATTGGGTGAAATGTTCTTATCAATATTGTTACTTA
AGCGATATAAAAAAATAATTTAAGGAATAGTTATGAAGAAGTTATTATTAGTGTT
CGGTACTAGGCCTGAAGCAATAAAGATGGCCTCTATCATTGAATTATTAAAAAA
AGATTGTAGATTCGAATATAAAATATGTGTGACAGGCCAACATAAAGAGATGCT
TGATCAAGTTATGCAAGTATTTGATGTTAAACCTGATTATAATTTACGGATTATG
CAGCCTGGGCAAACATTAGTATCTATAGCAACAAATATACTCTCACGGTTAAGTG
AAGTTTTAATTATAGAAAAGCCAGATATTATACTTGTGCATGGGGATACAACGAC
TACCCTTGCTGCTACTTTAGCTGGGTATTACCACCAAATAAAAGTTTGTCATGTG
GAAGCAGGATTAAGAACAGGGGATATTTACTCTCCTTGGCCTGAAGAGGGCAAT
CGTAAAGTTACAGGGGCATTAGCATGTATTCATTTCGCCCCAACAGAGAGATCAA
AAGATAATCTCCTGAGGGAGGGGGTCAAAGTAAATAATATATTTGTAACGGGTA
ATACCGTCATCGACTCTTTATTTATTGCAAAAGATATCATAGATAATGACCCTAA
TATAAAGAACGCTTTACATAATAAATTTAATTTTCTTGATAAAAGCCGACGAGTA
GTACTTATAACAGGTCATCGAAGAGAAAATTTCGGGAAAGGTTTTGAAGATATA
TGCTTTGCAATAAAGGAATTAGCTTTCATTTATCCTAATGTAGATTTTATTTATCC

GGTGCATCTTAATCCCAATGTAATGGAACCAGTACATCGTATATTAGATAATATA
TGTAATATTTACCTTATTGAGCCCTTGGATTATTTGCCTTTTGTTTATTTAATGAAT
GAGTCATATTTAATATTGACTGATTCAGGGGGGATACAAGAAGAAGCGCCTTCGT
TAGGTAAACCGGTTTTGGTTATGCGTGATACTACTGAACGCCCTGAGGCGGTTGA
GGCTGGTACTGTTGTATTAGTGGGGACTTCTAAGATAAAAATAGTAAATAAAGTA
ACGGAGCTATTAAACAATGCTGATATCTACAATGCTATGTCTCTGTTACATAATC
CATATGGCGATGGAACAGCTGCTCAAAAAATTCTTAATGTGCTCGCCCAAGAGCT
AATTTAATTTAAGCTAAAAATATGTTATTAATTATTGCTGATTATCCAAACGAAA
TGAATATGCGCGAGGGAGCTATGCAACGAATAGATGCGATAGACTCTCTCATTC
GAGATCGCAAGCGAGTGTATTTGAATATTTCATTCAAAAAGCATCTAGTTCGCTC
AAATAGTTCCTTTAATAATGTTATAGTTGAAAATCTAAATGCAATTATTCACAGA
AACATCATAAAACAGTACATGCAAAAATCAACAACTATATATGTTCATTCTGTTT
ATAATTTATTAAAGGTTATAACGCTCATTGATCTAAAAAAAACAATTCTTGATAT
ACATGGTGTTGTACCGGAAGAACTTTTGGCAGATAATAAAAAATTACTTAGTAAA
GTATATAACATGGTGGAAAAAAAAGGTGTCCTTGGATGCAAAAAATTAATACAC
GTCAGTACAGAAATGCAAAAACACTATGAAGCAAAATATGGAGTAAACTTGGCT
GAAAGGTCAATAGTGCTCCCGATTTTTGAATATAAAAATATAACCCAATCGCAAA
ACAAATGGACAGAAAATAAAATACGAAGTATCTATCTTGGAGGATTACAAACAT
GGCAAAATATTGATAAAATGATTCAAGTTTGTGATGACACAGTGATAAACAATG
AAGCAGGTAAGTATGAATTCAACTTTTTCATCCCACAGAGTAACTTGGAAGGGTT
TATAGATAAATATTCGTTAAAATTACATAATATCAATGCTAATGCATCTACGCTA
TCACGTGATGAAGTAATTCCCTTTCTAAAAGAATGTCATATTGGTTTTGTATTGCG
CGATGATATAATAGTAAACAGAGTTGCGTGCCCTACAAAATTGGTTGAATATTTA
GAGTGTGGTGTCGTTCCAGTTGTGCTCTCCCCACTTATAGGTGATTTTTATTCGAT
GGGATATCAATACATTACTACAGAGGAAATGGCTAACAGAAGTATAAGTTTGTT
GGATCTTGAAAAAATGGCTGCACATAATTTACAAATTTTGACTTCTTATCAGAAG
AGAACCTACAAGGCACAGAAAGAACTTATTGCTCAACTGTGCTGAATTTTTTACA
TATATAAAATTATGTAAGCATATCGCGGGTCAGGTAATTGTATGCGTATCAAATA
TAAAGATAACGGTTATATATTATGTTTTCTATTATGTTTCATTTTGAGCTACTTAG
TTTTACTCAAATCTGACTACTTTCCTGCTGATTTTCTGCCATATACAGAAATATAC
GATGGGACATACGGAGAAATCAATAATATTGAGCCTGCCTTTTTATATTTAACAC
GGTTGTTTCATTATTTAAATTTCCCCTATATATTTTTTGCAATGTTAGTTTGTGCCT
TATGTTTAAGTTGGAAAATAAAATATGCAAGAAAAATAATTAAAGATAGTTATA
TATATTTGTTCTTGTATGTATATGTATCATTTTATGTGTTTTTGCATGAAATGACTC

AATTGCGCATAGCAATTGCAGTCACTATGTGCTATGTGTCGGTTTATTATTACTTT
TATAAAAATTGTATTAAACATGCACTGCCATGGATGGTGTTGGCTATTTTGTTTCA
TTACAGCGCCTTGCTTTTATTTATGTCATTATTTATATACAGTTATAGGAGGTTAT
TAATAGTAATTATAGGGTTTGTAATATGTATGAGCTTTTTAAACGTGTATGCAGA
TACAATTGCACTATATTTGCCAAATGAAAAAATAGTAAATTATTTATATAGTATT
TCATCATCATTAGACAATAGAAATGATTTGGCAATATTCAACCTGAATAATATAA
TATTTTTATCAATATTTATTTTGATCTTTTATCTTAGCCGATATATAAAATTAAAT
GATAATGAGGCGAAGTTTATTAAGTATGTGCAATGTTCAGGAATATTAGCCTTTT
GTATTTTCTTTCTGGCTAGTGGAGTCCCGGTCATTGCTTATCGAACTGCAGAGTTG
CTGCGAATATTTTATCCGATGGCTTTAGTATTAATCCTTTCGCATATAAAAAATAA
TAATATGCGTTATTTTATTGCAGTCATTATAGTTATCCTTTCAGGCTTAATGTTGT
TTATAACACTAAGGGCTGTATCAATAGTTGGTCAAGGATTATAAAATGAATGTTG
CTATTTTGTTGTCTACGTATAATGGCGAAAAATATTTAGAGGAACAACTGGATTC
ATTGCTGCTTCAAAGTTATCAGGATTTTGTAGTGTATATCCGTGATGACGGATCA
TCTGATAGAACTGTAAATATAATAAACCAATACGTAATGAAAGATAACAGATTT
ATTAACGTGGGTAATTCAGAAAATCTTGGTTGTGCTGCTTCGTTTATTAATTTATT
AAGAAATGCTTCAGCCGATATTTATATGTTTTGTGACCAAGATGATTATTGGCTT
CCGAATAAATTACAGCGTGCTGTGGATTATTTTTCGGCTATTGATCCTTTACAACC
TACCTTGTATCATTGCGATCTAAGCGTTGTTGATGAAAAACTTAATATTATACAA
AATTCATTTTTGCAGCATCAGAAAATGTCAGCGTATGATTCAATGAGAAAAAATA
ATCTTTTCATACAAAATTTTGTTGTTGGTTGTTCATGTGCTGTTAATGCTTCACTTG
CGGAATTTGTTCTTTCGCGAATTGGAGAGCAGCATGTAAAAATGATAGCTATGCA
TGACTGGTGGTTAGCCGTGACTGCAAAACTTTTTGGTCGAATCCATTTTGATAAT
ACTCAAACGATTCTTTATCGACAACATCAGGGCAATGTATTAGGTGCAAAATCAT
CAGGTATGATGCGTTTTATTCGATTAGGATTAAATGGGCAAGGGATTTCGCGAGT
AGTATCTTTTAGAAAAAAAGTTTGTGCGCAAAATAAGCTTCTTTTAGATGTCTAT
GATAAAGATTTAAATCTTGAGCAAAAAAAATCTATCAGGCTTGTAATTGAGGGC
CTTAAAGAGAACTCTTCAATTGCTGACCTTTTAAAATGTTTCTATCATGGTAGCTA
TATGCAAGGTTTTAAACGTAATCTTGCCTTAATATATTCAGTTCTTTACACAAAAA
AAAGAAGATAGTGTATCCTTATGAAAAAAATTGCTATTATCGGTACTGTTGGCAT
ACCAGCATCATATGGCGGATTTGAAACATTAGTTGAAAATTTAACAAGATACAAT
TCCTCGGGAGTTGAATATAATGTTTTTTGTTCATCGTTTCACTACAAATCCCACCA
AAAAAAACATAATGGGGCCCGTTTAATTTATATTCCGCTTAAAGCCAATGGATGG
CAGAGCATTGCGTATGACATAATTTCGTTAGCATATTCTATTTTTTTGAAGCCTGA

TGTGATTCTGATTTTAGGGGTTTCTGGTTGTTCATTTTTGCCTTTCTTCAAACTCTT
AACACGCGCTAAGTTTATTACTAATATTGATGGCCTGGAATGGCGAAGAGATAA
ATGGAATTCAAAAGTGAAACGTTTCTTAAAATTTTCAGAAAAAATCGCAGTTCAA
TATTCGGATGTCGTTATTACGGATAATGAGGCAATTTCTGAGTACGTTTTTAACG
AGTATAATAAAGATAGCCGAGTTATTGCCTATGGAGGGGATCATGCATGGTTAA
ATACTGAGGATGTATTTACAACAAGAAATTATAAAAGCGATTACTACCTTTCTGT
ATGTCGTATCGAACCCGAAAACAATGTAGAATTAATTTTAAAAACATTTTCAAAG
CTAAAATATAAAATAAAATTTATTGGAAATTGGAATGGCAGCGAGTTTGGAAAG
AAACTTAGGCTGCATTATTCTAACTATCCAAATATTGAAATGATTGATCCGATTT
ATGATCTTCAACAATTATTTCACTTACGAAATAATTGCATAGGATATATACATGG
TCATTCGGCTGGAGGAACAAACCCTTCTTTAGTCGAGGCAATGCATTTTAGTAAA
CCTATATTTGCATATGATTGTAAGTTTAATAGGTACACTACTGAAAATGAAGCAT
GTTATTTTTCTAATGAATCTGACCTCGCAGAGAAAATCATAATGCATTGTGAGCT
ATCATTAGGTGTCTCTGGCACGAAAATGAAAGAAATTGCTAACCAGAAATACAC
TTGGAGACGAATAGCAGAAATGTATGAGGATTGCTATTAACTCTGTTAAACTTCA
AATCTTTTACAATATATGGCATGACTATAAGCGCATTAATTGTTTTTCAAGCCGCT
CTCGCGGTGACCACCCCCTGACAGGGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAA
GTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATT
CATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATA
AGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTCCAGGCCGCGAGCATTCAGCGCGGTG
ATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTA
TGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCGCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCGT
CTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGAAGTGATTGCCGAAAATCCA
GGCAAGAAACTGGTTCCTTACTATACGGTGAAAGAGTTTGTCGAATCTCTGGAAA
CGCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTAT
TGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATTGATGGTGGTAAC
ACCTTCTTCCAGGACACTATTCGTCGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTTA
ACTTCATCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTC
TATTATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTGGTAGCACCGATCCTGACC
AAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGCCG
ATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTGAATACGGCGATA
TGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCAA
CGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGAATAACGGTGAACTGAGCAGTTA
CCTGATCGACATCACCAAAGATATCTTCACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTA

CCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACCGGTAAATGGAC
CAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGCTGTCGCTGATTACCGAGTCTGTG
TTTGCACGTTATATCTCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTTGCCGCATCTAAAGTTCT
CTCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGT
TCGTCGTGCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCCAGGGCTTCTCTCAGC
TGCGTGCTGCGTCTGAAGAGTACAACTGGGATCTGAACTACGGCGAAATCGCGA
AGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCTGCAGAAAATCACCGA
TGCTTATGCCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAG
CAAATTGCCGATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGATGTCGTTGCTTATGCAGTAC
AGAACGGTATTCCGGTTCCGACCTTCTCCGCAGCGGTTGCCTATTACGACAGCTA
CCGTGCTGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTGACTATTTTGGT
GCGCATACTTATAAGCGTATCGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGG
ATTAA

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

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGC
CTGCCACTAAGGCGATACCCAAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGA
TTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAAGAAATCCTCCTGGT
AACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTA
GAATCACTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCC
ATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATGAACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTT
TAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCATTTGTCGT
GGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAA
CCTTGCTGCCATGATTGCACGTTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCA
AAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCCGTCATCCAGACTAAAGAGCCGC
TGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGATC
AGCCGCAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTCGCTATGTGCTTTCTGC
CGATATTTGGCCGGAACTGGAACGTACTCAGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAG
CTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCCGTTGATGCAATGCTGA
TGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTG
TGAAGTATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTG
AGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAATCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAA
AATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAATCTTCCTG
CCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATT

CAAAGTTTTCCAGGATTTTCCTTGTTTCCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCG
TTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTAACGCTCGTCACATCATAGGCATG
CATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATACCTC
TATTAATCAAACTGAGAGCCGCTTATTTCACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAA
TAAATTAAGTGAAAATACTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTGGTTCAGCTGT
AGTTCGTCACATTATAAATAATACGCAGGATAGTGTTGTTAATGTCGATAAATTA
ACGTACGCCGGAAACCGGGAATCACTTGCTGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATG
TTTTTGAACATGCGGATATTTGCGATGCACCTGCAATGGCACGGATTTTTGCTCA
GCATCAGCCGGATGCAGTGATGCACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTCA
ATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTTGGTACTTATGTCCTTTT
GGAAGCCGCTCGCAATTACTGGTCTGCTCTTGATAGCGACAAGAAAAATAGCTTC
CGTTTTCATCATATTTCTACTGACGAAGTCTATGGTGATTTGCCTCATCCAGATGA
AGTAAATAATACAGAAGAATTACCCTTATTTACTGAGACGACAGCTTACGCGCCA
AGCAGCCCTTATTCCGCATCCAAAGCATCCAGCGATCATTTAGTCCGCGCATGGA
AACGTACGTATGGTTTACCGACCATTGTGACTAATTGCTCGAACAACTATGGTCC
GTATCACTTCCCGGAAAAGCTTATTCCATTGGTTATTCTTAATGCACTGGAAGGT
AAGGCATTACCTATTTATGGCAAAGGGGATCAAATTCGCGACTGGTTGTATGTAG
AGGATCATGCTCGTGCGTTATATACCGTCGTAACCGAAGGTAAAGCGGGTGAAA
CTTATAACATTGGCGGACACAACGAAAAGAAAAACATCGATGTTGTGCTGACTA
TTTGTGATTTGTTGGATGAGATTGTACCGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAAAT
TACTTATGTTGCTGATCGCCCAGGGCATGATCGCCGTTATGCAATTGATGCCGAT
AAAATTAGCCGCGAATTGGGCTGGAAACCACAGGAAACGTTTGAGAGCGGGATT
CGCAAAACGGTGGAATGGTATCTGGCTAATACAAATTGGGTTGAGAATGTGAAA
AGCGGTGCTTATCAGTCATGGATCGAACAAAACTATGAGGGCCGTCAGTAATGA
ATATCCTGCTTTTCGGCAAAACAGGGCAGGTGGGTTGGGAACTGCAGCGTGCTCT
GGCGCCGCTGGGTAATCTGATCGCTCTTGATGTTCACTCCACTAATTATTGTGGA
GATTTCAGCAACCCCGAAGGTGTGGCAGAAACCGTCAAAAAAATTCGTCCTGAC
GTTATTGTTAATGCTGCTGCTCACACTGCAGTAGATAAAGCAGAATCAGAACCGG
ATTTCGCACAATTACTTAACGCGACAAGCGTCGAAGCGATTGCAAAAGCTGCTA
ATGAAGTCGGGGCCTGGGTTATACACTACTCTACTGATTATGTTTTCCCAGGCAG
TGGTGACGCGCCATGGCTGGAAACGGATGCAACAGCACCGCTAAATGTTTACGG
TGAAACAAAATTAGCTGGGGAAAAGGCATTACAAGAACATTGCGCAAAGCATCT
TATTTTCCGTACCAGCTGGGTATACGCTGGTAAAGGAAATAACTTTGCTAAAACG
ATGTTGCGTTTGGCAAAAGAACGCGAAGAACTGGCTGTGATAAACGATCAGTTT

GGCGCACCAACAGGTGCTGAATTGCTGGCTGATTGCACCGCTCATGCCATTCGCG
TGGCATTAAAAAAACCAGAAGTCGCTGGCTTGTACCATCTGGTAGCAAGTGGCA
CAACAACCTGGCACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAG
GGATTAATCTTGCACTTAACAAACTTAACGCCGTGCCAACAACGGCCTATCCCAC
ACCAGCCCGTCGACCCCATAACTCTCGCCTCAATACAGAAAAGTTTCAGCAGAA
CTTTGCGCTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTGGGCGTGAAACGTATGCTCAACGAA
TTATTTACGACTACGGCAATTTAACAAATTTTTGCATCTCGCTCATGATGCCAGA
GCGGGATGAATTAAAAGGAATGGTGAAATGAAAACGCGTAAAGGTATTATTCTG
GCTGGTGGTTCCGGCACTCGTCTTTATCCTGTGACGATGGCAGTGAGTAAACAAT
TGCTGCCGATTTATGATAAGCCGATGATTTATTATCCGCTTTCAACGCTTATGTTA
GCGGGTATTCGCGATATTCTTATTATTAGTACGCCACAGGATACACCGCGTTTCC
AACAATTATTGGGGGACGGGAGCCAGTGGGGTCTTAATCTACAGTATAAAGTAC
AACCGAGTCCGGATGGCCTGGCGCAAGCGTTTATTATTGGCGAAGACTTTATTGG
TGGTGATGATTGTGCACTCGTACTTGGCGATAATATCTTCTATGGACACGACTTG
CCGAAATTGATGGAAGCTGCTGTTAACAAAGAAAGCGGTGCAACGGTATTTGCT
TATCACGTTAATGATCCTGAACGCTATGGTGTCGTGGAGTTTGATAATAACGGTA
CGGCAATTAGCCTGGAAGAAAAACCGCTGGAGCCAAAAAGCAACTATGCGGTTA
CTGGGCTTTATTTCTATGACAATGACGTTGTGGAAATGGCTAAAAACCTTAAGCC
TTCTGCCCGTGGCGAACTGGAAATTACCGATATTAACCGTATTTATATGGAACAA
GGACGTTTGTCTGTAGCCATGATGGGGCGTGGCTATGCATGGTTGGATACAGGGA
CGCATCAAAGCCTTATTGAAGCAAGTAACTTCATTGCAACAATTGAAGAGCGTCA
GGGATTAAAGGTATCTTGCCCGGAAGAGATTGCTTACCGTAAAGGGTTTATTGAT
GCCGAGCAGGTGAAAGTATTAGCCGAACCGCTTATCAAGAATCAATATGGTCAA
TATTTGCTGAAAATGATCAGCGAATAGTATATGGGAACTCAATGATGGATATTAA
ATTAATCTCTTTGCAAAAACATGGGGATGAGCGCGGTGCATTAATTGCTCTTGAA
GAGCAACGAAATATACCTTTCGAAGTCAAAAGAATATATTACATACTTGAGACTC
TTAATGGAGTAAGACGCGGATTTCATGCGCACAAGGTTACTCGTCAGTTAGCTAT
TGTAGTCAAGGGAGCTTGTAAATTTCATCTGGATAATGGTAAAGAAACAAAGCA
GGTGGAACTTAATGATCCAACAATTGCGTTGCTGATAGAACCCTATATATGGCAT
GAAATGTATGATTTTAGTGATGATTGTGTGCTGCTTGTAATTGCGGATGATTTCTA
TAAAGAGTCTGATTATATCCGCAATTATGATGATTTTATTAGAAGAGTAAATTCA
ATTGAGAATTCATAAGCTAAGTGACGTCCAGACAACATCAATTGGTGATGGAAC
AACTATCTGGCAGTTTGTTGTGATACTAAAAGGTGCTGTAATTGGTAATAATTGC
AACATCTGTGCAAATACCTTAATTGAAAATAACGTTGTAATTGGTAACAATGTCA

CAGTCAAAAGCGGTGTGTATATTTGGGATGGCGTTAAAATAGAGGATAATGTTTT
TATTGGTCCTTGTGTAGCATTTACAAATGATAAGTATCCTCGCTCTAAAGTCTATC
CTGATGAATTTTTGCAAACAATAATACGCAAAGGAGCATCAATAGGTGCTAACG
CAACCATCCTGCCAGGAATTGAAATTGGTGAAAAAGCAATCGTTGGTGCGGGGA
GTGTTGTAACCAAAAATGTACCGCCATGCGCAATAGTAGTAGGTAATCCAGCTCG
ATTTATTAAATGGGTAGAGGATAATGAATAAAATTGATTTTTAGATCTTTTTGC
AATTAACCAGCGACAGCACAAAGAATTAGTCTCTGCGTTTAGTAGGGTGCTAGAT
TCTGGTTGGTATATCATGGGCGAAGAACTTGAGCAGTTCGAGAAAGAGTTCGCA
GAATACTGTGGAGTTAAGTATTGCATTGGTGTAGCAAATGGCCTTGATGCGTTGA
TACTAGTATTGAGGGCATGGAAAGAACTTGGCTATCTTGAAGACGGTGACGAGG
TATTAGTACCGGCAAATACATATATTGCTTCTATTCTTGCTATAACAGAGAACAA
ACTTGTTCCTGTTCTTGTTGAACCAGATATAGAAACTTATAATATTAATCCTGCTT
TAATTGAAAATTACATTACGGAAAAAACTAAAGCAATATTACCGGTTCACTTATA
TGGTCTATTGTGCAATATGCCAGAAATTAGTGCAATCGCCAGAAAATATAATCTG
TTGATTCTTGAAGATTGTGCACAAGCACATGGTGCAATACGTGATGGTCGCAAAG
CTGGAGCTTGGGGGGATGCTGCAGGATTTAGTTTTTATCCAGGAAAAAACCTTGG
AGCTTTGGGGGATGCGGGAGCTGTTACTACAAATAATGCAGAATTATCCTCAACT
ATAAAAGCTTTGCGAAATTATGGGTCACATAAGAAATATGAAAATATTTATCAG
GGATTGAATAGTCGATTGGATGAACTGCAAGCAGCCTTATTGCGTGTAAAAATCC
ATACATTACCGGAAGATACTGCGATTCGGCAAAGGATTGCTGAAAAATATATTC
GTGAAATAAAAAACCCTGCGATTACGTTACCAGTGTACGAAGGCCAAGGTGCGC
ATGTTTGGCATTTATTTGTAGTAAGAATCGCTAATCGTGAAAAATTCCAGTCATA
CTTATTAGAGAAGGGTATCAAAACCTTAATTCACTATCCATTACCACCCCATAAG
CAGCAAGCATATCAAAATATGTCTAGCCTTAGCCTTCCAATTACTGAGCAAATTC
ATGATGAAGTCATTTCTTTACCTATAAGTCCGGTAATGAGTGAAGATGATGTCAA
TTATGTAATCAAAATGGTCAATGATTACAAGTAATGAAAAAATTTCTTCAGGTAA
CTATATTATCCGCTATCTATACATTCATTAAAATGATTGCGGGTTTTATCATCGGT
AAGGTAGTAGCAATTTATACAGGGCCATCAGGGGTAGCAATGCTTGGCCAAGTG
CAAAGTTTAATCACAATAGTTGCAGGTACTACCTCTGCACCTGTAAGCACAGGCC
TTGTTCGATATACTGCGGAAAATTGGCAAGAAGGACAAGAAGCATGCGCGCCAT
GGTGGCGCGCATGCTTAAGGGTTACTCTGTTTTTATTCTTGCTTATTATTCCCGTT
GTTATTATATTGTCGAAAAATATTAGTGAGTTACTTTTTAGCGATGGACAATACA
CATGGTTAATCATTTTCGCATGTTGTATATTGCCATTCTCCATTATAAATACATTG
ATCGCTTCAGTTTTAAATGGTCAACAATTTTATAAGCAATATATATTGGTTGGGA

TGTTTTCTGTATTCATTTCTACTATGTTTATGATTTTGTTGATTGTAGCTTATAATC
TTAAAGGTGCATTGATTGCCACAGCTATAAATAGTGCTATTGCTGGTCTTGTATT
GGTTTTATTTTGTCTCAATAAATCTTGGTTTAGATTTAAATATTGGTGGGGTAAAA
CGGATAAAGACAAAATTATAAAAATTATTCATTATACTCTGATGGCTCTGGTTTC
TGTTATCTCCATGCCTACAGCATTGATGTGTATTAGAAAAATATTGATTGCTAAA
ACTGGTTGGGAGGATGCAGGGCAATGGCAGGCCGTATGGAAGATATCTGAGGTT
TATCTTGGTGTTGTGACAATTGCTTTGTCAACATATTTCTTACCAAGATTGACAAT
TATAAAAACAAGTTTCCTTATAAAAAAAGAAGTAAATAGTACTATATTATACATA
ATATCTATTACTTCATTCATGGCGTTGAGTATCTATTTATTCCGCGATTTGGTAAT
AACAGTTTTATTTACTGAACAGTTTCGCTCAGCTCGTGAATTATTTTTATTACAAC
TTATAGGGGATGTAATAAAAATTGCTGGGTTTCTTTATGCATACCCTCTTCAAAG
TCAGGGGCATACTAAACTATTCATCAGTTCAGAAGTGATTTTTTCTATGCTCTTTA
TCATTACCACCTATATTTTTGTTGTAAATTATGGAGTACATGGTGCTAACATAAGT
TATGTCATTACATATAGTTTATATTTTGTGTTTGCATTTGTGTTTACTAATTTTATT
AATGTTAGAAGAAATAATTAAAAACAGAGGTTGAATTTTGAAAATAATTATACC
TGTCTTAGGATTTGGCAGGGCTGGTGGTGAAAGAGTTCTTTCTAAGCTGGCAACT
GAATTGATGAATTATGGACATGATGTAAGTTTTGTTGTTCCAGATAATAGAACTA
ATCCATATTATGCTACCACAGCAAAAATTGTCACGAGTAAATCTAGTCAAAACCG
TGTAAAAATATTGAGAATCATTAAAAATTACTATAATCTGTGGCGTAAATGCATA
GAGTTAAATCCTGATGCTGTAGTTGCTAGTTTTCATTTGACTGCCTATCTTGTCGC
ATTATTACCAATCACCCGTCGTAAGAAATATTATTATATTCAGGCGTATGAAGTT
AATTTTTTTGATAATATAATATGGAAATTAATAGCGGGTTTAACATATTATTTACC
GCTTAAAAAAATACTAAATAGTCCTAATTTGCTTCCTCATAAACATGATGATTTT
ATAGGAGTAGTTCCTGCAGGAGTAGATTTAAACGTTTTCTATCCGAAACCATCAA
ATAGGTTATTAAATGGTCACACATCAATAGGGATTATTGGTAGAAAAGAGAAGC
ACAAAGGAACTAGCGAAATTATTTCAGTATTGTGTTCACTGGAAAATAAAGCTG
GAATTATAATCAATATTGCGATCTATCTTGAAGAAGTTGATAAGCAGCGTTTAAT
CGCTGCCGGGTTTCAGGTTAATTTTTTTCCGATTACTTCTGATTTAGAATTGGCAT
CCTTTTATCGAAGCAATGACATCATGATTGCTGTTGGGTTAATTGAAGATGGCGC
TTTCCATTATCCTTGTGCTGAATCAATGGCTTGTGGTTGTCTTGTTATTTCAAATT
ATGCGCCACTTACTGAAACTAACAGTGTACTTAAATTAGTCAAGTTTGATGCTTG
CAAACTTGGTGAAGCAATTAATCTTTGTCTCAATCTTGACCTAGAAGAAAAAAGC
AAAGAAATCCAATCTAATATTTCTGTGTTGAATAAATATGACTGGAAAATTGTTG
GTGAAACTTTCAATAGTTTATTGTTAGATGCAAATAAATAGTATACGTTGATGGG

GAAAATATGAATATTGTTAAAACTGATATTCCAGATCTGATCGTTCTTGAACCAA
AAGTGTTTAGTGATGAACGCGGCTTTTTTATGGAGAGTTATAATCAGATTGAATT
TGAGAAGGCAATAGGAAGGCACGTAAATTTTGTTCAGGATAATCATTCAAAATC
TAGTAAAGGCGTACTACGTGGGTTGCATTATCAATTAGCACCGTATGCACAGGCT
AAATTAGTTCGATGTGTTGTAGGTCAGGTATTTGATGTTGCTGTTGATCTTAGAA
AAAATTCACCAACGTTCAAAAAATGGTTTGGAATAACCCTTTCCGCAGAAAATA
AACGACAATTATGGATACCCGAAGGATTTGCTCATGGTTTCTTGGTGACCAGTGA
TGAAGCTGAGTTCATTTATAAGACAACTAACTACTATGCTCCTGGTCATCAGCAA
GCAATTATTTACAATGATCCTATTTTAAACATCGATTGGCCTTTCTGCAGTAGTGC
TCTGTCATTATCACAAAAAGATCAAGAAGCAAAATTATTTTCAGAATTATTGGAC
AGTGAACTGTTCTAATAAAGTGTGCCACCTTATCCGTCTGAAGGATAGGTGGTTG
CTTATATTTTTTTGAGTATGTTTGTATAATGACAGAAAATAGTCCGAAATATAAA
CACGATAAAAGCTTAATAAGTTTTATCTACTTATTTTTTATATTTACACTTATTGT
AGGCTTTATTATCGCAAATACCCAGTTTTTGGGGCGAAGTAGAGACTATGATAAT
TATATACAGATCTTTTCTGGTAAAGAAGGGGAGGGGGTTCTTGAATTATTTTATC
GCGGATTGATGTTAATAACGACCAGCTATGAAACTATCATTTTTATAATTTTAAC
ATGTTCTTTTTTTATAAAGGCAAGGTTTCTCGCTAACTATTCGCGTAATTTTTCAG
GCTTGACCTTATTCTTTATTTATTATGCAAGCGTTGCACTTTGGGTTTTAGATTAT
ACTCAATTCAGAAATGGTCTATGTATTTCCATTTTAATGTTTTCCGTATACTATTT
ATTTATAAATAAACCGACTTATTTTTATTTCTCGGTATTATGTGCAATTGCAACTC
ATTGGTCTGCTTTGCCTTTTTTGCTTTTATATCCTTTTGTCTATTCAACAAAAATAA
GACGCCTTGGTTATTTTTGTTTCAGTATTCTTGTTTTGATTGCGATCTCAGGAGAA
GGAAAAGAGATCATATCTTTTATAAGAAATTTTGGAGTGGGACAAAAAATAGGA
AATGAAGCTGGTGTAAATTTAATAAATTCATTATCCCTTACCGCTATTTCCTGGTT
TATTATTAGTTACATATCAAGCATTGGAAATGAAAGGAGAAATTTAAGGCTTTTC
TTTTGTTATGGTGTCATGCAATACGTGACTTTTAGCCTTTTCTCTCTACCTGTTATG
GCTTTCCGTATTTTGGAAATGTATTTTTTCCTTATGCTAACCATTGGGGTGTTTATT
AAGCAAAAAAAGAATTATTATTTTATTTTTTGCAAAGTGTTAATTTTATTGTATCT
AACATACTATTATCATATGGTCTTTGGAGTGATTAATGTGTAAGGCTAAGGTGTT
GGCTATAATTGTTACTTACAACCCGGAAATTATTCGATTGACGGAATGTATTAAC
TCTTTAGCCCCACAAGTTGAGAGAATAATTCTTGTAGATAATGGCTCAAATAATA
GTGATTTGATAAAAAATATCAGTATTAATAACCTTGAAATTATTTTACTTTCGGA
AAACAAAGGCATTGCATTTGCTCAGAACCATGGTGTTAAGAAGGGCCTGGAAGC
AAAAGAGTTTGACTATTTATTTTTCTCAGATCAGGATACTTGCTTTCCTAGCGATG

TTATTGAAAAACTTAAGAGTACATTTACGAAAAATAATAAAAAAGGTAAAAATG
TTGCTTGTGCTTCTCCTTTTTTTAAAGACCATCGTTCAAATTATATGCATCCGTCA
GTCAGCCTAAATATTTTTACGAGTACAAAAGTTATATGTAGTGAAGTAGACGATG
ATCTTTATCCCTCGCATGTTATTGCTTCTGGGATGTTAATGTCTCGTGAAGCATGG
CGCGTCGTCGGACCATTTTGTGAAAAACTCTTTATAGACTGGGTTGATACAGAAT
GGTGTTGGCGTGCATTAGCTAATAATATGATTATTGTTCAGACACCATCAGTCAT
CATTTCTCATGAACTTGGGTATGGGCAGAAAATTTTTGCTGGTCGATCTGTTACA
ATACATAATTCTTTCAGAAATTTTTATAAAATACGCAATGCAATATACTTAATGC
TGCATTCAAATTATAGCTTCAAGTATCGTTATCATGCTTTTTTTCATGCGACAAAG
AATGTTGTATTTGAAATTTTATATTCGAAAGAAAAATTAAATTCACTGAAGGTTT
GTTTTAAAGCTGTACGTGATGGTATGTTCAATAATTTTTAATACGAAAATAGTTA
GGCTCAAGGTGTTTAAATGGAAGAAAATAATATGAAGACGGTCGCTGTAGTTGG
CACAGTGGGTGTTCCTGCTTGTTATGGTGGGTTCGAATCACTTGTTCAGAATCTA
ATTGATTATCAATCTGATGGTATACAATATCAGATATTTTGCTCTTCAAAAAAAT
ATGATAAAAAATTTAAAAATTATAAAAATGCAGAATTAATCTATTTGCCGATAAA
TGCCAATGGCGTCTCTAGCATAATTTATGATATTATGTGTTTAATTATTTGTTTAT
TCAAAAGGCCAGATGTTGTTTTAATATTGGGGGTGTCTGGTTGTTTATTTCTACCA
ATTTATAAACTATTTTCAAAATCAAAGATTATTGTCAATATTGATGGGCTTGAAT
GGCGTAGAAATAAATGGGGAACGTTTGCTAAGAAATTTCTTAAAATATCTGAGG
CGATATCTATTAGAATAGCTGATATTATCATTTCAGATAATCAAGCAATAGCTGA
TTATGTGGAAAATAAGTACAAGAAAAAAAGTGTAGTTATAGCTTATGGCGGAGA
TCATGCCACTAATCTTAGTACACCGATAGACAATGATCAAAAAAAAGAAGGTTA
TTATTTGGGGCTTTGTAGGATAGAGCCTGAGAATAATATAGAAATGATTCTGAAT
GCCTTCATTAATACAGATAAAAAAATTAAATTTATGGGTAATTGGGATAACAGCG
AGTATGGACGCCAGCTAAAAAAATATTATTCAAACTATCCAAATATCACCCTACT
AGAACCTAACTATAATATTGAAGAGCTTTATAAACTAAGAAAAAATTGTCTTGCA
TACATTCATGGACACTCGGCTGGTGGAACAAACCCTTCTTTAGTTGAAGCGATGC
ATTTTAATATTCCTATTTTTGCTTTCGATTGTGACTTTAATCGTTACACAACTAAC
AATTTAGCTCATTACTTTAATGATTCTGAACAACTTAGCTTATTAGCAGAAAGTTT
GTCTTTTGGAAATCTTAAATGTCGAGTATTAGATTTAAAAAATTATGCTGAAGAT
ATGTATAACTGGAGGCATATAGCTGCTATGTATGAATCTATTTATTAAACGCATT
AACAATAATATAATTGACCTTATATAGCAGGGAAAGATCACGTAACGCTGCGGC
GCGCCGATCCCCATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTT
TCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGGATAA

AGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTA
TACTTATTTGCGAACATTCCAGGCCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGA
CAGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGATG
GGACGCAACCTTGCGCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCA
ACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGAAGTGATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAAAC
TGGTTCCTTACTATACGGTGAAAGAGTTTGTCGAATCTCTGGAAACGCCTCGTCG
CATCCTGTTAATGGTGAAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCCTC
AAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATTGATGGTGGTAACACCTTCTTCC
AGGACACTATTCGTCGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTTAACTTCATCGG
TACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCCT
GGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTGGTAGCACCGATCCTGACCAAAATCGCC
GCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGCCGATGGCGCA
GGTCACTATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTG
ATTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCAACGAAGAAC
TGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGAATAACGGTGAACTGAGCAGTTACCTGATCG
ACATCACCAAAGATATCTTCACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTG
ATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACCGGTAAATGGACCAGCCAGA
GCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGCTGTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTTTGCACG
TTATATCTCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTTGCCGCATCTAAAGTTCTCTCTGGTC
CGCAAGCACAGCCAGCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTCGTG
CGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGCT
GCGTCTGAAGAGTACAACTGGGATCTGAACTACGGCGAAATCGCGAAGATTTTC
CGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCTGCAGAAAATCACCGATGCTTATG
CCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAATTGC
CGATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGATGTCGTTGCTTATGCAGTACAGAACGGT
ATTCCGGTTCCGACCTTCTCCGCAGCGGTTGCCTATTACGACAGCTACCGTGCTG
CTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTGACTATTTTGGTGCGCATAC
TTATAAGCGTATCGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

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

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGC
CTGCCACTAAGGCGATACCCAAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGA
TTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAAGAAATCCTCCTGGT
AACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTA

GAATCACTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCC
ATTTGCCCGCCGGGCGTGACAATTATGAACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTT
TGGGCCACTCCATTTTATGTGCACGACCTGCCATTGGTGACAATCCATTTGTCGTG
GTGCTGCCAGACGTTGTGATCGACGACGCCAGCGCCGACCCGCTGCGCTACAAC
CTTGCTGCCATGATTGCGCGCTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCA
AAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCTGTCATCCAGACCAAAGAGCCGC
TGGACCGCGAAGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTCATCGAAAAACCGGATC
AGCCGCAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTTGGTCGCTATGTGCTTTCTGC
CGATATTTGGCCGGAACTTGAACGCACTCAGCCTGGTGCATGGGGGCGTATTCAG
CTGACTGATGCCATTGCCGAACTGGCGAAAAAACAGTCCGTTGATGCCATGCTGA
TGACCGGCGACAGCTACGACTGCGGTAAAAAAATGGGTTATATGCAAGCGTTCG
TGAAGTATGGACTACGCAACCTCAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGGATTG
AGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAATCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAA
AATTATAACGGCAGTGAAGATTAGCGGCGAAAGTAATTTGTTGCGAATTTTCCTG
CCGTTGTTTTATATAAACAATCAGAATAACAACGACTTAGCAATAGGATTTTCGT
CAAAGTTTTCCAGGATTTTCCTTGTTTCCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCA
TTTGAATTTTACGGGTTTAGCGCGAGTGGGTAACGCTCGTCACATCGTAGACATG
CATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCTGAAATTATA
AAGTCATTCTTATAGAACATCGCATTTCAATAATATAATTACACCTAAATGAATA
GGATACAACGTGTGCACAATTATTTAAGGCTTAAAGATAAAATAAAAAACGTAT
TTTTAGGGTTGTATATATTGCAGTTATTTAATTATATCGCGCCATTGGTAATTATC
CCTATCCTGATAAAATATATTGGGTTGGGGGAATATGGGGAATTGGTCTATATTA
CATCTATTTATCAAATAGTGGCTTTGATTATTGATTTTGGCTTTACTTACACAGGA
CCTGTGGTTGCTGCGAGACATAGATGTGAGACCCAAAATTTACAGCGCTATTACT
CAATAGTTGTTCTTTTAAAATCATTGCTTTTTATAATTGCATTAACATGTGTATTTT
TATTGTGCAGATTAAATATAGTCCACTTGTCATTTTTTGGGTTTTTGTCAATTTTTC
TATGCACTATTGGTAATATATTATCGCCCAATTGGTTTTTGCAGGGGATTGGTGAT
TTTAAAAAACTTTCATACTCACAAGTAATAGTGAGAATAACATTGTTTATCATAC
TTCTTGTTTATGTCTGTAGTGGCGGAGATAATGTTTTTATCCTAAGTTTTTTGCAA
AATGCAACATTACTCATATGCTGTATATACTTATGGCCAAATATTCATATTAGCC
ATGTTGTTCATCTTAAACCTAATGAATGCATTGTGGAATTTAAGAAGGCAGGAAA
TGTTTTTATTGGCGTAATAGGTACGATTGGTTACAATGGTCTAATTCCTGTGTTAA
TTGGAAACCTTTGCGGTAATACGAGTCTTGGTGTTTTTTCAATCGTTCAAAAAAT
GACAACAGCATGTCAAAGTCTAATTAATCCAATATCACAGTATATGTTATCTCAA

GTTTCAGAAATTAAACCTCAAGATAAACTGTTTTATTATAGAATTAAAAAAAGTT
TTTTTGTGCATTTAACAATTAGCATAATTGCATGTTTATGTTATATGGGGTTAGGG
CAATATGTGGCGACTTTTATAGGTAAAGTTGACGTTTCATTTGTTATTATTTTATT
TGCGTCAATAATTACCATTTTTTCATCTTTAAATAATGTCCTTGGTATACAGTTTC
TTATACCGACAGATAATGTAAAAATACTACGAAGTATAAATGTTATGGCGGGAA
TTATTGTTGTTAGTTTGTCCTGGCTGTTAATATCACGCTTTGACATTCTGGGGGGG
GTTTTATTAAACCTAATTGGTGAGTTTCTTGTATTCAGTATGCTAGCTTTTATTGC
CCATCGAAAGTGGGGAGCGAGAGTATAATGAAAGTGAAGGCGGTTCCTGCTATT
ACATTCTATTTAAGTTTAATGCTGACAATTTTAGTGTTACTGTTTGGTAATGAACC
AAATAAATCACAATATATCCTTGTTATAGCAACGATAACAGTTTTTTATATCGCA
TATATCACTAATAAAATAACTTCTCCGGCCAGCCTTCTCGTTATATCATCTTTTGT
GTTTTTAGGTTGTCGCCCTTTATTATCTTTGTTTGCAAACTATGATTATAGGATTG
CCGATTGGTTTATTGAAGGATATATGGATGACGATGTGATTTTGGCTAACTATGC
TATAACACTAATGTATTATGGTTATACATTGGGACTAATTCTATGCAAAAATACT
GAAAAATTTTATCCGCATGGTCCTTATCCTGAAAAACAATTGCTAAAAATAAAGT
TTCTTTTGACTTTATTTTTTCTGGGTTCGATAGGTATGGTTGTAAAAGGGATATTC
TTTTTTAACTTTATAGAATCTAATAGTTATGTTGATATTTATCAATCAAATATAAC
AACGCCAATAGGTTATGATTTTCTATCTTATTTATTTTATTGTTCTTTTTTCCTTAT
ATGTGCGTTTCATATACAGTTCAGAACAAATAAAAAATTTCTTTTTATTGCGATAT
GCATTGCTGCATTTAGCACCTTGAAGGGTAGTCGTAGTGAAGCTATAACGTTTCT
TTTAACGGTTACATGTATATATTTTAATGAAGTAAAGACAAGAAACTTACGTCTG
CTGATTACAATGATTTTTGTTTTTAGCGTCATTTTTGTGATTAGTGAATTTATCTCA
ATGTGGCGCACTGGAGGGAGTTTTTTTCAATTAATGCAGGGTAATAATCCTGTTA
TAAACTTTGTATACGGCATGGGAGTATCATATCTTTCCATTTATCAATCAGTAAA
ACTACAACTATTGTCAGGGGGATATAATGTTACCTATCTATTCAGCCAGTTAATA
ATAACTTGCTCGTCAATATTTAATGTCAAATTGAGCTTGCCGGAAATAAGCTATA
GCCATTTGGCCTCATACACAGCAAACCCAGAACTATATAATCTTGGGTTCGGACT
TGGGGGGAGTTATTTAGCAGAATCGTTTTTAGCATTTGGTCTGATTGGATGTTTCA
TTATACCCTTTTTACTTTTACTTAATTTAAATGTATTGGAAAAATATACAAAAAAC
AAACCAATTATATATTTTGTTTATTATAGTGTGTTGCCACCTATATTATTCACACC
AAGAGAGACTTTGTTCTATTTCTTCCCCTATCTTGTCAAAAGTATATTTGTTGCTT
TTTTAGTTACATTATACATCCAGTATAAAAAGGATTGACCAAAATGTCAGAAAAA
AATGTCAGCATAATAATCCCAAGTTATAACAGGGCTCATATTCTTAAGGAGGTCA
TACCAAGTTATTTTCAGGATGAGACTTTAGAGGTTATAGTTATCAATGATGGATC

AACAGATAATACAAATAGTGTATTAGCTGAACTGAAGGAAAAATATTCTCAGTT
AGTTATTTTAGAAAATGAAACGAATAAAAAACAGATGTATTCTAAAAACCGAGG
GATTGAAATAGCCAAAGGGAAATATATTTTTTTGGTGATGATGACTCTTACCTC
TTACCCGGTGTTATATCTCGGTTATTGGCTACAAAATATGAGACAGGCGCTGATG
TAATCGGCGCAAGAATACTTTATATGAATAATAACGAGAAAACAATTGAAGATT
GCATAAATCGACATAAAAAAGAGGGGCGTTTTGTTAGTGATCTAAATAGATTGG
ATTTTAGTTATACATGTGATTTGGACCATCCGATTGAATGTTTTTATGCACAGCCT
TTTGTTCTAGCTGAAAGGGAACTAATATCGAAATATCGATTTGATATATCTTATA
CGGGAAACTGCTATCGTGAGGAAACTGATTTCATGCTATCTCTATTTATTAAAAA
TAAAAAATTTATATATGATTCAAAGGCTTTGTTAATAAATTTACCTCCAAGAAAA
GCGACGGGAGGGGCAAGAACAGCTAATCGATTAAAATATCATTACGAAAGTTGC
ATAAATAATTATAGATTTTTAAAAAAATATAATGATAATTTGAATCTTCTTTCAG
GACAAAAGCATGCTATATTTTACCGACAGTGTCAATTCGTTCTGCTAAAAATGAA
GTCGTTTATCGGGAAGTTTTTAAAATGATTATATATATCGCCGCGTATAATGGTTC
AGGAGGGCAAGGTGGGGTGGAAAGGGTTGTTGCCCAACAATGTAACATTCTTAA
AAATTTGGGGGTTAAAGTCATTATACTTGATAAAACATACTTCAAAATTTCTAAC
AAAATTCGTAACAAAAAAATACAAGTAGCACTTTATCCAATATTAGTTTCTCTTT
ATTTAACCTTACAAAAATTACGTGGCGTGACGTTTAAAGTTATTGCACATGGCTA
TTGTTCTCCTTTTTATAGGAATGACATCTTAATAGCTCATGGCAATATGAAATGTT
ATTTTCAAACAGTCATGAATAAAAAACCTAATCGGTTGTCTGGCAGTGGTCTTTT
ATCTTTCTATGAGCGTTGGGCTGGAGCATTTTCAAAAAATATCTGGGCTGTTTCA
AATAAGGTTAAAAGTGAATGGAATGAGCTTTACAATATTAATTCACATAAAATC
AAAGTTGTTCGAAATTTTATAAATCTTGCACAATTTGATTACACTGATGTTAATG
AAGCAGAATATGTGACATTTGTCGGGCGATTGGAAAAAGGAAAAGGAATAGATG
ATCTGTATTACATATGTAAAAATCTGCCAGATACTTCCTTCCATTTAGTTTCAAGT
ATTCCCGCCCCACAAAATTTTGCTTCGCTAAATAATGTTCTGACCAGCATTGCTGT
CCCCTATGCGAAAATGCCAGAAATATTTAAGAAATCCAGAGTACTTATTTTACCG
TCCTATTATGAAGGATATGAGCTGGTTACTATTGAAGCGCTATGCTGTGGTTGCC
CTGTGATAGGCTATAATGTTGGTGCAATTAGAGAGTTGTATGCAGAAAGTTTTCC
TGGCGTATTTATTGCCAATAATAAAGAAGATTTAGCACAAGTAGCCTACAAATTA
ATTAGTCTTGATAATGAAAAATATTATCATTTGAGACAAACTATTTATAGCAAGC
GTGAGCTTTTTTCTGAAGAGAGATATGCGGAAATTTTAACGGCGGCATTTAATGA
AAAAAAATAAGAAACTCTGTCTCATTTCAATTAACTCATATAATGAACTTACCGG
AGGAGGAGTATATTTACGTACGCTTGTTAGTTTTCTACAAAAACAGAATGTTAAT

TTAACACTTATTGATAAAAAATCCTCAGGTAAACTATTCGAAGACAATACTTTTC
AACATATATCATTTATTAAAGGTAAACGTCAGGATATAATATCCAGGCTTTTTTTT
ATACCATCATTTTATGTCCCTTATATTTTCTCAATAATTAAAATTTTACGGAAGCA
AGATATTCTTGCTTTTCACAACTCTCGGCTTGGATTGTTATGTCTGCTTTTTAGAA
TACTCATGCCCCACAAAAAGATCATATTGTTTACGGATAACTTCGAATATGACTT
AATAAGACAAAAAGATAAAAACATAACTACTTTTATTGAAAAATTAATTGTTTAT
CTCAATGAATTTATCGGGCTTAAGAATTCAGATTTAGTTAGCTATATTACCCGGC
AAGATAAAAATGCAATGGATAAATTTTATGGGATTAAAAAAAGCAGAAATTTAA
TTCTCCCTGTGATATTTAGTAGAGAAAAACCAACTGATGTATTGTCAGCTCACTTT
ATTAATGAGTATAATCGATTGAATAATGATAATAGGAAAAAAGTAGTATTTACTG
CATCTTTTGATTTTTTTCCAAATATAGATGCTGCCAACTATGTTTTAAATGCAGCA
AAGTCTAATAATGATTATTGCTATATTTTGGCAGGTAGGAAAAGTACTACTTTGA
ATCTTCCTGATTTGGATAATTTATTTTTTTTCGATAATCTATCTAATAGTGAAATG
TCATATTTATTATCTGCTTGTGATGTTTTTTATTCTCCTATAGTTTTAGGAAGTGGA
ATGAAAACAAAAATTGCAGAAGCACTATCATATGGATTATATATTTATGCGACA
GAGCATTCCTTAATCGGCTATGATGAAATTATACACAATAAGGAGTGTGTTAAAA
AAATCTCACATTTGGATGAGGAATTTCCTAAAGATTTCAAGATGAAAAGTATCAA
TAAACAGCTAATAATGTCTTATCAGCAAAAATATTATTCACATTATCGGTTTAAT
GGCCATGAACTTGATATAATAAATTTTGACGATTAGTTAGTGGAGATATAATATG
AACATATTAGTAACTGGTGGTGCTGGATATATCGGATCTCATACGGCTATTGAAT
TACTGAATGCAGGTCATGAGATTATCGTTCTGGACAATTTCAGTAATGCTTCATA
CAAGTGTATCGAAAAAATAAAAGAAATTACTCGACGTGATTTTATAACAATTACT
GGAGATGCTGGGTGTAGGAAGACACTCTCCGCTATTTTCGAGAAACACGCCATA
GATATAGTTATTCATTTTGCTGGCTTTAAATCTGTTTCAGAGTCTAAAAGTGAACC
CTTAAAGTATTACCAGAATAATGTTGGAGTGACCATTACTTTATTACAGGTAATG
GAAGAGTACAGAATTAAAAAATTTATCTTTAGTTCATCTGCGACAGTCTATGGTG
AACCAGAGATAATTCCAATTCCAGAAACAGCTAAAATTGGAGGAACTACGAATC
CATATGGCACATCGAAGTATTTTGTTGAAAAAATTCTAGAGGATGTTAGTTCCAC
GGGAAAACTGGATATAATTTGCTTGAGATATTTTAATCCTGTCGGTGCTCATTCT
AGTGGTAAAATAGGTGAGGCTCCATCTGGTATCCCTAATAATCTTGTTCCTTATTT
ATTGGATGTTGCGAGTGGTAAACGTGATAAATTATTTATTTATGGCAATGATTAC
CCTACTAATGATGGAACAGGTGTAAGGGATTTTATTCATGTTGTTGACTTAGCGA
AAGGTCATTTGGCTGCAATGAATTATTTAAGTATCAATTCGGGATATAATATCTT
TAATCTTGGTACAGGAAAAGGTTATTCGGTACTTGAATTAATCACTACATTTGAA

AAATTAACAAACATTAAGGTCAATAAATCTTTTATAGAGAGAAGGGCAGGGGAT
GTTGCGTCTTGTTGGGCTGATGCAGATAAAGCTAATTCTTTATTGGACTGGCAAG
CCGAACAAACTCTAGAACAGATGTTATTGGACTCGTGGCGTTGGAAAAAAAATT
ATCCAGACGGATTCTGAATATAAAAGGTTTCAGTTTTATGAATCAATCAGAGCAG
AGAAAAAAAATACTGGTTCTTACACCTCGCTTTCCCTACCCTGTCATTGGAGGGG
ATAGATTAAGAGTCTATATGTTATGTAAAGAACTTTCCAAAAAATATGATCTTAT
TCTTCTGAGCTTATGTGATCAACCACTAGAACTTGAAATAAATATAAATGACTCG
GTCTTCAAAGAAATTCATCGTGTCTATCTACCAAAATATAAATCATATTATAATG
TATTAAAAGCTTTGGTTACGCAAAAACCGTTGCAAATTGCTTATTATCAATCGGA
CACATTTAAGAATAAATACAATAAATTAATTAAACAATGCGATGCAGTATTTTGT
CATCTGATAAGAGTTGCTGATTATGTTAAGGATACAGACAAGTTCAAAATTCTTG
ATATGACAGATGCAATATCTTTGAATTACAGTCGCGTTAAAAAATTAGCAAGTAA
AAAAAGTTTGCGTGCAATTATTTATTCTCTGGAACAAAAAAGATTAGAATCATAT
GAACGTTCTGTGGCGAATCTTTTTGATTTGACCACTTTTATTTCATCCGTAGACCG
TGACTATCTCTACCCTAATCTGGGCAGTAATATCCATATAGTCAATAATGGGGTT
GATACATCAGCCTTGAGATATATAAAAAGAGAAATAAAAATCGATAAGCCTGTG
GAACTTATATTTATCGGAAATATGTATTCTTTACAAAATATGGATGCTGCAAAAC
ATTTTGCTAAGAATATTTTACCTTGCTTGTATGATGAGTTTAATATTATTTTTAAA
GTGATTGGTAAGATCTCAGAAACTAATAAAAATATATTAAATTCATTTAAAAATA
CAATTGCTTTAGGTACTGTTGATGATATCAATTCTTCCGCTTCTACAGGGCATATA
GGTATATGTCCTGTTCGTCTTGGAGCAGGCGTACAAAATAAAATTCTTGAATACA
TGGCTTTAGGTTTACCATGTATTACATCTAGCATTGGTTATGAAGGTATTAATGCA
AAATCAGGTAGCGAAATTTTTGTTGCAGATACAGTAGAGCAATATAAAAACGTA
CTAAGAGAAATAATTTACGATTATAATCGTTATACTGAAGTGGCTGAAAATGCCC
GTAGTTTTGTAGAAAATAATTTTTCTTGGGAATCAAAAGTTGCCAATTTAATGAA
TACATTAGATGAGAAATTATATGAACAATAATAAAATTATTACACCTATCATTAT
GGCTGGTGGTTCAGGCAGTCGGTTGTGGCCACTATCAAGAATTCTCTATCCGAAA
CAATTTCTTAGCCTAATCGGTAGTCATACCATGCTTCAAACAACGGCTAATCGTC
TGGATGGTTTGGATTGTACCAACCCTTATGTCATTTGTAATGAACAATACCGCTTT
ATAGTTGCTGAACAGCTTAGAAAAATCGATAGATTGACTTCAAAGAATATCATCC
TTGAGCCTGTTGGGCGTAACACTGCCCCTGCAATTGCATTAGCGGCGTTGCTGAT
GTCTAAGTCTGATAAAAGTGCAGATGATCTTATGCTCGTACTGGCTGCAGATCAC
GTTATACACGATGAAGAAAAATTTTGTAACGCTGTTAGATCGGCAATTCCATACG
CTGCTGATGGGAAATTGGTAACATTTGGTATAATTCCAGACAAAGCAGAAACTG

GTTATGGTTATATACATCGAGGACAATATATTAATCAGGAAGATTCGGATGCATT
TATAGTGTCATCATTTGTTGAAAAGCCAAATCATGAGACAGCCACTAAATATCTT
GCTTCCGGTGAGTATTATTGGAATAGCGGTATGTTTTTGTTTAGTGCAAATCGTTA
TATAGAGGAACTTAAACAATTTCGGCCTGATATTTTATCCGCTTGTGAAAAAGCA
ATTGCTTCAGCGAACTTTGACCTTGATTTTGTGCGTTTAGATGAAAGTTCTTTCTC
TAAGTGCCCTGAAGAATCAATTGATTACGCTGTAATGGAAAAAACAAAAGACGC
AATTGTTATTCCAATGGATGCTGGCTGGAGTGATGTCGGTTCATGGTCTTCTCTTT
GGGAAATTAATGATAAAGACTCAGACGGCAACGTAATAGTTGGGGATATTTTCT
CTCATGAAACAAAGAATTCTTTCATATATGCCGAATCGGGAATTGTTGCTACAGT
TGGAGTGGAAAATTTAGTTGTTGTCCAAACAAAGGATGCTGTTCTTGTCTCAGAG
AGAAATAAAGTTCAGGATGTAAAGAAAATAGTAGAACAAATTAAAAATTCAGGT
CGTAGCGAGCATTATGTTCATCGCGAAGTATATCGTCCTTGGGGTAAATATGATT
CCATTGACACAGGGGAGCGTTATCAGGTCAAACGTATAACAGTAAATCCTGGTG
AAGGACTTTCTTTACAAATGCACCATCATAGGGCAGAACATTGGATCATAGTTTC
TGGAACTGCAAGGGTGACTATAGGTTCTGAAACTAAGATTCTTAGCGAAAATGA
ATCTGTTTACATACCTCTTGGTGTAATACACTGCTTGGAAAATCCAGGGAAAATT
CCTCTTGATTTAATTGAAGTTCGTTCTGGATCTTATTTAGAAGAAGACGATGTTAT
CCGTTTTCAGGACCGATATGGTCGTAGCTAAATTTTTGATAATGTAACGTTAGTA
GAAGAGCGCTAATATTTTTAGTTAATCTGTAATAAGTATTATTTGTTTAAGGTATA
TCATGTCGAGTTTACCCTGCTTTAAAGCCTATGATATTCGCGGGAAATTAGGCGA
AGAACTGAATGAAGATATTGCCTGGCGCATTGGTCGCGCTTATGGCGAATTTCTC
AAACCGAAAACCATTGTGTTAGGCGGTGACGTCCGACTCACCAGCGAAACCTTA
AAACTGGCGCTGGCGAAGGGGTTACAGGATGCGGGCGTCGATGTGCTGGATATT
GGCATGTCCGGCACCGAAGAGATCTATTTCGCCACGTTCCATCTCGGCGTGGATG
GCGGCATCGAAGTTACCGCCAGCCATAACCCGATGGATTACAACGGCATGAAAC
TGGTGCGCGAAGGGGCTCGCCCGATCAGCGGTGATACCGGACTGCGCGACATCC
AGCGTCTGGCAGAAGCCAACGACTTTCCTCCCGTTGATGAAACCAAACGCGGTC
GCTATCAGCAAATCAATCTGCGTGACGCTTACGTTGATCACCTGTTCGGTTATAT
CAACGTCAAAAACCTCACGCCGCTCAAGCTGGTGATTAACTCCGGGAACGGCGC
GGCGGGTCCGGTGGTGGACGCCATTGAAGCCCGCTTTAAAGCCCTCGGCGCACC
CGTGGAATTAATCAAAGTGCACAACACGCCGGACGGCAATTTCCCCAACGGTAT
TCCTAACCCGCTACTGCCGGAATGTCGCGACGACACCCGCAATGCGGTCATCAA
ACACGGCGCGGATATGGGCATTGCCTTTGATGGCGATTTTGACCGCTGTTTCCTG
TTTGACGAAAAAGGGCAGTTTATTGAGGGCTACTACATTGTCGGCCTGCTGGCAG

AAGCGTTCCTCGAAAAAAATCCCGGCGCGAAGATCATCCACGATCCACGTCTCTC
CTGGAACACCGTTGATGTGGTGACTGCCGCAGGCGGCACCCCGGTAATGTCGAA
AACCGGACACGCCTTTATTAAAGAACGTATGCGCAAGGAAGACGCTATCTACGG
TGGCGAAATGAGCGCCCACCATTACTTCCGTGATTTCGCTTACTGCGACAGCGGC
ATGATCCCGTGGCTGCTGGTCGCCGAACTGGTGTGCCTGAAAGGAAAAACGCTG
GGCGAACTGGTGCGCGACCGGATGGCAGCGTTTCCGGCAAGCGGTGAGATCAAC
AGCAAACTGGCACACCCCGTTGAGGCGATTAACCGCGTGGAACAGCACTTTAGC
CGCGAGGCGCTGGCGGTGGATCGCACCGATGGCATCAGCATGACCTTTGCCGAC
TGGCGCTTTAACCTGCGCTCCTCTAACACCGAACCGGTGGTGCGGTTGAATGTGG
AATCGCGCGGCGATGTACCGCTGATGGAAGAAAAGACAAAACTTATCCTTGAGT
TACTGAACAAGTAATTCAGTAATTTCATATAAATGGGTTTTAAAAAACGGAAAA
GATGAGATATCCGGTGTGGTATATCCAAGGTAATGCTATTCAGTATCTCTATGAG
TGAGTTAACATCTATACCACATTTAAGCCGCACACTTCGGGATCCCCATATGAAT
ATCCTCCTTAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTTTCTAGAGAATAGGAACTTCG
GAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCAT
GGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTCCA
GGCCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAA
GCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCGCTCAA
CATCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACG
GAAGAAGTGATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAAACTGGTTCCTTACTATACGGTG
AAAGAGTTTGTCGAATCTCTGGAAACGCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAG
CAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGG
AGACATCATCATTGATGGTGGTAACACCTTCTTCCAGGACACTATTCGTCGTAAT
CGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTTAACTTCATCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTG
AAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCT
ATGAATTGGTAGCACCGATCCTGACCAAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGGTG
AACCATGCGTTACCTATATTGGTGCCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGT
TCACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTCTCTG
CTTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAG
TGGAATAACGGTGAACTGAGCAGTTACCTGATCGACATCACCAAAGATATCTTCA
CCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGG
CTAACAAAGGTACCGGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAAC
CGCTGTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTTTGCACGTTATATCTCTTCTCTGAAAGAT
CAGCGTGTTGCCGCATCTAAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCG

ACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTCGTGCGCTGTATCTGGGCAAAATCGT
TTCTTACGCCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGCTGCGTCTGAAGAGTACAACTGG
GATCTGAACTACGGCGAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTG
CGCAGTTCCTGCAGAAAATCACCGATGCTTATGCCGAAAATCCACAGATCGCTAA
CCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAATTGCCGATGACTACCAGCAGGCGCTG
CGTGATGTCGTTGCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCCGGTTCCGACCTTCTCCG
CAGCGGTTGCCTATTACGACAGCTACCGTGCTGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGAT
CCAGGCACAGCGTGACTATTTTGGTGCGCATACTTATAAGCGTATCGATAAAGAA
GGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

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

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGC
CTGCCACTAAGGCGATACCCAAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGA
TTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAAGAAATCCTCCTGGT
AACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTA
GAATCACTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCC
ATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATGAACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTT
TAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCATTTGTCGT
GGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAA
CCTTGCTGCCATGATTGCACGTTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCA
AAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCCGTCATCCAGACTAAAGAGCCGC
TGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGATC
AGCCGCAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTCGCTATGTGCTTTCTGC
CGATATTTGGCCGGAACTGGAACGTACTCAGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAG
CTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCCGTTGATGCAATGCTGA
TGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTG
TGAAGTATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTG
AGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAATCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAA
AATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAATCTTCCTG
CCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATT
CAAAGTTTTCCAGGATTTTCCTTGTTTCCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCG
TTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTAACGCTCGTCACATCATAGGCATG
CATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATACCTC
TATTAATCAAACTGAGAGCCGCTTATTTCACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAA

TAAATTAAGCTAGCGATCGCTTAAGATCTAGGATTTCATTATGTTACTTCCTGTAA
TTATGGCTGGTGGTACCGGCAGTCGTCTCTGGCCGATGTCACGCGAGCTTTATCC
GAAACAGTTCCTCCGCCTGTTCGGGCAGAACTCCATGCTGCAGGAAACCATCACC
CGACTCTCGGGCCTTGAAATCCATGAACCGATGGTCATCTGTAACGAAGAGCACC
GCTTCCTGGTGGCTGAACAGCTACGCCAGCTCAATAAGCTGTCGAATAATATTAT
TCTTGAGCCGGTCGGGCGCAACACCGCCCCGGCCATCGCCCTGGCAGCCCTTCAG
GCCACCCGCGACGGCGACGACCCGCTGATGCTGGTTCTCGCCGCTGACCATATCA
TCAATAACCAGTCGGCCTTCCACGACGCCATCCGGGTCGCCGAGCAGTATGCTGA
TGAAGGTCATCTGGTCACCTTCGGTATCGTGCCGAATGCCCCGGAAACTGGCTAC
GGTTACATTCAGCGCGGCGTGGCGCTCACCGATAGTGCCCATTCCGCGTACCAGG
TGGCCCGCTTTGTGGAGAAGCCGGATCGCGAGCGCGCCGAGGCTTACCTCGCCTC
CGGGGAGTACTACTGGAACAGCGGCATGTTTATGTTCCGCGCCAAGAAATACCTC
ATCGAGCTGGCCAAATACCGTCCGGATATCCTGGAAGCCTGCCAGGCTGCGGTG
AATGCCGCCGATAATGGCAGCGATTTCATCAATATCCCGCATGATATTTTCTGCG
AGTGCCCGGATGAGTCCGTGGACTATGCCGTTATGGAGAAAACCGCCGATGCGG
TGGTGGTCGGTCTCGATGCTGACTGGAGCGACGTCGGCTCCTGGTCCGCACTATG
GGAGGTCAGCCCGAAAGACGAGCAGGGCAATGTCCTCAGCGGTGACGCGTGGGT
ACACAACAGCGAAAACTGCTACATCAACAGCGACGAGAAGCTAGTGGCGGCCAT
TGGCGTAGAGAATCTGGTGATTGTCAGCACTAAGGACGCCGTGCTGGTGATGAA
TCGCGAGCGTTCCCAGGACGTGAAGAAGGCGGTCGAGTTCCTCAAGCAGAACCA
GCGCAGCGAGTACAAGCGCCACCGTGAGATTTACCGCCCCTGGGGCCGTTGCGA
CGTAGTGGTCCAGACCCCGCGCTTCAACGTCAACCGCATCACGGTGAAACCAGG
CGGTGCCTTCTCGATGCAGATGCACCACCATCGCGCCGAGCATTGGGTTATTCTC
GCCGGCACCGGTCAGGTGACTGTCAACGGTAAGCAGTTCCTGTTGTCCGAGAACC
AGTCCACCTTTATTCCGATTGGCGCCGAGCACTGCCTGGAAAACCCTGGCTGTAT
TCCGCTGGAAGTGCTGGAGATCCAGTCGGGGGCGTACCTTGGCGAGGACGACAT
TATTCGTATTAAAGACCAGTATGGTCGTTGCTAATTATTTTCGGGACAAGACGCA
GAATGACACAGTTAACTTGTTTTAAAGCTTATGACATCCGTGGTGAACTGGGTGA
GGAACTGAACGAGGACATCGCCTACCGTATCGGTCGCGCCTACGGCGAATTTCTG
AAACCCGGGAAGATAGTGGTGGGGGGCGATGTGCGCCTCACAAGCGAGTCGCTG
AAGCTGGCGCTGGCCCGCGGGTTAATGGACGCCGGTACCGACGTGCTGGACATC
GGCCTGAGCGGTACCGAAGAGATTTACTTTGCCACCTTCCACCTTGGGGTAGATG
GTGGCATCGAGGTGACCGCGAGCCACAATCCTATGAACTACAACGGCATGAAGC
TGGTGCGCGAGAATGCGAAGCCCATCAGCGGCGACACCGGCCTGCGGGATATCC

AGCGCCTGGCGGAGGAAAACCAGTTCCCGCCAGTGGACCCGGCGCGTCGCGGGA
CCCTGAGCAAGATATCGGTACTGAAGGAGTATGTTGACCATCTGATGAGCTACGT
GGACTTCTCGAACTTCACCCGTCCACTGAAGTTGGTGGTGAACTCCGGAAACGGG
GCTGCGGGGCACGTGATTGATGAGGTGGAGAAACGCTTCGCGGCGGCTGGGGTG
CCGGTAACCTTTATCAAGGTGCATCACCAGCCGGATGGCCATTTCCCTAACGGTA
TCCCGAATCCGCTGCTGCCGGAGTGCCGCCAGGATACCGCCGACGCGGTGCGCG
AGCATCAGGCCGACATGGGGATTGCCTTTGACGGCGACTTCGATCGCTGCTTCCT
GTTCGATGACGAAGCTTCGTTTATCGAGGGGTATTACATTGTCGGCCTGCTGGCT
GAGGCGTTCCTGCAGAAGCAGCCGGGAGCGAAAATCATTCACGACCCGCGCTTG
ACGTGGAACACGGTAGACATCGTGACCCGCAACGGCGGCCAGCCGGTGATGTCG
AAGACGGGGCATGCGTTCATCAAGGAGCGGATGCGTCAGGAAGACGCTATCTAC
GGCGGGGAGATGAGTGCGCACCATTACTTCCGCGATTTCGCCTACTGCGATAGCG
GGATGATCCCGTGGCTGCTGGTGGCGGAGCTGCTGTGTCTGAAGAACAGCTCGCT
GAAATCGCTGGTGGCGGACCGCCAGAAGGCGTTCCCTGCGTCGGGAGAGATCAA
CCGCAAGCTAAGTAATGCTGCTGAGGCGATCGCCCGCATCCGGGCGCAGTATGA
GCCGGCGGCTGCACACATCGACACAACGGACGGGATCAGTATTGAATACCCTGA
ATGGCGCTTTAACCTGCGCACGTCTAACACCGAGCCGGTGGTGCGTCTGAACGTT
GAGTCCAGAGCTGATGTGGCGCTTATGAATGAAAAAACGACCGAGCTGTTACAC
CTGTTAAGCGGGGAATAAGGTGAGAGATTTACTAACGACGATTTATCGTTATCGG
GGATTTATCTGGAGCAGTGTTAAACGTGATTTTCAGGCACGCTATCAAACTAGTA
TGCTGGGCGCACTATGGCTCGTTTTACAACCGCTCTCTATGATTCTGGTCTATACC
CTGGTTTTTTCCGAGGTGATGAAGGCAAGAATGCCCGATAATACCGGGTCGTTTG
CCTATAGTATTTATCTCTGTTCCGGGGTACTGACCTGGGGATTATTTACTGAGATG
CTGGATAAAGGTCAGAGCGTATTTATTAACAATGCTAATCTGATCAAGAAACTCA
GTTTTCCGAAAATCTGTCTGCCGATCATCGTGACGTTATCGGCGGTGCTAAATTTC
GCGATTATTTTCAGTCTGTTTCTAATTTTTATCATTGTCACCGGTAACTTCCCCGG
CTGGCTCTTTCTCTCGGTGATACCGGTCCTGCTTTTGCAGATCCTGTTTGCCGGTG
GGCTGGGGATGATCCTTGGTGTCATGAACGTCTTTTTCAGGGATGTGGGGCAACT
GGTTGGCGTTGCGCTGCAATTCTGGTTTTGGTTCACACCCATTGTTTATGTACTGA
ATTCATTACCTGCATGGGCAAAAAATCTGATGATGTATAACCCGATGACTCGGAT
CATGCAATCTTATCAGTCCATCTTCGCCTATCATCTGGCCCCCAACTGGTATTCGC
TATGGCCAGTATTGGCTCTCGCCATTATTTTCTGCGTCATCGGTTTCAGGATGTTC
CGCAAGCATGCGGCGGATATGGTGGATGAATTATAATGAGTTATATCAGAGTAA
ATAATGTCGGTAAGGCGTATCGCCAGTATCACTCAAAGACCGGGAGACTGATCG

AATGGTTATCCCCTCTGAATACCAAACGCCATAATTTGAAATGGATCCTCCGCGA
TATTAATTTCGAAGTCGCTCCGGGCGAGGCTGTCGGTATTATCGGTATCAACGGT
GCAGGCAAGAGTACCCTGCTTAAACTCATAACCGGGACGTCCAGGCCGACGACT
GGAGAAATTGAAATCTCCGGACGTGTCGCTGCATTACTCGAATTGGGGATGGGG
TTTCATTCTGATTTCACTGGTCGGCAGAATGTTTATATGTCTGGGCAACTGTTGGG
GTTATCGTCAGAGAAAATAACTGAACTGATGCCGCAAATTGAAGAGTTTGCTGA
GATTGGGGACTATATCGATCAACCTGTGCGCGTCTACTCCAGTGGGATGCAAGTT
CGATTAGCTTTTAGTGTAGCGACGGCTATCCGTCCTGATGTGCTAATTATCGATG
AGGCATTATCTGTTGGGGATGCATATTTCCAGCATAAAAGCTTTGAGCGTATTCG
AAAATTTCGTCAGGAAGGGACCACGCTGTTGCTGGTATCCCATGATAAACAAGC
GATCCAAAGCATTTGCGACCGGGCCATTTTATTGAATAAAGGCCAAATTGAAATG
GAAGGTGAACCTGAAGCAGTGATGGATTATTACAATGCTCTTCTGGCCGATAAAC
AAAATCAGTCCATTAAACAAGTTGAGCATAATGGTAAAACGCAAACTGTTTCAG
GCACTGGTGAGGTGACTATCTCTGAGGTTCATCTTCTCGATGAACAGGGCAATGT
GACTGAATTTGTTTCGGTAGGGCATCGTGTCAGCTTGCAGGTCAACGTTGAGGTC
AAGGACGATATTCCTGAGCTTGTTGTCGGATATATGATTAAGGATCGACTTGGGC
AGCCGATTTTCGGGACCAATACGTACCATCTCAATCAGACACTCACCTCCCTGAA
AAAAGGAGAAAAGCGTTCGTTCTTATTTTCTTTCGATGCGAGATTGGGGGTTGGC
TCCTATTCTGTCGCTGTCGCGTTGCATACTTCCAGTACGCACCTCGGCAAAAACT
ATGAATGGCGCGATCTGGCCGTGGTATTCAACGTCGTTAACACGGAACAACAAG
AGTTTGTCGGCGTGTCCTGGTTGCCGCCTGAACTGGAGATTTCTTAATGGGTTCGT
CGTTTTATCGTTCATTTGAAGAACGACACAGAGGTTCGGTTGAAGAAATCAAGCG
CCGCTTGAGTTTTTATTTACCTTTTCTTGCAGGTCTGAAGGACATTTATCCTGATG
GCGTGATTGCGGATATTGGTTGCGGACGTGGCGAATGGTTGGAGATCCTGACTGA
AAATGGCATTGCGAACATCGGCGTCGATCTCGATGATGGCATGCTGGCGCGCGC
CAGGGAGGCCGGACTGAATGTGCAGAAAATGGATTGTCTGCAGTTTTTGCAAAG
TCAGGCGGATCAGAGCCTGATAGCGTTGACCGGTTTTCATATTGCTGAGCATTTG
CCGTTTGAGGTCCTGCAGCAACTCGCCATGCATACCCTACGGGTGCTGAAACCAG
GTGGTTTGCTGATCCTCGAAACGCCGAACCCGGAGAATGTAAGCGTCGGCACCT
GTTCATTTTATATGGATCCAACGCATAATCATCCTCTGCCACCGCCACTGCTTGAG
TTTTTACCTATTCATTATGGTTTTACCCGAGCAATTACCGTTCGTCTGCAGGAAAA
AGAGGTTCTTCAATCTCCGGATGCAGCCGTTAATTTGGTCGATGTACTCAAAGGG
GTGAGCCCCGACTACAGCATCATTGCTCAGAAAGCAGCGCCAACAGATATTCTTG
AACGCTTTGACACCCTGTTTACCCAGCAGTACGGTCTGACGCTGGATGCTCTGAG

CAACCGTTACGATGCGATTTTGCGCCAACAGTTTTCGTCCGTTGTCTCACGGCTG
GAGACGTTGAACCAAACCTATATGCAACAGATAAGCCAAATGTCAGAGACTATT
CAGACGTTGCAAGGTGAGGTTGACGATCTGAGTCATGTCATCGATCAGAACCATC
AGCTTCATCAGCAAATGGCGGATTTACATAACAGTCGTTCATGGCGTATTACTCA
ACCACTACGCTGGTTGTCTTTGCAACGTCAATTATTACGTCAGGAAGGGGCTAAA
GTGCGAGCCCGTAGGGCTGGGAAAAAAATATTGCGCAAAGGGATGGCGCTCTCG
CTGGTCTTTTTCCATCGTTACCCTAAGTCTAAGGTTTATCTGTTTAAGGTTCTGAG
AAAAACTGGCTGCTATACATTGCTACAACGTTTGTTCCAACGCGTAATGCTGGTG
CAATCTGACACGATGATGATGCAGTCCAGAAGATATGATGTGGGTACTGAAGAA
ATGACAAGTCGCGCGATGAGTATTTATAACGAATTAAAAAATAAAAATACGGAG
AAATAACGATGCGTATTGTCATAGATTTACAAGGCGCACAGACGGAAAGCCGCT
TTCGTGGCATCGGTCGTTATAGTATCGCAATCGCCAGAGGCATAATCAGAAATAA
CAGCCGGCATGAGATTTTCATCGCGCTATCCGCCATGCTGGATGAGTCGATTGCA
AATATTAAGGCGCAATTTGCCGATCTCCTGCCGGCAGAAAATATAGTCGTATGGC
ATGCCGTAGGCCCTGTTCGTGCGATGGACCAAGGTAATGAATGGCGTCGGGAGA
GCGCAGAACTGATTCGGGAAGCGTTTCTTGAATCATTGTGTCCAGATGTCGTTTT
CATTACGAGTTTGTTTGAAGGTCATGTCGACGATGCGGCTACATCGGTACACAAA
TTTAGTCGTCAGTATAAAGTAGCCGTACTGCACCACGATCTTATCCCCCTCGTGC
AGGCGGAAACCTATCTGCAGGACGATGTATACAAACCCTACTATTTACAGAAAG
TTGAGTGGTTAAAAAACGCTGACCTTTTGTTGACTAACTCTGCTTATACCGCACA
GGAAGCGATCGAGCATCTGCATTTACAGGGCGATCATGTGCAGAATATTGCAGC
CGCAGTCGATTCTCAGTTTTGTATGGCGGAGGTGGCAGCGAGCGAAAAAGAGAC
CGTCCTTGGCCATTACGGTATTCAGCGCGAGTTCATGTTGTATGCGCCCGGAGGA
TTTGACTCAAGGAAAAACTTTAAACGGTTGATTGAGGCCTATGCCGGGCTCAGTG
ATGCCTTACGTCGCAGTCATCAACTGGTCATCGTCAGTAAGCTTTCCATCGGTGA
TCGTCAGTATCTGGAATCCCTTGCGTCAGGTAATGGTTTACAGCAGGGCGAACTG
GTACTCACTGGTTATGTGCCGGAAGATGAGCTGATCCAGCTCTATCGCCTATGTA
AGCTGTTCATCTTTGCTTCACTACATGAAGGTTTTGGGTTGCCGGTTCTGGAAGCA
ATGTCGTGCGGTGCGCCGGTGATTGGCTCAAATGTCACCAGTATTCCTGAAGTCA
TCGGTAATCCTGAGGCATTATTCGACCCGTATTCTGTCTCTTCCATGAGGGATAA
GATCGCGCAATGTTTGACTGATGATACCTTCCTCGCGCGTCTGAAAGAAATGGCG
CAGCAGCAAGCGCGTAATTTCTCTTGGGATAAAGCTGCGGTGACTGCTCTGGAAG
CTTTCGAAAAGATCGCGGTAGAAGACACCGGTACTGCGCAGGTTTTGCCTGAAG
CTTTGATTCAGAAGATCCTTGCTATCTCACAAGGGCAGCCAGATGACCGCGATCT

GCGCTTGTGCGCAACGGCCATTGATTACAATCTGAAAACGGCAGAACTTTATCAA
ATCGACGATAAATCGCTGAACTGGCGTGTGGAAGGCCCATTCGATAGCTCATATA
GTCTGGCGTTGGTCAACCGCGAATTTGCCCGGGCACTCTCAGCCGATGGTGTAGA
GGTTTTATTGCATTCCACTGAAGGACCAGGTGATTTTGCCCCAGATGCCTCGTTTA
TGGCACAGTCGGAAAATAGTGATCTTCTGGCATTTTATAATCAATGTCAGACCCG
CAAGAGTAACGAAAAGATAGATATTATTAGCAGAAATATCTATCCACCGCGGGT
TACCAAAATGGATGCCAAAGTAAAATTCCTTCATTGTTATGCTTGGGAAGAAACG
GGCTTTCCGCAACCGTGGATCAATGAATTTAATCGGGAACTTGACGGAGTGCTGT
GTACTTCGGAACATGTTCGTAAAATACTGATTGATAACGGACTGAATGTGCCCGC
ATTTGTTGTTGGCAATGGCTGTGACCATTGGCTCAATATCCCAGCCGAGACGACA
AAAGATGTGGATCACGGAACATTCCGTTTCCTGCACGTCTCTTCTTGTTTCCCACG
CAAAGGGATACAGGCAATGCTTCAGGCTTGGGGGAAGGCGTTCACTCGTCGTGA
CAATGTTATCTTAATCATTAAGACTTTTAACAATCCGCACAATGAAATTGACGCA
TGGCTGGCTCAGGCCCAGGCTCAATTCATAGACTATCCCAAAGTTGAAGTGATCA
AAGAGGATATGTCAGCCACCGAGCTTAAAGGGCTTTATGAAAGCTGTGATGTTTT
GGTTGCTCCAGGTTGCGCTGAAGGCTTTGGTTTACCTATTGCTGAAGCAATGCTG
AGTGGGCTACCGGCTATCGTCACCAATTGGAGCGGGCAACTTGATTTTGTTAATT
CACAAAATTCATGGCTGGTTGACTATCAGTTCACTCGGGTAAAAACGCACTTTGG
TCTGTTTTCCTCAGCCTGGGCCAGTGTGGATATTGACAACTTAACAGATGCATTA
AAAGCGGCAGCCTCAACCGATAAATCAGTGCTGCGTGACATGGCCAATGCTGGT
CGCGAGCTTCTTCTGCAGCAGTTTACCTGGAAAGCGGTGGCTGATCGTTCTTGCC
AGGCGGTCAAGACTCTGCGTGCGCATATTGATATTGCACAGCATCGGGCGCGCAT
TGGCTGGGTGACGACCTGGAACACGAAATGTGGGATCGCAACCTATTCCCAGCA
TCTGGTGGAAAGCGCACCTCATGGCGCGGATGTTGTTTTTGCTCCCCAGGTCAGC
GCTGGCGATCTTGTGTGTGCAGACGAAGAGTTTGTACTTCGCAACTGGATTGTAG
GTAAAGAGAGCAACTATCTGGAAAACCTCCAGCCACACATTGATGCTCTGAGAC
TCGATGTCATTGTGATCCAATTCAACTATGGATTCTTTAATCATCGAGAACTGTCG
GCGTTTATTCGTCGCCAGCATGACGCCGGTCGTTCAGTTGTTATGACGATGCACT
CAACTGTGGATCCGCTGGAAAAAGAGCCGAGCTGGAATTTCCGTCTTGCTGAAAT
GAAAGAGGCGCTGGCACTTTGCGACCGGTTGTTGGTGCATTCGATTGCCGATATG
AACCGCCTTAAAGATTTAGGCTTAACTGCGAATGTTGCTTTATTCCCGCACGGTG
TTATCAACTACTCCGCAGCGAGCGTCACACGTCAACAGCAGTCTTTACCGCTAAT
TGCGAGCTATGGCTTCTGCTTACCGCATAAGGGCCTGATGGAACTAGTAGAATCC
GTCCATAGACTCAAGCAAGCCGGTAAACCGGTTCGTTTACGACTGGTGAACGCA

GAGTATCCTGTTGGGGAGTCACGCGATCTGGTGGCAGAGCTTAAAGCTGCTGCTC
AGCGGTTAGGTGTTACCGATCTGATTGAGATGCATAATGATTTCCTACCTGATGC
GGAGAGTCTGCGGTTGCTTTCAGAAGCCGATCTTCTGATTTTTGCTTATCAGAAT
ACTGGGGAGTCTGCTAGCGGGGCGGTACGTTATGGTATGGCGACTCAAAAACCT
GTTGCGGTAACGCCCCTGGCGATATTTGATGATTTGGACGATGCCGTCTTTAAAT
TTGATGGATGCAGCGTCGATGATATCAGTCAGGGGATTGACCGGATCCTGAATTC
CATCCGTGAACAGAACTCTTGGGCAACCAGGACTCAACAACGTGCCGATGCATG
GCGGGAACAACATGATTATCAAGCTGTTTCACGCCGTCTGGTTAATATGTGTCAA
GGCTTAGCTAAAGCTAAATATTTTAAATAAAAATATCTCTCTTGTATTTTTTGCCT
TTGAATACAAGAGGGGTTAGATAATGTGTCATTTATTATGAAAATTATTTTTGCT
ACTGAGCCAATTAAATACCCATTAACGGGCATCGGTCGGTATTCCCTGGAGCTGG
TTAAGCGGCTGGCGGTCGCCCGCGAAATTGAAGAATTAAAGCTATTTCACGGTGC
GTCGTTTATAGAACAGATCCCTTTGGTGGAGAATAAAAGCGATACCAAAGCCAG
CAATCATGGTCGTCTGTCGGCGTTTCTACGCCGACAGACGCTGTTGATTGAGGCT
TATCGCTTGCTGCATCCGCGGCGCCAGGCGTGGGCATTGCGCGACTATAAGGATT
ATATCTACCATGGCCCCAATTTTTATCTGCCGCATAAACTGGAACGCGCCGTGAC
CACGTTTCATGACATATCCATTTTTACCTGCCCGGAATATCATCCAAAAGATCGG
GTTCGCTATATGGAGAAGTCCCTGCATGAGAGTCTGGATTCGGCAAAGCTGATCC
TGACCGTTTCTGATTTCTCGCGCAGTGAAATTATCCGCTTGTTCAACTATCCGGCG
GAGCGGATCGTAACCACCAAGCTAGCCTGCAGCAGTGACTATATCCCACGCAGC
CCGGCAGAGTGTCTGCCGGTACTGCAGAAATATCAGCTGGCGTGGCAGGCCTAC
GCGCTATATATCGGCACTATGGAGCCACGTAAAAATATCCGAGGCCTGCTGCATG
CCTATCAGCTGCTACCGATGGAGATCCGCATGCGCTATCCGCTAATCCTTAGCGG
CTATCGCGGCTGGGAAGACGATGTGCTGTGGCAGTTAGTCGAGCGCGGTACTCG
GGAAGGCTGGATCCGTTACCTCGGATATGTTCCGGATGAAGACCTGCCGTATCTG
TACGCAGCGGCCAGAGTCTTTGTTTATCCCTCCTTCTACGAGGGATTCGGTTTACC
TATTCTTGAAGCGATGTCTTGCGGTGTGCCGGTAGTATGCTCCAATGTCACCTCTT
TGCCTGAGGTTGTTGGCGATGCCGGCCTCGTTGCCGATCCTAATGATATAGACGC
GATTAGCGCGCAAATTTTGCAGAGCCTGCAAGATGATAGCTGGCGGGAAATCGC
CACCGCGCGCGGTCTTGCTCAGGCGAAACAGTTTTCGTGGGAGAACTGTGCGAC
ACAGACCATTAACGCCTATAAATTACTCTAAGGGTGTCAGTTGAGAGTTCTACAC
GTCTATAAGACTTACTATCCCGATACCTACGGCGGTATTGAGCAGGTCATTTATC
AGCTAAGTCAGGGCTGCGCCCGCCGGGGAATCGCAGCCGATGTTTTCACTTTTAG
CCCGGACAAAGATACAGGTCCTGTCGCTTACGAAGATCATCGGGTCATTTATAAT

AAACAGCTTTTTGAAATTGCCTCCACGCCGTTTTCGCTGAAAGCGTTAAAGCGTT
TTAAGCTGATTAAAGATGACTACGATATCATCAACTACCATTTTCCGTTTCCCTTT
ATGGATATGCTGCATCTTTCGGCGCGGCCTGACGCCAGGACTGTGGTGACCTATC
ACTCTGATATAGTGAAACAAAAACGGTTAATGAAGCTGTACCAGCCGCTGCAGG
AGCGATTTCTCAGCGGCGTAGATTGCATCGTTGCCTCGTCGCCCAATTACGTGGC
TTCCAGCCAGACCCTGAAAAAATATCTGGATAAAACGGTGGTGATCCCGTTTGGT
CTGGAGCAGCAGGACGTGCAGCACGATCCGCAGAGGGTCGCGCACTGGCGGGA
AACTGTCGGCGATAAGTTCTTTCTCTTCGTCGGCACTTTCCGCTACTACAAAGGG
CTGCATATTCTGATGGATGCCGCTGAGCGTAGCCGACTGCCAGTGGTGGTTGTAG
GGGGCGGGCCGCTGGAATCGGAAGTGCGGCGTGAAGCGCAGCAGCGCGGGCTG
AGCAATGTGATGTTTACCGGCATGCTCAACGACGAAGATAAGTACATTCTCTTCC
AGCTCTGCCGGGGCGTGGTATTCCCCTCGCATCTGCGCTCTGAGGCGTTTGGCAT
TACGTTATTGGAAGGCGCACGCTTTGCAAGGCCGCTGATCTCTTGCGAGATCGGT
ACAGGTACCTCTTTCATTAACCAGGACAAAGTGAGTGGTTGCGTGATTCCGCCGA
ATGATAGCCAGGCGCTGGTGGAGGCGATGAATGAGCTCTGGAATAACGAGGAAA
CCTCCAACCGCTATGGCGAAAACTCGCGTCGTCGTTTTGAAGAGATGTTTACTGC
CGACCATATGATTGACGCCTATGTCAATCTCTACACTACATTGCTGGAAAGCAAA
TCCTGAGCGGCCGCGAGCTCGTCGACTCGAGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTT
CGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGG
ATATTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTT
TAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTCCAGGCCGCGAGCATTCAGCG
CGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGT
CGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCGCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTA
TACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGAAGTGATTGCCGAA
AATCCAGGCAAGAAACTGGTTCCTTACTATACGGTGAAAGAGTTTGTCGAATCTC
TGGAAACGCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCAGGTGCAGGCACGGATG
CTGCTATTGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATTGATGG
TGGTAACACCTTCTTCCAGGACACTATTCGTCGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAG
GGCTTTAACTTCATCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAG
GTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTGGTAGCACCGAT
CCTGACCAAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATT
GGTGCCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTGAATAC
GGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACC
TCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGAATAACGGTGAACTGA

GCAGTTACCTGATCGACATCACCAAAGATATCTTCACCAAAAAAGATGAAGACG
GTAACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACCGGTA
AATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGCTGTCGCTGATTACCG
AGTCTGTGTTTGCACGTTATATCTCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTTGCCGCATCT
AAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATC
GAAAAAGTTCGTCGTGCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCCAGGGCT
TCTCTCAGCTGCGTGCTGCGTCTGAAGAGTACAACTGGGATCTGAACTACGGCGA
AATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCTGCAGAAA
ATCACCGATGCTTATGCCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGT
ACTTCAAGCAAATTGCCGATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGATGTCGTTGCTTA
TGCAGTACAGAACGGTATTCCGGTTCCGACCTTCTCCGCAGCGGTTGCCTATTAC
GACAGCTACCGTGCTGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTGACT
ATTTTGGTGCGCATACTTATAAGCGTATTGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGA
ATGGCTGGATTAA

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

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGC
CTGCCACTAAGGCGATACCCAAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGA
TTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAAGAAATCCTCCTGGT
AACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTA
GAATCACTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCC
ATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATGAACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTT
TAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCATTTGTCGT
GGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAA
CCTTGCTGCCATGATTGCACGTTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCA
AAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCCGTCATCCAGACTAAAGAGCCGC
TGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGATC
AGCCGCAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTCGCTATGTGCTTTCTGC
CGATATTTGGCCGGAACTGGAACGTACTCAGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAG
CTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCCGTTGATGCAATGCTGA
TGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTG
TGAAGTATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTG
AGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAATCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAA
AATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAATCTTCCTG

CCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATT
CAAAGTTTTCCAGGATTTTCCTTGTTTCCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCG
TTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTAACGCTCGTCACATCATAGGCATG
CATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATACCTC
TATTAATCAAACTGAGAGCCGCTTATTTCACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAA
TAAATTAAGCTAGCATGAGCAAAACTAAACTAAATGTTCTTTACCTTGCAATAAG
TCAGGGTGCCAATTACCTACTGCCATTATTAATTTTTCCTTATCTTGTTAGAGTCA
TTGGTGTATCGAATTTTGGTGATCTGAGTTTTTCATTGATAACTATACAAGTGTTG
TTAATGGTTGTTGAATATGGTTTTGGATATAGTGGGACAAGAGAAATAGCACTAA
ATAACGATAAAAAATACCATTCTGAATTTTTTTGCGGTGTGGTGCTTGCTCGTTTT
ATATTAATGCTAATTGCAGCTATAATACTCATAATACTCTGTTTTTTTTATGTTTTT
AACGACGTTAAGTCTTTGTTATGTGTTGGTTTTCTGTCCGTAATTGCAGGTGTTTT
CAATCCAAATTGGTTTTTGCAAGGTAAGGAAATGATGAGTGTGATGGCTGTGCTG
TCACTATTTTCACGAGGCATAGCAGTCGTTGCAGTTTATCTAATTATAAAACCCG
CAACGCCGATGTACATCAGTGCCTTATTATTGAGCATGCCATATATTTTGTATTCA
TTCTGTGGCGTTGCCTACTTACTTATTATCAAGGAGATTTTTTTATGTAGGCCACC
GATAAAGAAAATTCAAGTAATTTTAAAAAATGGATTTCATTTTTTTTGTTCAACA
CTTGCGACTAGTGCATACACAATGTTGACCCCTCTTGTATTGGGTGGCGTATCTG
GAAAGTTTGATGTAGGCATCTTTAACTCAGCTAACATGATCAAACAAGGTTTGGC
TGGACTTGCATCACCATTAGTCCAAGCTTTTTATCCAAGAATTAACATTTTGCAA
AGAGAGAATCCATATATTGCAAACTTAAAATCTAGAATGATTCTTAAATACTTGC
TTGTTTTTTACATGGCTTTAGCAATACCATTTTTACTTTTTGCCAACCAATTATCAT
TATTAATATTCGGCATGAAAGGTGAAGTAATTGCAGGTGCAATGCAATTAATGAC
ATTGCTTCCTATATTCATAGGTTTTAATACAGTTGTCGGGTTACTTGTATTAGTAC
CTAATGGGATGCAAAAACAGTATTTCAAATCTATTTTCCTAGGAACTATTACTTG
TTTAAGCATAGTTTATCCAGCATGTAAATATTATGGAGCAACGGGTGCGATTGTG
AGTCTTATTGTAGCTGAAATTTTCGTTGGCATGGGAATGCTTAAACAATTCATTA
AAGTAAATAAAACCGTATGTAGGCCTCATAAATTATGAATATCTCGGTAATAATA
TCTGTTTGGAAACGCCCAGTTCAATTAGAATTGATTCTCTCTGAGCTCGATTCTCA
GGCTAAAGACAATAGTCTACACCTAGAAGTAATTGTTTCCGATAGTCATAGTGGT
AAAGAAATTGATGATGTAGTTGCTGATAATATTCATAAAAAGAAAAATATTAAT
ATTATCCATCAACATACTAAAAATATACTCTCCGCTAAGCGCAATTTCGGAGCAT
CCCTAGCCCATGGGGATTATTTAATATTTCTTGATGATGATTGTATACCCGCAAGT
GGATATATATCATCGTTGCTGAACTATTTAAAAAAAATGAATAGTAAAAGCGTTT

TATGTGGGGAAGTTAGATTCGAAAATGAACTCATTGAGACCAGCAATTACTATCG
CTACAGGAACTCTTTACACCCTAAGTTTAGTGATAGTCCTGATATCTCTATGAAT
GCCTGGACTTTTGTCGCAATGAATTGTGTTCTTGATAGAAAGGCATTTTCATCAG
GTATAGTTTCATATAATGAAAATTTTATTGGTTATGGTTGTGAAGATCATGAGTTT
GGGTGGCAACTTGAAAAAAATGACTTCAAAATTATTTTTGCTGATTTTAAAATAT
TACATCACGAATACAGTGGCGATATAGAAGGATATACAAAAAAAATTCGTGCTA
CAGCACGTGATGGTATGAATGTATTAAGCAAAGTAAGGCCTGAAATGTTTTCTAC
TAATAAAAAATTATTCCTAGTTGAGAAAATATTTAGTAAACACAAAACGTTTAGT
AAAATATGCCAATCAATATTTTTCAATAAATTTATTTTTAAAAAAATAATACAAT
TTTTAAAAAAAACAGATGCAAATAAAAAACTCTATTTCCCAATTCTTTACAGATA
TGTGTTGATTTCGGCATATATACATGGTATTGGAGAGCGTGGCACCTCAAAAACA
GATGATTTGCTTAAGAACTGGTATATATAGATGATGCTATCTTCATTTATTAAGA
CATTTGTATGGAAGGTAAAAAACAATGAAGTATAATGCATTGATGGCTTTTTTAT
TATTTTTTGTTGTTTTTTTTAGATTGTCGCTGATAATACCTTTCTTATATTTGGCAT
TTATTCCTGCATTTTTTGGTATTATGTATTTAGTGCGTAATTTTATGATTACTATGG
GCAATGGATTGGTATCTATAGATCGTAAAAATTTGTTGCTGTTATCTATATTCATA
ATTATTTTTTTATTTTGTTTGGTTTTCGATTTGTTTCAAAAAAGCCATTCTTTTCAA
AGTTATTTTACCGTTAGATTATTTATGTTGTTTTTATTTTCATTTGTTCCTGCGTAT
TATTTAGTAAATAGATTCATAAAGGGTGACTTGAAATTAATGGAGCGAATATTAG
TGTATTCTCTCTGGGTTCAAATAGTTATTTTTTTTGGTATGTATATAAGTCCAGAG
TTAAAAAGATTGTTATATACTTTCTTTGGTATGTCTGACTCTGTTAATCTTTGGGA
ACAAAATGCTAAAGTAAGAGGATTTGGGTTGTCGGGTGAAATAAATTTCATGAC
ACCATTTTTGATGATCTATATGTCATTTTTTATGATGAAAAGGCGTTATGCTTTAA
TTACTTTAATTTGTCTGACTCAAATCGTAAATTCTAACATGGCTGTGATTGCAGCC
ATTATTGGTATCGGTTGCTCTAGACTTAATATTAATATAAAAATTGCAACAGTAT
TGATTTTGGGAGTTTTAGTTTATAGCTTAGGAGCGGTGTTCTTTCCTCGATTTTAT
GATGAGTTCGTTTCTGGAGATGGCACAAGAACTCTGGATATCTTATTACAGCAAC
ATGTGTTTGTTGTAGGTAATTTAGATTTTTTTAATATTATATTTGGATTACAGCAA
AACATATCTTCATCAATCCCCGATATTAAACAAAGTTCGGATATGGGCTGGGTTA
TACTGTTTAATTACGGTGGGTTAACATTTATTACACTCTTTTTATTTTTAATCTTTA
CTATTTCTATTGCGACATTTGGAATGACATATCAAGCAATTATATGGATGTTAATT
GGGATAATTTTCAATACCAAAGGTTTAGTTTTAGGATCTAACGGCTATTTCTTTCT
ATCTTTTATATATATGTTTTTGAATAGAGTAACACTTAGTGGACAGAGTTCAATTA
CTAATAAGTTAGGTCAAGTAAGTAAATAGCTTCCAGAGTATATTTGTCAATGATT

TGAGGTTCGGTTATTATGTTTTCATCTAAAACACTGTTAATTACTGGTGGTACTGG
CTCTTTCGGGAATGCTGTATTAAATAGATTTCTTGATACAGATATTGCAGAAATC
CGTATATTTAGTCGTGATGAAAAAAAACAAGATGATATGCGGAAAAAATACAAT
AATCAAAAATTAAAGTTCTATATTGGTGATGTCAGAGATTACCGTAGTATTTTGA
ATGCGACTCGCGGTGTTGATTTTATATATCATGCAGCGGCACTTAAGCAAGTTCC
ATCATGTGAATTTCATCCTATGGAAGCCGTTAAAACTAATATCCTTGGTACGGAA
AATGTTCTTGAAGCAGCTATAGCGAATGAAGTGAAGAGGGTTGTATGCCTAAGT
ACTGATAAAGCTGTATACCCGATTAACGCAATGGGTATTTCAAAAGCTATGATGG
AAAAGGTCATGGTCGCGAAATCCCGTAATGTTGATCGCAATAAAACAGTAATAT
GTGGTACCCGTTATGGGAATGTTATGGCATCTCGCGGTTCAGTTATTCCATTATTT
GTTGATCTTATTAGAGCGGGCAAGCCACTCACAATAACTGATCCTAATATGACCC
GCTTTATGATGACTCTTGAGGATGCGGTAGATTTAGTTCTTTATGCGTTTGAACAT
GGTAATAATGGTGATATCTTTGTGCAAAAAGCACCTGCAGCAACTATTGACACAT
TAGCTATTGCTTTAAAGGAATTACTAAATGTTCCTGACCATCCGGTAAATGTCAT
TGGAACGCGTCATGGCGAGAAATTATATGAAGCTCTACTTAGTCGTGAGGAAAT
GATCGCTGCTATAGATATGGGCGATTATTACCGTGTCCCGCCAGATCTTCGTGAC
CTTAATTATGGCAAATATGTTGAGCAAGGTGATAGCCGAATATCTGAAATAGAA
GATTATAACTCTCATAATACTCAACGGTTAGATGTTGAAGGCATGAAAGAGCTCT
TGCTAAAATTAGCCTTTATTCGAGCAATTCGTGCTGGTGAAAAATATAATCTGGA
TTCATGATATGAAAATATTAGTTACTGGTGCAAATGGTTTTATTGGTCGTAATTTA
TGTTTGAGGCTTGAGGAACTTGGTTATAAAGATCTTATTAGAATTGATCGAGAAT
CAACGAAGCAAGATCTTGAACAAGGCTTACAGGATGCCGATTTTATTTATCACTT
AGCTGGTATCAATAGACCTAAGACTGATGATGAGTTTATTTCTGGAAACAGTGAT
TTAACAAAGCATATAGTTGAGTATCTCCTTTCTATTGGTAAGAATACACCAATTA
TGCTAAGTTCTTCGATACAAGCTGAACTTAATAATGCTTATGGGGTTAGCAAAGC
TGTAGCTGAAAGCTATGTCGAAAAATATGCTGCTGCTAGTGGTTCTTCGTATTAT
ATTTTCAGATATCCAAACGTTTTTGGTAAATGGTGTAAGCCAAACTATAATTCTTT
TATAGCAACTTTTTGCTACAATATTTCCAATGATATTGAGATTACTATCAATGATG
CAGCAGCGCCAGTCAATCTGGTCTATATTGATGATGTTTGTACTGATGCTATAGC
TCTTCTCTCTGGGACGGTTGAAAGTGGATATAAAGTTGTTGCACCAATTTATTCA
ACAACAGTTGGTGAAGTTGCAGAATTAATTTATAGCTTCAAAAATAGCCGTTCCA
CCCTGATCACAGAGGCTGTCGGGGCGGGATTTACCCGTGCATTGTATTCTACATG
GCTGAGTTATTTACCAGCAGAGAAGTTTGCGTACAAGGTACCTTTTTATGGGGAT
GCCCGCGGAGTCTTTTGTGAGATGTTGAAAACGCCTTCAGCGGGGCAGTTTTCAT

TTTTTACTGCTCACCCTGGTATTACGCGTGGCGGACATTACCATCACAGTAAAAA
TGAGAAGTTTTTGGTCATTCGAGGTCAGGCATGCTTTAAATTTGAACATGTGATT
ACCGGTGAGCGATATGAACTGAAAGTTTCATCGGGTGAGTTTAAGATTGTTGAAA
CAGTTCCTGGTTGGACACATGACATTACAAATATTGGAACTGATGAATTAATAGT
CATGCTCTGGGCAAATGAAATTTTCAACCGTGATGAGCCCGATACTATTGCGAGA
CCTCTATAATGAAAAAATTAAAAGTTATGTCTGTTGTTGGAACCCGTCCTGAGAT
TATCCGTTTGTCGAGGGTTCTTGCTAAGTTTGATGAATACTGCGAGCATATTATTG
TCCATACTGGTCAAAATTATGATTACGAATTAAATGAAGTGTTCTTCAATGACTT
GGGTGTTCGAAAACCTGATTATTTTTTAAATGCAGCGGGTAAAAATGCGGCGGA
AACCATTGGTCAGGTTATTATTAAGGTAGATGAAGTATTAGAAATCGAAAAACCT
GAAGCAATACTGGTATTGGGCGATACGAATTCATGTATTTCTGCCATTCCGGCCA
AACGCCGTAAAGTGCCTATATTTCATATGGAAGCAGGTAACCGTTGTTTCGATCA
ACGCGTGCCTGAAGAAACCAACAGACGTATTGTTGACCATACGGCTGATATCAA
TATGACCTACAGTGATATTGCTCGTGAATATCTCTTGGCTGAAGGTATCCCAGCT
GATCGGATCATAAAAACTGGTAGCCCTATGTTTGAGGTTCTTTCATATTATATGC
CCCAAATTGATGGTTCAGATGTGCTATCGCGTTTGAATCTACAGTCTGGTGAGTT
TTTTGTAGTAAGTGCGCATCGTGAAGAGAATGTTGATTCTCCAAAACAGCTCGTA
AAGCTTGCGAACATTCTAAATACTGTTGCTGAAAAATATAATCTTCCAGTTATTG
TCTCCACACACCCAAGGACACGTAACCGAATCCGTGAGCAAGGAATTGAATTTC
ATTCAAATATAAATCTACTGAAACCATTGGGTTTCCATGATTATAACCACTTGCA
GAAGAACTCACGAGCTGTGCTTTCAGATAGCGGTACTATCACTGAAGAGTCATCC
ATCATGAATTTCCCAGCGGTAAACATCCGGGAAGCGCATGAGCGTCCGGAAGGC
TTTGAGGAAGCATCCGTCATGATGGTGGGGTTAGAGTGTGAACGCGTATTACAA
GCGCTGGATATTCTGGCAACACAACCGCGAGGTGAAGTCCGTCTTTTACGTCAGG
TTAGTGATTACAGCATGCCAAATGTGTCGGATAAAGTTGTCAGAATTGTTCACTC
TTACACAGATTATGTTAAGAGAGTCGTCTGGAAAGAATATTGATGAAACTTGCTT
TAATCATAGATGATTACCTGCCCAACAGTACTCGTGTTGGTGCAAAAATGTTTCA
TGAACTTGCTCAAGAATTTATCCAGCGTGGGCACGATGTTACGGTAATTACTCCT
GGTACGGGCATGCAAGAAGAGATTTCTTTTGATACCTTTCAGGGGGTAAAAACAT
GGCGTTTTAAAAGCGGGCCGCTCAAGGATGTAAGTAAAATTCAGCGAGCGGTCA
ATGAAACGCTTTTGTCCTATCGGGCGTGGAAAGCCATCAAAAAATGGGTAAAAA
AAGAGACCTTTGAGGGGGTGATTTATTATTCACCTTCCATATTCTGGGGGCCTTT
AGTTAAAAAAATTAAAGCTCGTTGCCAATGTCCTGCTTATCTTATTTTAAGAGAT
ATGTTTCCACAATGGGTAATTGATGCAGGAATGCTTAATGCTGGTTCCCCAATAG

AACGCTACTTTCGTCTTTTTGAAAAAATATCTTATCGTCAGGCAAATCGTATTGG
ACTTATGTCTGATAAGAATCTTGATGTTTTTCGGAAAGATAATAAAGGCTATCCG
TGCGAAGTTTTGCGTAATTGGGCATCCCTAACACCAACGATCATACCCAAGGATT
ATATACCACTACGTAAGCGACTTGGCCTAGAGGATAAAACCATTTTCTTCTATGG
TGGAAACATAGGTCATGCACAGGACATGACAAACTTGATGCGACTTGTGAGAAA
CATGGCAGCATATCCTCAAGCTCATTTCCTATTTATTGGCCAGGGGGATGAAGTT
GAATTAATTAATTCATTAGCATCTGAGTGGGCATTGACGAATTTCACCTATTTGC
CCTCGGTTAACCAAGATGAATTTAAGTTCATTTTGTCGGAAATGGATATCGGCTT
GTTTTCTCTTTCCGCTAGACACTCTTCCCATAATTTTCCTGGTAAGTTATTAGGCT
ATATGGTTCAGTCGCTACCTATTTTAGGTAGCGTAAATGCCGGAAATGATTTGCT
CGACATTGTCAATCAAAATAATGCGGGATTAATCCATGTCAATGGTGAGGACGA
TAAATTATGTCAATCTGCGCTATTAATGTTGCATGATATTGATGTGCGCCGGCAA
CTTGGTTCGGGGGCGAATATATTGTTGAAAGAACAATTCTCCGTTGAGTCTGCGG
CACAGACGATAGAAATGAGGTTGGAGGCATGCAATGCGATTAATTGATAATGAC
CAACTCGACGAATTATATGATCAAGCCGGGCAATCGGAACGTTTACGTTCCCACC
TTATGATGCACGGCTCGCATCAAGAAAAGGTACAGCGTTTACTTATTGCATTAGT
AAAGGGCAGCTATGTTGAACCGCATTATCACGAACTTCCTCATCAGTGGGAAATG
TTCATTGTTATGGAGGGGCAACTTCAGGTTTGTTTGTATGGTAGAAATGGTGAGG
TTATAAAGCAATTTATAGCAGGAGATAATACTGGAATGAGCATTGTGGAGTTTTC
TCCGGGCGATATACACAGTGTCGAATGCCTATCTCCGCGTGCTCTTATGGTGGAA
GTTAAGGAGGGGCCATTTGACCCTTCTTTTGCAAAATCGTTCGTGTGAGCGGCCG
CGAGCTCGTCGACTCGAGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATA
CTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGGA
TAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTT
GTATACTTATTTGCGAACATTCCAGGCCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACC
TGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTG
ATGGGACGCAACCTTGCGCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTT
TCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGAAGTGATTGCCGAAAATCCAGGCAAGA
AACTGGTTCCTTACTATACGGTGAAAGAGTTTGTCGAATCTCTGGAAACGCCTCG
TCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCC
CTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATTGATGGTGGTAACACCTTCT
TCCAGGACACTATTCGTCGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTTAACTTCAT
CGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATG
CCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTGGTAGCACCGATCCTGACCAAAATC

GCCGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGCCGATGGCG
CAGGTCACTATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCT
GATTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCAACGAAGAA
CTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGAATAACGGTGAACTGAGCAGTTACCTGATC
GACATCACCAAAGATATCTTCACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTT
GATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACCGGTAAATGGACCAGCCAG
AGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGCTGTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTTTGCAC
GTTATATCTCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTTGCCGCATCTAAAGTTCTCTCTGGT
CCGCAAGCACAGCCAGCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTCGT
GCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTG
CTGCGTCTGAAGAGTACAACTGGGATCTGAACTACGGCGAAATCGCGAAGATTT
TCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCTGCAGAAAATCACCGATGCTTA
TGCCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAATT
GCCGATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGATGTCGTTGCTTATGCAGTACAGAACG
GTATTCCGGTTCCGACCTTCTCCGCAGCGGTTGCCTATTACGACAGCTACCGTGCT
GCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTGACTATTTTGGTGCGCATA
CTTATAAGCGTATTGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

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

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGC
CTGCCACTAAGGCGATACCCAAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGA
TTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAAGAAATCCTCCTGGT
AACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTA
GAATCACTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCC
ATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATGAACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTT
TAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCATTTGTCGT
GGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAA
CCTTGCTGCCATGATTGCACGTTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCA
AAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCCGTCATCCAGACTAAAGAGCCGC
TGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGATC
AGCCGCAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTCGCTATGTGCTTTCTGC
CGATATTTGGCCGGAACTGGAACGTACTCAGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAG
CTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCCGTTGATGCAATGCTGA
TGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTG

TGAAGTATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTG
AGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAATCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAA
AATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAATCTTCCTG
CCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATT
CAAAGTTTTCCAGGATTTTCCTTGTTTCCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCG
TTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTAACGCTCGTCACATCATAGGCATG
CATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATACCTC
TATTAATCAAACTGAGAGCCGCTTATTTCACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAA
TAAATTAAGTGAAAATACTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTGGTTCAGCTGT
AGTTCGTCACATTATAAATAATACGCAGGATAGTGTTGTTAATGTCGATAAATTA
ACGTACGCCGGAAACCGGGAATCACTTGCTGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATG
TTTTTGAACATGCGGATATTTGCGATGCACCTGCAATGGCACGGATTTTTGCTCA
GCATCAGCCGGATGCAGTGATGCACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTCA
ATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTTGGTACTTATGTCCTTTT
GGAAGCCGCTCGCAATTACTGGTCTGCTCTTGATAGCGACAAGAAAAATAGCTTC
CGTTTTCATCATATTTCTACTGACGAAGTCTATGGTGATTTGCCTCATCCAGATGA
AGTAAATAATACAGAAGAATTACCCTTATTTACTGAGACGACAGCTTACGCGCCA
AGCAGCCCTTATTCCGCATCCAAAGCATCCAGCGATCATTTAGTCCGCGCGTGGA
AACGTACATATGGTTTACCGACAATTGTGACTAATTGCTCGAACAACTATGGTCC
TTATCATTTCCCGGAAAAGCTTATTCCACTGGTTATTCTTAATGCACTGGAAGGTA
AGGCATTACCTATTTATGGCAAAGGAGATCAGATCCGCGACTGGTTGTATGTTGA
AGATCATGCGCGTGCGTTATATACCGTCGTAACCGAAGGTAAAGCGGGTGAAAC
TTATAACATTGGTGGGCACAACGAAAAGAAAAACATCGATGTAGTGCTCACTAT
TTGTGATTTGCTGGATGAGATTGTACCGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAAATC
ACTTATGTTGCTGATCGTCCGGGACACGATCGCCGCTATGCTATTGATGCTGAGA
AGATTGGTCGCGCATTGGGATGGAAACCACAGGAAACGTTTGAGAGCGGGATTC
GTAAAACGGTGGAATGGTACCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAATGTGAAAA
GTGGTGCCTATCAATCGTGGATTGAACAGAACTATGAGGGCCGCCAGTAATGAA
TATCCTCCTTTTTGGCAAAACAGGGCAGGTAGGTTGGGAACTACAGCGTGCTCTG
GCACCTTTGGGTAATTTGATTGCTTTTGATGTTCACTCTACTGATTATTGCGGTGA
TTTTAGTAATCCTGAAGGTGTAGCTGAAACCGTAAGAAGCATTCGGCCGGATATT
ATTGTCAATGCAGCCGCTCACACCGCAGTAGACAAAGCAGAATCAGAACCGGAG
TTTGCACAATTAATTAACGCAACAAGTGTCGAAGCGATTGCGAAAGCAGCAAAT
GAAGTTGGAGCCTGGGTTATCCATTACTCGACTGATTACGTCTTCCCTGGAAATG

GCGATATGCCATGGCTGGAGACGGATGCAACCGCACCACTAAATGTTTACGGTG
AAACCAAGTTAGCCGGAGAAAAAGCGTTACAGGAATATTGCGCGAAGCATCTTA
TTTTCCGGACCAGCTGGGTCTATGCAGGAAAAGGAAATAACTTCGCCAAAACGA
TGTTACGTCTGGCAAAAGAGCGTGAAGAATTAGCGGTTATTAACGATCAGTTTGG
TGCGCCAACAGGTGCTGAACTGCTGGCTGATTGTACAGCACATGCCATTCGTGTC
GCACTGAATAAACCGGATGTCGCAGGCTTGTACCATTTGGTAGCCAGTGGTACCA
CAACCTGGTACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGCAT
TCCCCTTGCACTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAACAACAGCCTATCCTACACCA
GCTCGTCGTCCACATAACTCTCGCCTTAATACAGAAAAATTTCAGCAGAACTTTG
CGCTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTTGGCGTGAAACGAATGCTCAATGAATTATT
TACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTGATGGTGGAGCAAGA
TGAATTAAAAGGAATGATGAAATGAAAATGCGTAAAGGTATTATTTTAGCGGGT
GGTTCTGGTACACGTCTTTATCCTGTGACTATGGCTGTCAGTAAACAGCTATTACC
TATTTATGATAAACCGATGATCTATTACCCGCTCTCTACACTGATGTTGGCGGGT
ATTCGCGATATTTTGATTATCAGTACACCTCAGGATACTCCTCGTTTTCAACAATT
GCTGGGTGACGGTAGCCAGTGGGGCCTGAATCTTCAGTACAAAGTGCAACCTAG
CCCAGATGGCCTCGCGCAGGCATTTATCATCGGTGAAGAGTTTATTGGTGGTGAT
GATTGTGCTTTGGTTCTTGGTGATAATATCTTTTACGGTCACGATCTGCCGAAGCT
AATGGAGGCCGCTGTTAACAAAGAAAGTGGTGCAACGGTATTTGCCTATCACGTT
AATGATCCAGAACGCTATGGTGTCGTTGAGTTTGATAAAAACGGTACGGCAATC
AGTCTGGAAGAAAAACCGTTAGAACCAAAGAGTAATTACGCCGTTACAGGTCTG
TACTTTTATGATAACGACGTGGTTCAGATGGCGAAAAACTTGAAGCCGTCTGCAC
GTGGTGAGTTAGAAATTACAGATATTAACCGTATTTATCTTGAGCAGGGACGTCT
GTCTGTCGCGATGATGGGGCGTGGCTACGCGTGGCTGGACACGGGGACTCATCA
GAGTCTGATAGAAGCAAGTAATTTTATTGCGACAATTGAAGAGCGCCAGGGATT
GAAGGTTTCCTGTCCTGAAGAGATTGCATTTCGTAAAGGTTTTATTGATGTTGAG
CAAGTAAGAAAATTAGCTGTACCACTAATAAAGAATAATTATGGGCAGTATCTTT
ATAAAATGACGAAGGATTCAAATTAATGAATGTGATTAGAACTGAAATTGAAGA
TGTGCTAATTCTGGAGCCAAGAGTATTTGGTGATGATAGAGGTTTCTTTTATGAG
AGCTTTAATCAATCAGCATTTGAACATATTCTAGGCTATCCGGTCAGCTTTGTTCA
AGACAATCACTCACGTTCATCAAAAAATGTACTCAGAGGCCTTCACTTTCAACGC
GGCGAGTACGCACAAGATAAACTTGTACGCTGCACTCATGGAGCAGTTTTTGATG
TTGCTGTTGATATTCGACCCAATTCGGTATCCTTTGGTAAATGGGTTGGTGTTCTG
CTTTCAGCTGATAATAAGCAGCAGTTGTGGATACCAAAAGGGTTTGCTCATGGCT

TTTTGGTTCTGTCTGATATCGCTGAATTTCAATATAAAACTACAAACTATTATCAT
CCTGAAAGCGATTGTGGAATATGTTGGAATGATGAACGCATTGCAATTGATTGGC
CCCAAACATCAGGGTTAATCCTTTCGCCAAAAGATGAAAGGCTCTTTACGTTAGA
TGAGCTTATCAGATTAAAATTAATTGCATGAATACGAATAAATTATCTTTAAGAA
GAAACGTTATATATCTGGCTGTCGTTCAAGGTAGCAATTATCTTTTACCATTGCTT
ACATTTCCATATCTTGTAAGAACACTTGGTCCTGAAAATTTCGGTATATTCGGTTT
TTGCCAAGCGACTATGCTATATATGATAATGTTTGTTGAATATGGTTTCAATCTCA
CAGCAACTCAGAGTATTGCCAAAGCAGCAGATAGTAAAGATAAAGTAACGTCTA
TTTTTTGGGCGGTGATATTTTCAAAAATAGTTCTTATCGTCATTACATTGATTTTC
TTAACGTCGATGACCTTGCTTGTTCCTGAATATAACAAGCATGCCGTAATTATAT
GGTCGTTTGTTCCTGCATTAGTCGGGAATTTAATCTACCCTATCTGGCTGTTTCAG
GGAAAAGAAAAAATGAAATGGCTGACTTTAAGTAGTATTTTATCCCGCTTGGCTA
TTATCCCTCTAACATTTATTTTTGTGAACACAAAGTCAGATATAGCAATTGCCGGT
TTTATTCAGTCAAGTGCAAATCTGGTTGCTGGAATTATTGCACTAGCTATCGTTGT
TCATGAAGGTTGGATTGGTAAAGTTACGCTATCATTACATAATGTGCGTCGATCT
TTAGCAGACGGTTTTCATGTTTTTATTTCCACATCTGCTATTAGTTTATATTCTACG
GGAATAGTTATTATCCTGGGATTTATATCTGGACCAACGTCCGTAGGGAATTTTA
ATGCGGCCAATACTATAAGAAACGCGCTTCAAGGGCTATTAAATCCTATCACCCA
AGCAATATACCCAAGAATATCAAGTACGCTTGTTCTTAATCGTGTGAAGGGTGTG
ATTTTAATTAAAAAATCATTGACCTGCTTGAGTTTGATTGGTGGTGCTTTTTCATT
AATTCTGCTCTTGGGTGCATCTATACTAGTAAAAATAAGTATAGGGCCGGGATAT
GATAATGCAGTGATTGTGCTAATGATTATATCGCCTCTGCCTTTTCTTATTTCATT
AAGTAATGTCTATGGCATTCAAGTTATGCTGACCCATAATTATAAGAAAGAATTC
AGTAAGATTTTAATCGCTGCGGGTTTGTTGAGTTTGTTGTTGATTTTTCCGCTAAC
AACTCTTTTTAAAGAGATTGGTGCAGCAATAACATTGCTTGCAACAGAGTGCTTA
GTTACGTCACTCATGCTGATGTTCGTAAGAAATAATAAATTACTGGTTTGCTGAG
GATTTTATGTACGATTATATCATTGTTGGTTCTGGTTTGTTTGGTGCCGTTTGTGC
GAATGAGTTAAAAAAGCTAAACAAAAAAGTTTTAGTGATTGAGAAAAGAAATCA
TATCGGTGGAAATGCGTACACAGAGGACTGTGAGGGTATCCAGATTCATAAATA
TGGTGCACATATTTTTCATACCAATGATAAATATATATGGGATTACGTTAATGAT
TTAGTAGAATTTAATCGTTTTACTAATTCTCCACTGGCGATTTATAAAGACAAATT
ATTCAACCTTCCTTTTAATATGAATACTTTCCACCAAATGTGGGGAGTTAAAGAT
CCTCAAGAAGCTCAAAATATCATTAATGCTCAGAAAAAAAAGTATGGTGACAAG
GTACCTGAAAATTTGGAGGAGCAGGCGATTTCATTAGTTGGGGAGGACTTATACC

AAGCATTGATAAAGGGTTATACGGAGAAGCAGTGGGGAAGAAGTGCAAAAGAA
TTGCCTGCATTTATTATTAAGCGAATCCCAGTGAGATTTACGTTTGATAACAATTA
TTTTTCCGATCGCTATCAAGGTATTCCGGTGGGAGGCTACACTAAGCTTATTGAA
AAAATGCTTGAAGGTGTGGACGTAAAATTAGGCATTGATTTTTTGAAAGACAAA
GATTCTCTAGCGAGTAAAGCCCATAGAATCATCTACACTGGACCCATTGATCAGT
ACTTCGACTATAGGTTTGGAGCGTTAGAATATCGCTCTTTAAAATTTGAGACGGA
ACGCCATGAATTTCCAAACTTCCAAGGGAATGCAGTAATAAATTTCACTGATGCT
AATGTACCATATACCAGAATAATTGAGCATAAACATTTTGACTATGTTGAGACAA
AGCATACGGTTGTTACAAAAGAATATCCATTAGAGTGGAAAGTTGGCGACGAAC
CCTACTATCCAGTTAATGATAATAAAAACATGGAGCTTTTTAAGAAATATAGAGA
GTTAGCTAGCAGAGAAGACAAGGTTATATTTGGCGGGCGTTTGGCCGAGTATAA
ATATTATGATATGCATCAAGTGATATCTGCCGCTCTTTATCAAGTGAAAAATATA
ATGAGTACGGATTAATGATCTATCTTGTAATTAGTGTCTTTCTCATTACAGCATTT
ATCTGTTTATATCTTAAGAAGGATATATTTTATCCAGCCGTATGCGTTAATATCAT
CTTCGCACTGGTCTTATTGGGATATGAAATAACGTCAGATATATATGCTTTTCAGT
TAAATGACGCTACGTTGATTTTTCTACTTTGCAATGTTTTGACATTTACCCTGTCA
TGTTTATTGACGGAAAGTGTATTAGATCTAAATATCAGAAAAGTCAATAATGCTA
TTTATAGCATACCATCGAAGAAAGTGCATAATGTAGGCTTGTTAGTTATTTCTTTT
TCGATGATATATATATGCATGAGGTTAAGTAACTACCAGTTCGGGACTAGCTTAC
TTAGCTATATGAATTTGATAAGAGATGCTGATGTTGAAGACACATCAAGAAATTT
CTCAGCATACATGCAGCCAATCATTCTAACTACTTTTGCTTTATTTATTTGGTCTA
AAAAATTTACTAATACAAAGGTAAGTAAAACATTTACTTTACTTGTTTTTATTGTA
TTCATCTTTGCAATTATACTGAATACTGGTAAGCAAATTGTCTTTATGGTTATCAT
CTCTTATGCATTCATCGTAGGTGTTAATAGAGTAAAACATTATGTTTATCTTATTA
CAGCTGTAGGTGTTCTATTCTCCTTGTATATGCTCTTTTTACGTGGACTGCCTGGG
GGGATGGCATATTATCTATCCATGTATTTGGTCAGCCCTATAATCGCGTTTCAGG
AGTTTTATTTTCAGCAAGTATCTAACTCTGCCAGTTCTCATGTCTTTTGGTTTTTTG
AAAGGCTGATGGGGCTATTAACAGGTGGAGTCTCTATGTCGTTGCATAAAGAATT
TGTGTGGGTGGGTTTGCCAACAAATGTTTATACTGCTTTTTCGGATTATGTTTATA
TTTCCGCGGAGCTAAGCTATTTGATGATGGTTATTCATGGCTGTATTTCAGGTGTT
TTATGGAGATTGTCTCGAAATTACATATCTGTGAAAATATTTTATTCATATTTTAT
TTATACCTTTTCTTTCATTTTTTATCATGAAAGCTTCATGACTAATATTAGCAGTT
GGATACAAATAACTCTTTGTATCATAGTATTCTCTCAATTTCTTAAGGCCCAGAA
AATAAAGTGAAAATGTATTTTTTGAATGATTTAAATTTCTCTAGACGCGATGCTG

GATTTAAAGCAAGAAAAGATGCACTGGACATTGCTTCAGATTATGAAAACATTTC
TGTTGTTAACATTCCTCTATGGGGTGGAGTAGTCCAGAGAATTATTAGTTCTGTTA
AGCTTAGTACATTTCTCTGCGGTCTTGAAAATAAAGATGTTTTAATTTTCAATTTC
CCGATGGCCAAACCATTTTGGCATATATTGTCATTCTTTCACCGCCTTCTAAAATT
TAGAATAGTACCTCTGATTCATGATATTGATGAATTAAGAGGAGGAGGGGGTAG
TGATTCTGTGCGGCTTGCTACCTGTGATATGGTCATAAGTCACAATCCACAAATG
ACAAAGTACCTTAGTAAATATATGTCTCAGGATAAAATCAAAGACATAAAAATA
TTTGATTACCTCGTCTCATCTGATGTGGAGCATCGAGATGTTACGGATAAGCAAC
GAGGGGTCATATATGCTGGCAACCTTTCTAGGCATAAATGTTCTTTCATATATAC
TGAAGGATGCGATTTTACTCTCTTTGGTGTCAACTATGAAAATAAAGATAATCCT
AAATATCTTGGAAGTTTTGATGCTCAATCTCCGGAAAAGATTAACCTCCCAGGCA
TGCAATTTGGACTCATTTGGGATGGAGATTCTGTCGAAACCTGTAGTGGTGCCTT
TGGCGACTATTTAAAGTTTAATAACCCTCATAAGACATCTCTTTATCTTTCAATGG
AACTTCCAGTATTTATATGGGATAAAGCCGCCCTTGCGGATTTCATTGTAGATAA
TAGAATAGGATATGCAGTGGGATCAATCAAAGAAATGCAAGAGATTGTTGACTC
CATGACAATAGAAACTTATAAGCAAATTAGTGAGAATACAAAAATTATTTCTCA
GAAAATTCGAACAGGAAGTTACTTCAGGGATGTTCTTGAAGAGGTGATCGATGA
TCTTAAAACTCGCTAAACGATATGGTCTCTGTGGTTTTATTCGGCTTGTTAGAGAT
GTCTTATTGACTCGTGTATTTTACCGGAACTGTAGAATTATTCGATTTCCCTGCTA
TATTCGCAATGATGGTAGCATTAATTTTGGTGAAAATTTCACAAGTGGAGTCGGT
CTCAGGCTGGATGCATTTGGACGTGGCGTGATTTTTTTTCCGATAATGTGCAAGT
TAACGACTATGTTCATATCGCCTCAATTGAGAGCGTTACGATAGGTCGGGATACG
CTTATTGCAAGTAAAGTATTTATTACCGATCATAATCACGGTTCCTTTAAGCACTC
TGATCCAATGAGTTCGCCAAATATACCTCCAGACATGCGCACGTTGGAATCTTCA
GCTGTTGTAATTGGCCAGAGGGTTTGGTTGGGTGAGAATGTGACGGTTTTGCCTG
GAACAATTATTGGTAATGGAGTCGTAGTCGGCGCCAATTCTGTTGTTAGAGGTTC
TATTCCCGAAAATACTGTCATTGCGGGAGTACCAGCAAAAATCATAAAGAAATA
CAATCATGAGACCAAATTATGGGAAAAAGCATAGTCGTTGTTTCTGCGGTCAATT
TTACCACTGGCGGTCCATTTACCATTTTGAAAAAATTTTTGGCAGCAACTAATAA
TAAAGAAAATGTCAGTTTTATCGCATTAGTCCATTCTGCTAAAGAGTTAAAAGAA
AGTTATCCATGGGTTAAATTCATTGAGTTTCCTGAGGTTAAAGGGTCGTGGCTAA
AACGTTTGCACTTTGAATATGTAGTTTGTAAAAAACTTTCAAAAGAGCTGAATGC
TACGCATTGGATTTGTCTGCATGATATTACGGCCAATGTCGTCACTAAAAAAAGA
TATGTGTATTGTCATAACCCTGCCCCTTTTTATAAAGGAATTTTATTCCGTGAAAT

TCTTATGGAGCCTAGCTTTTTCTTATTTAAAATGCTATACGGGCTGATATATAAAA
TAAACATTAAAAAAAATACTGCAGTGTTTGTTCAACAATTCTGGATGAAAGAAA
AATTTATCAAGAAATATTCTATAAATAACATCATTGTCAGTCGGCCAGAAATTAA
ATTATCTGATAAAAGCCAACTTACTGATGATGATTCTCAATTTAAGAATAACCCT
TCTGAGTTGACAATATTTTACCCTGCTGTTCCACGAGTATTTAAAAATTACGAGCT
TATTATTAGTGCAGCAAGGAAATTGAAAGAACAATCCAATATTAAATTTCTGCTT
ACTATCAGTGGTACAGAAAATGCGTATGCAAAATATATTATCAGTCTTGCAGAAG
GACTGGATAATGTTCATTTCCTCGGGTACTTGGATAAAGAAAAAATCGATCATTG
TTATAATATTTCAGATATAGTTTGTTTTCCCTCTAGGTTAGAAACATGGGGATTGC
CGTTGTCTGAGGCTAAAGAGCGAGGTAAGTGGGTATTAGCATCAGATTTCCCATT
TACTAGAGAAACTCTTGGTAGTTATGAAAAGAAAGCTTTTTTTGATTCTAATAAC
GATGACATGTTAGTTAAACTTATTATTGACTTCAAAAAAGGTAACCTCAAAAAAG
ATATCTCTGATGCAAATTTCATTTATCGTAATGAAAATGTATTAGTTGGGTTTGAT
GAACTAGTTAATTTTATTACTGAAGAACATTGAAATGGTATATATAATAATCGTT
TCCCACGGACATGAAGACTACATCAAAAAATTACTCGAAAATCTTAATGCTGAC
GATGAGCACTACAAGATTATCGTACGCGACAACAAAGACTCTCTATTATTGAAAC
AAATATGCCAGCATTATGCAGGCCTGGACTATATTAGTGGAGGTGTATACGGCTT
TGGTCATAATAATAATATTGCGGTGGCGTATGTAAAGGAAAAATATAGACCCGC
AGATGATGATTACATTTTGTTTTTGAATCCCGATATCATCATGAAGCATGATGATT
TGCTGACATATATTAAATATGTCGAAAGTAAGCGTTATGCTTTTAGTACATTATG
CCTGTTCCGAGATGAAGCGAAATCTTTACATGATTATTCCGTAAGAAAATTTCCT
GTGCTTTCTGATTTTATTGTGTCATTTATGTTAGGGATTAATAAAACAAAAATTCC
TAAAGAAAGTATCTATTCTGATACGGTTGTTGATTGGTGCGCAGGATCATTTATG
CTGGTACGTTTTTCAGATTTTGTGCGTGTAAATGGCTTCGATCAAGGTTACTTTAT
GTACTGTGAAGATATTGACCTGTGCTTGAGGCTTAGCCTGGCTGGTGTCAGACTT
CATTATGTTCCCGCTTTTCATGCGATACATTATGCTCATCATGACAATCGAAGTTT
TTTTTCAAAAGCCTTCAGATGGCACTTAAAAAGTACTTTTAGATATTTAGCCAGA
AAACGTATTTTATCAAATCGCAACTTTGATCGAATTTCATCAGTTTTTCACCCGTA
AGAGCTCGGTACCCGGGCCTAGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATA
CTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATCCGT
CGACGGCGGCCGCCCTGCAGGCATGCAAGCTTGATCCATATGGATCGCTAGCTTA
ATTAAATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAG
TACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTCCAGGCCGCGAGCATTCAGCGCGGTGAT
CACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATG

GCAGTGATGGGACGCAACCTTGCGCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCT
CTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGAAGTGATTGCCGAAAATCCAG
GCAAGAAACTGGTTCCTTACTATACGGTGAAAGAGTTTGTCGAATCTCTGGAAAC
GCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATT
GATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATTGATGGTGGTAACA
CCTTCTTCCAGGACACTATTCGTCGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTTAA
CTTCATCGGTACGGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCT
ATTATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTGGTAGCACCGATCCTGACC
AAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGCCG
ATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTGAATACGGCGATA
TGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCAA
CGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGAATAACGGTGAACTGAGCAGTTA
CCTGATCGACATCACCAAAGATATCTTCACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTA
CCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACGGGTAAATGGAC
CAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGCTGTCGCTGATTACCGAGTCTGTG
TTTGCACGTTATATCTCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTTGCCGCATCTAAAGTTCT
CTCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGT
TCGTCGTGCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCCAGGGCTTCTCTCAGC
TGCGTGCTGCGTCTGAAGAGTACAACTGGGATCTGAACTACGGCGAAATCGCGA
AGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCTGCAAAAAATCACCGA
TGCTTATGCCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAG
CAAATTGCCGATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGATGTCGTTGCTTATGCAGTAC
AGAACGGTATTCCGGTTCCGACCTTCTCCGCAGCGGTTGCCTATTACGACAGCTA
CCGTGCTGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTGACTATTTTGGT
GCGCATACTTATAAGCGTATTGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGG
ATTAA

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

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGC
CTGCCACTAAGGCGATACCCAAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGA
TTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAAGAAATCCTCCTGGT
AACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTA
GAATCACTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCC
ATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATGAACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTT

TAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCATTTGTCGT
GGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAA
CCTTGCTGCCATGATTGCACGTTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCA
AAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCCGTCATCCAGACTAAAGAGCCGC
TGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGATC
AGCCGCAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTCGCTATGTGCTTTCTGC
CGATATTTGGCCGGAACTGGAACGTACTCAGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAG
CTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCCGTTGATGCAATGCTGA
TGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTG
TGAAGTATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTG
AGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAATCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAA
AATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAATCTTCCTG
CCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATT
CAAAGTTTTCCAGGATTTTCCTTGTTTCCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCG
TTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTAACGCTCGTCACATCATAGGCATG
CATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATACCTC
TATTAATCAAACTGAGAGCCGCTTATTTCACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAA
TAAATTAAGTGAAAATACTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTGGTTCAGCTGT
AGTTCGTCACATTATAAATAATACGCAGGATAGTGTTGTTAATGTCGATAAATTA
ACGTACGCCGGAAACCGGGAATCACTTGCTGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATG
TTTTTGAACATGCGGATATTTGCGATGCACCTGCAATGGCACGGATTTTTGCTCA
GCATCAGCCGGATGCAGTGATGCACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTCA
ATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTTGGTACTTATGTCCTTTT
GGAAGCCGCTCGCAATTACTGGTCTGCTCTTGATAGCGACAAGAAAAATAGCTTC
CGTTTTCATCATATTTCTACTGACGAAGTCTATGGTGATTTGCCTCATCCAGATGA
AGTAAATAATACAGAAGAATTACCCTTATTTACTGAGACGACAGCTTACGCGCCA
AGCAGCCCTTATTCCGCATCCAAAGCATCCAGCGATCATTTAGTCCGCGCGTGGA
AACGTACATATGGTTTACCGACAATTGTGACTAATTGCTCGAACAACTATGGTCC
TTATCATTTCCCGGAAAAGCTTATTCCACTGGTTATTCTTAATGCACTGGAAGGTA
AGGCATTACCTATTTATGGCAAAGGAGATCAGATCCGCGACTGGTTGTATGTTGA
AGATCATGCGCGTGCGTTATATACCGTCGTAACCGAAGGTAAAGCGGGTGAAAC
TTATAACATTGGTGGGCACAACGAAAAGAAAAACATCGATGTAGTGCTCACTAT
TTGTGATTTGCTGGATGAGATTGTACCGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAAATC
ACTTATGTTGCTGATCGTCCGGGACACGATCGCCGCTATGCTATTGATGCTGAGA

AGATTGGTCGCGCATTGGGATGGAAACCACAGGAAACGTTTGAGAGCGGGATTC
GTAAAACGGTGGAATGGTACCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAATGTGAAAA
GTGGTGCCTATCAATCGTGGATTGAACAGAACTATGAGGGCCGCCAGTAATGAA
TATCCTCCTTTTTGGCAAAACAGGGCAGGTAGGTTGGGAACTACAGCGTGCTCTG
GCACCTTTGGGTAATTTGATTGCTTTTGATGTTCACTCTACTGATTATTGCGGTGA
TTTTAGTAATCCTGAAGGTGTAGCTGAAACCGTAAGAAGCATTCGGCCGGATATT
ATTGTCAATGCAGCCGCTCACACCGCAGTAGACAAAGCAGAATCAGAACCGGAG
TTTGCACAATTAATTAACGCAACAAGTGTCGAAGCGATTGCGAAAGCAGCAAAT
GAAGTTGGAGCCTGGGTTATCCATTACTCGACTGATTACGTCTTCCCTGGAAATG
GCGATATGCCATGGCTGGAGACGGATGCAACCGCACCACTAAATGTTTACGGTG
AAACCAAGTTAGCCGGAGAAAAAGCGTTACAGGAATATTGCGCGAAGCATCTTA
TTTTCCGGACCAGCTGGGTCTATGCAGGAAAAGGAAATAACTTCGCCAAAACGA
TGTTACGTCTGGCAAAAGAGCGTGAAGAATTAGCGGTTATTAACGATCAGTTTGG
TGCGCCAACAGGTGCTGAACTGCTGGCTGATTGTACAGCACATGCCATTCGTGTC
GCACTGAATAAACCGGATGTCGCAGGCTTGTACCATTTGGTAGCCAGTGGTACCA
CAACCTGGTACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGCAT
TCCCCTTGCACTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAACAACAGCCTATCCTACACCA
GCTCGTCGTCCACATAACTCTCGCCTTAATACAGAAAAATTTCAGCAGAACTTTG
CGCTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTTGGCGTGAAACGAATGCTCAATGAATTATT
TACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTGATGGTGGAGCAAGA
TGAATTAAAAGGAATGATGAAATGAAAATGCGTAAAGGTATTATTTTAGCGGGT
GGTTCTGGTACACGTCTTTATCCTGTGACTATGGCTGTCAGTAAACAGCTATTACC
TATTTATGATAAACCGATGATCTATTACCCGCTCTCTACACTGATGTTGGCGGGT
ATTCGCGATATTTTGATTATCAGTACACCTCAGGATACTCCTCGTTTTCAACAATT
GCTGGGTGACGGTAGCCAGTGGGGCCTGAATCTTCAGTACAAAGTGCAACCTAG
CCCAGATGGCCTCGCGCAGGCATTTATCATCGGTGAAGAGTTTATTGGTGGTGAT
GATTGTGCTTTGGTTCTTGGTGATAATATCTTTTACGGTCACGATCTGCCGAAGCT
AATGGAGGCCGCTGTTAACAAAGAAAGTGGTGCAACGGTATTTGCCTATCACGTT
AATGATCCAGAACGCTATGGTGTCGTTGAGTTTGATAAAAACGGTACGGCAATC
AGTCTGGAAGAAAAACCGTTAGAACCAAAGAGTAATTACGCCGTTACAGGTCTG
TACTTTTATGATAACGACGTGGTTCAGATGGCGAAAAACTTGAAGCCGTCTGCAC
GTGGTGAGTTAGAAATTACAGATATTAACCGTATTTATCTTGAGCAGGGACGTCT
GTCTGTCGCGATGATGGGGCGTGGCTACGCGTGGCTGGACACGGGGACTCATCA
GAGTCTGATAGAAGCAAGTAATTTTATTGCGACAATTGAAGAGCGCCAGGGATT

GAAGGTTTCCTGTCCTGAAGAGATTGCATTTCGTAAAGGTTTTATTGATGTTGAG
CAAGTAAGAAAATTAGCTGTACCACTAATAAAGAATAATTATGGGCAGTATCTTT
ATAAAATGACGAAGGATTCAAATTAATGAATGTGATTAGAACTGAAATTGAAGA
TGTGCTAATTCTGGAGCCAAGAGTATTTGGTGATGATAGAGGTTTCTTTTATGAG
AGCTTTAATCAATCAGCATTTGAACATATTCTAGGCTATCCGGTCAGCTTTGTTCA
AGACAATCACTCACGTTCATCAAAAAATGTACTCAGAGGCCTTCACTTTCAACGC
GGCGAGTACGCACAAGATAAACTTGTACGCTGCACTCATGGAGCAGTTTTTGATG
TTGCTGTTGATATTCGACCCAATTCGGTATCCTTTGGTAAATGGGTTGGTGTTCTG
CTTTCAGCTGATAATAAGCAGCAGTTGTGGATACCAAAAGGGTTTGCTCATGGCT
TTTTGGTTCTGTCTGATATCGCTGAATTTCAATATAAAACTACAAACTATTATCAT
CCTGAAAGCGATTGTGGAATATGTTGGAATGATGAACGCATTGCAATTGATTGGC
CCCAAACATCAGGGTTAATCCTTTCGCCAAAAGATGAAAGGCTCTTTACGTTAGA
TGAGCTTATCAGATTAAAATTAATTGCATGAGGCCGGCCTTAAGGAGGACTAGTC
CCGGCGCGCCATGAGTTTAATCAAAAACAGTTTTTGGAACCTTTGCGGGTATGTA
CTTCCAGCTATTGTGACACTACCAGCTTTGGGTATTATGGGGCGAAAATTAGGCC
CAGAATTATTTGGTGTATTCACTTTGGCATTAGCTGTTGTGGGTTATGCAAGCATT
TTTGATGCAGGCCTTACTCGCGCAGTGATACGAGAAGTCGCAATTGAAAAAGAT
AATGAAGAAAATAAGTTGAAAATTATTTCTTCAGCGACAGTTGTAATTATTTATT
TGAGTTTGGCCGCCTCACTCTTATTATTTTTTTTAGTGGTCATATCGCATTGCTAC
TGAACATTAGTGAGACTTTTTTTCATAATGTAAGTGTCTCGCTTAAAATTCTCGCA
GCATCCATACCATTATTTTTGATTACTCAAATATGGTTGTCAATTTTAGAAGGTGA
AGAAAGATTTGGTTTACTTAATATCTACAAATCAATTACGGGAGTGATATTAGCA
ATCTCACCGGCATTATTTATACTTATTAAACCCTCTTTGATGTATGCGATAATAGG
CTTAGTTCTAGCAAGGTTTTTATGTTTTATTTTGGCTTTTATAATTTGTCACGATAA
AGTGCTTAAAGCTAAACTAACAATCGATATACCAACAATTAAAAGATTGTTTATG
TTCGGTGGTTGGATTACAGTAAGTAATATCATCAGCCCTGTGCTATCATATTTTGA
TAGGTTTATTGTTTCAAATCAACTTGGGGCTGCTAATGTTGCTTTTTATACTGCAC
CATCAGAAATTATTTCTCGGCTTAGTATAATTCCAGGTGCGTTTTCAAGAGCCTTA
TTTCCAAGATTAGCTAATGCAAATAATTCCGCTGAAAGATATAAAACGAAAAGA
TTAATTACAATTTCACTTTTAATAATCATCACCCCTATTTTTTGTATTGGCGTGTTA
TTTTCAGAGAAGATAATGGTTTTATGGATGGGGGCATCATTTTTTGGTGAGCCTG
GTTTGGTATTATCAATATTACTGATTGGCTTTATTTTTAATGGATTGGCACAAGTA
CCATTTGCCAGTATTCAATCCCGAGGTCATGCTAAGATAACTGCATTTGTTCATCT
CTTAGAGTTGTTTCCTTATTTATTACTTTTATTTTACCTCATAAAAGCACATGGGG

TTGTTGGCGCGGGTATTGCGTGGTCAGTGAGGATGATAGTAGATTATATAGCATT
AAGTCTTTTGGACGGTAAGTATATTAATAAATAAAATTCAAAATGCAAGTTAATA
ACTCATGGCTTTATTTGGGTAGGTGACAATTTATAATGATATATATATTAACTTTA
ACTCTTCTTCTAGTTATAGCCATAATGTTTTCTCTTCTCGGCACAAAAAGTAGGAT
5 CACATCTCCATTACCTTTGCATTTTTTACCATGGTTACTAACTTTAATTGTCGGGA
TAAGTAATTACGATCAATTTTACGAGTTTAATGAAAGAAGCTTTTACTCTTTGTTG
ATTTGGTTTACAGTTATTTTTATATTTTATTTCATAGGGGAACTGGTTAATTATAA
ACGTGAAAATATAAATGTTTATTATGGTCTTTCACATATTAAATATGAATGTAAA
AAATATTGGATCATTGTCATCCCAATTTCATTATATACCATTTTCGAAATATATAT
10 GGTTGGTATGGGGGGAGCAGATGGATTCTTTCTCAATTTACGTCTTGCAAATACA
TTGGAGGGCTATACGGGTAAAAAATTTATCTTAATGCCTGCTGTATATCCTCTAA
TGATGGCTATGTTCGCAATTGTTTGTCTAACAAAAACTTCCAAATTAAATAAATA
CTCCATTTATTTCTGGATGTTTTTGTATTGTATTGGCACAATGGGAAAATTTTCAA
TATTAACGCCAATATTGACATATTTAATTATTTATGACTTCAAACATAGATTAAA
15 AGTAAAAAAAACAATAAAGTTTACATTGTTGATAATTATATTAGCTTTAACTTTG
CATTTTACACGTATGGCTGAGAATGACCACTCAACATTTTTATCTATTTTAGGGCT
CTATATTTATTCACCAATAATTGCTTTAGGCCAGTTGAATGAAGTAAATAGTAGT
CATTTTGGTGAGTATACGTTTAGATTCATATATGCTATAACTAATAAAATTGGCCT
TATTAAAGAATTGCCAGTAAATACTATTCTTGACTATTCATACGTTCCTGTACCAA
20 CAAATGTATATACTGCACTTCAACCATTTTACCAGGATTTTGGTTATACTGGCATC
ATATTTGGAGCAGTATTATACGGACTAATATATGTGAGTTTATACACGGCCGGTG
TTCGTGGAAATAATACACAGGCATTACTGATTTACGCATTGTTTTCAGTTAGCAG
TGCAACGGCTTTCTTCGCTGAAACGCTAGTAACGAATTTAGCTGGAAATGTGATG
TTAGTATTATGTACCATCTTACTATGGCGATTTACAGTAATATGCAAACCAGTAC
25 AGTAACCATTCTAATGGCCACCTACAATGGCGAGGCCTTCATCAAAAATCAGATT
TTGTCACTACAACAACAAACATTTTCTAACTGGCGGTTATTTATTCAGGATGATG
GGTCTACAGACAATACTATATCTATAATAAAAAACTTCCAAAAATCTGACTCCAG
AATTCGGCTAGTTGATGATAATTTGAAAGGTCAAGGTGCAGGAAAAAATTTTTTA
TCGCTGATAAAGTACAGCGAGACAGATTATACAATTTATTGTGACCAAGATGATA
30 TTTGGTTAGAAAACAAAATATTTGAATTAGTAAAGTATGCAAATGAAATTAAATT
GAATGTATCAGATGCGCCTTCGCTAGTTTATGCTGATGGCTATGCTTATATGGAT
GGTGAGGGTACAATCGATTTTTCTGGGATATCTAACAATCATGCTGATCAATTAA
AGGATTTTCTTTTTTTTAATGGTGGATACCAAGGATGTTCTATTATGTTCAATCGT
GCAATGACCAAATTTCTTCTGAATTATCGAGGATTTGTATATCTACATGACGATA

TCACAACATTAGCTGCATACGCTCTTGGTAAAGTTTATTTTCTCCCGAAATACCTT
ATGTTATATAGACAGCACACGAATGCGGTAACTGGTATCAAAACATTCCGCAAT
GGATTGACTTCTAAATTTAAATCACCAGTAAACTATCTTTTATCACGAAAACATT
ATCAGGTAAAAAAATCTTTTTTTGAATGTAACAGCTCTATCTTATCAGAGACGAA
TAAAAAAGTTTTTTTGGATTTTATTTCATTTTGTGAATCAAATAATAAATTTACAG
ATTTTTTTAAGTTATGGCGAGGTGGGTTTAGATTAAATAACAGTAGAACTAAATT
ATTATTAAAATTCTTAATACGGAGAAAATTTAGCGAATGATTTCAATACTTACAC
CTACTTTTAATCGGCAACATACTTTATCAAGGCTATTCAATTCTCTTATATTACAA
ACTGATAAAGATTTTGAGTGGATAATAATTGATGATGGTAGTATAGATGCAACA
GCGGTACTTGTAGAAGATTTTAGAAAAAAATGTGATTTTGACTTGATTTATTGCT
ATCAGGAAAATAATGGTAAGCCCATGGCTTTAAACGCTGGTGTTAAAGCTTGTAG
AGGCGATTATATCTTTATTGTTGACAGTGATGATGCACTAACTCCCGATGCCATA
AAATTAATTAAAGAATCAATACATGATTGCTTATCTGAGAAGGAAAGTTTCAGCG
GAGTCGGTTTTAGAAAAGCATATATAAAAGGGGGGATTATTGGTAATGATTTAA
ATAATTCTTCAGAACATATATACTATTTAAATGCGACTGAGATTAGCAATTTAAT
AAATGGTGATGTTGCATATTGTTTTAAAAAAGAAAGTTTGGTAAAAAATCCATTC
CCCCGTATAGAAGATGAAAAATTTGTTCCAGAATTATATATTTGGAATAAAATAA
CTGACAAGGCGAAGATTCGATTTAACATAAGCAAAGTTATATATCTTTGTGAGTA
TCTTGATGATGGTCTTTCTAAAAATTTCCATAACCAGCTTAAAAAATACCCAAAG
GGGTTTAAGATTTATTACAAAGATCAAAGAAAACGAGAGAAAACTTATATAAAA
AAAACAAAGATGCTAATTAGATATTTGCAATGTTGTTATTATGAGAAAATAAAAT
GAAAATACTATTTGTCATTACAGGTTTAGGCCTTGGAGGTGCTGAGAAGCAGGTT
TGTCTTTTAGCTGATAAATTAAGTTTAAGCGGGCACCATGTAAAGATTATTTCAC
TTGGACATATGTCTAATAATAAAGTCTTTCCTAGCGAAAATAATGTTAATGTCAT
TAATGTAAATATGTCAAAAAACATTTCTGGAGTTATAAAAGGTTGTGTCAGAATT
AGAGATGTTATAGCTAATTTCAAACCAGACATTGTACACAGTCATATGTTTCATG
CAAACATTATCACTAGATTGTCTGTAATTGGAATCAAAAACAGACCTGGTATTAT
ATCAACTGCACATAATAAAAATGAAGGTGGGTATTTCAGAATGCTCACATATAG
AATAACCGATTGTTTAAGTGATTGTTGTACAAATGTTAGCAAAGAAGCAGTGGAT
GAGTTTTTACGGATAAAAGCCTTTAATCCCGCTAAAGCAATTACTATGTATAATG
GGATAGATACCAATAAATTTAAATTTGATTTATTGGCAAGGAGGGAAATTCGAG
ACGGTATTAATATAAAAAATGATGATATATTATTACTTGCTGCAGGTCGTTTAAC
GTTAGCTAAAGATTATCCTAATTTATTGAATGCAATGACTCTGCTTCCTGAACACT
TTAAACTTATTATTATTGGTGATGGTGAATTGCGTGACGAAATTAATATGCTTAT

AAAAAAATTGCAATTATCTAATAGGGTGTCCTTGTTGGGAGTTAAAAAAAATATT
GCTCCCTATTTTTCTGCATGTGATATTTTTGTTCTCTCTTCTCGTTGGGAAGGATTT
GGATTAGTCGTGGCAGAAGCTATGTCATGTGAGCGAATTGTTGTTGGCACGGATT
CAGGGGGAGTAAGAGAAGTTATTGGTGACGATGATTTTCTTGTACCCATATCTGA
TTCAACACAACTTGCAAGCAAAATTGAAAAATTGTCTTTGAGCCAGATACGTGAT
CACATTGGTTTTCGGAATCGTGAGCGTATTTTAAAAAATTTCTCAATAGATACTA
TTATTATGCAGTGGCAAGAACTCTATGGAACTATAATTTGCTCAAAACATGAAAG
GTAGATTTATATTTGGAACGTGTCTTTTGTTTGAATTTAATTCAATCTCAATTGAG
ATTTTTGTATTTCAAAAATACCATCATAGCTAACGATGATTGGTATTTATTTTAAG
ATGCTTTCTATAAATATATTGACGTTTTTAATGCGCCGAAACGATTGGGCTGGGA
ACAGAGAAGTAAAACTGTTTTGAGAATGAAGAGTTTTTGAGATGTTTATGGATAT
TAAAAATTGATCCAGTGAATTAATTATTTATAATAAATCAAGATTTAATGTTAAT
AAATGATAATCTTTTCTGACACTCATATTAATTATGAGTGGTACGTTTGGTAAAC
GGTAAACTATTATATGACAGCTAGAACAACTAAAGTTTTGCACTTACAATTACTC
CCACTCTTAAGTGGCGTTCAAAGGGTAACATTAAACGAAATTAGTGCGTTATATA
CTGATTATGATTATACACTAGTTTGCTCAAAAAAAGGTCCACTAACAAAAGCATT
GCTGGAATATGATGTCGATTGTCATTGTATCCCCGAACTTACGAGAGAAATTACC
GTAAAGAATGATTTTAAAGCATTGTTCAAGCTTTATAAGTTCATAAAAAAAGAAA
AATTTGACATTGTGCATACACATTCTTCAAAAACAGGTATTTTGGGGCGAGTTGC
TGCCAAATTAGCACGTGTTGGAAAGGTGATCCACACTGTACATGGTTTTTCTTTTC
CAGCCGCATCTAGTAAAAAAAGTTATTACCTTTATTTTTTCATGGAATGGATAGC
AAAGTTCTTTACGGATAAGTTAATCGTCTTGAATGTAGATGATGAATATATAGCA
ATAAACAAATTAAAATTCAAGCGGGATAAAGTTTTTTTAATTCCTAATGGAGTAG
ACACTGATAAGTTTTCTCCTTTAGAAAATAAAATTTATAGTAGCACCTTGAATCT
AGTAATGGTTGGTAGATTATCCAAGCAAAAAGATCCTGAGACATTATTGCTTGCT
GTTGAAAAACTGCTGAATGAAAATGTTAATGTTAAGCTGACACTTGTAGGAGAT
GGTGAACTAAAAGAACAGTTAGAAAGCAGGTTCAAACGGCAAGATGGACGTATA
ATTTTTCATGGATGGTCAGATAACATTGTTAATATTTTAAAAGTTAATGATCTTTT
TATATTACCTTCTCTTTGGGAGGGTATGCCATTAGCAATTTTAGAAGCATTGAGCT
GTGGACTTCCATGTATAGTCACTAATATTCCAGGTAATAATAGCTTAATAGAAGA
TGGCTATAATGGTTGTTTGTTTGAAATTAGAGATTGTCAGTTATTATCTCAAAAA
ATCATGTCATATGTTGGTAAGCCAGAACTGATTGCACAGCAATCTACCAATGCAC
GATCATTTATTCTGAAAAATTATGGATTAGTTAAAAGAAATAATAAGGTCAGACA
GCTATATGATAATTAAGAGCTCGGTACCCGGGCCTAGGGTGTAGGCTGGAGCTG

CTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGA
GGATATTCATATCCGTCGACGGCGGCCGCCCTGCAGGCATGCAAGCTTGATCCAT
ATGGATCGCTAGCTTAATTAAATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCT
ATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTCCAGGCCGCGAG
CATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGAT
CGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCGCTCAACATCGAAAG
CCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGAAGTG
ATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAAACTGGTTCCTTACTATACGGTGAAAGAGTTTG
TCGAATCTCTGGAAACGCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCAGGTGCAGG
CACGGATGCTGCTATTGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATC
ATTGATGGTGGTAACACCTTCTTCCAGGACACTATTCGTCGTAATCGTGAGCTTTC
AGCAGAGGGCTTTAACTTCATCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGC
GCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTGGTA
GCACCGATCCTGACCAAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTT
ACCTATATTGGTGCCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTTCACAACGGTA
TTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGG
CCTGAACCTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGAATAACGG
TGAACTGAGCAGTTACCTGATCGACATCACCAAAGATATCTTCACCAAAAAAGA
TGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGG
TACGGGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGCTGTCGCT
GATTACCGAGTCTGTGTTTGCACGTTATATCTCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTTG
CCGCATCTAAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCGACAAGGCTG
AGTTCATCGAAAAAGTTCGTCGTGCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGC
CCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGCTGCGTCTGAAGAGTACAACTGGGATCTGAAC
TACGGCGAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCC
TGCAAAAAATCACCGATGCTTATGCCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCT
GGCTCCGTACTTCAAGCAAATTGCCGATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGATGTC
GTTGCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCCGGTTCCGACCTTCTCCGCAGCGGTTG
CCTATTACGACAGCTACCGTGCTGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACA
GCGTGACTATTTTGGTGCGCATACTTATAAGCGTATTGATAAAGAAGGTGTGTTC
CATACCGAATGGCTGGATTAA

SEQ ID NO: 18 (пример нуклеотидной последовательности локуса rfb O25B – штамма-продуцента O25B-EPA stGVXN4459)

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGC
CTGCCACTAAGGCGATACCCAAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGA
TTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAAGAAATCCTCCTGGT
AACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTA
GAATCACTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCC
ATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATGAACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTT
TAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCATTTGTCGT
GGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAA
CCTTGCTGCCATGATTGCACGTTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCA
AAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCCGTCATCCAGACTAAAGAGCCGC
TGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGATC
AGCCGCAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTCGCTATGTGCTTTCTGC
CGATATTTGGCCGGAACTGGAACGTACTCAGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAG
CTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCCGTTGATGCAATGCTGA
TGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTG
TGAAGTATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTG
AGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAATCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAA
AATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAATCTTCCTG
CCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATT
CAAAGTTTTCCAGGATTTTCCTTGTTTCCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCG
TTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTAACGCTCGTCACATCATAGGCATG
CATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATACCTC
TATTAATCAAACTGAGAGCCGCTTATTTCACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAA
TAAATTAAGCTAGCAGTGAAGATACTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTGGTT
CTGCTGTTGTTCGTCACATAATAAATAATACGCAAGATAGTGTTGTTAATGTCGA
TAAATTAACATACGCCGGAAACCTGGAATCACTTGCAGATGTTTCTGATTCTGAA
CGCTATTTCTTTGAACATGCGGATATTTGTGATGCAGCTGCAATGGCACGGATTT
TTGCTCAGCATCAGCCGGATGCAGTGATGCACCTGGCAGCTGAAAGCCATGTTGA
CCGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTGGGTACTTAT
GTCCTTTTAGAAGCGGCTCGGAATTATTGGTCTGGTCTGGATGATGAAAAGAAAA
AAAACTTCCGTTTTCATCATATTTCTACTGATGAGGTGTATGGTGACTTACCCCAT
CCGGATGAAGTAAATAGCAATGAAACGTTGCCGCTATTTACGGAAACGACAGCA
TACGCGCCAAGTAGTCCATATTCTGCTTCTAAAGCTTCCAGCGATCATTTGGTTCG
CGCATGGAAACGTACTTATGGTTTACCGACCATTGTGACTAATTGCTCGAACAAC

TATGGTCCTTATCATTTCCCGGAAAAGCTTATTCCACTGGTTATTCTTAATTCACT
GGAAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAAAGGAGATCAGATCCGCGACTGGTT
GTATGTAGAGGATCATGCTCGAGCGTTATATACCGTCGTAACCGAAGGTAAAGC
GGGCGAAACTTATAACATTGGTGGACACAACGAAAAGAAAAACATCGACGTAGT
GTTCACTATTTGTGATTTGTTGGATGAGATAGTCCCGAAAGAGAAATCTTACCGC
GAGCAAATTACTTATGTTACCGATCGTCCGGGACACGATCGCCGTTATGCGATTG
ATGCTGAGAAGATTGGTCGCGAATTGGGATGGAAACCACAGGAAACGTTTGAGA
GTGGGATTCGTAAAACGGTGGAATGGTACCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATA
ATGTGAAAAGTGGTGCCTATCAATCGTGGATTGAACAGAACTATGAGGGCCGCC
AGTAATGAATATCCTCCTTTTTGGCAAAACAGGGCAGGTAGGTTGGGAACTACA
GCGTGCTCTGGCACCTCTGGGTAATTTGATTGCTCTTGATGTTCACTCCACTGATT
ACTGTGGTGATTTTAGTAATCCTGAAGGTGTAGCTGAAACCGTAAGAAGCATTCG
GCCTGATATTATTGTCAACGCAGCCGCTCACACCGCAGTAGACAAAGCAGAATC
AGAACCGAAGTTTGCACAATTACTGAACGCGACGAGTGTCGAAGCGATCGCGAA
AGCAGCCAATGAAGTCGGCGCCTGGGTTATTCACTACTCTACTGACTACGTATTT
CCGGGGACCGGTGAAATACCATGGCAGGAGGAGGATGCAACCGCACCGCTAAAT
GTTTACGGTGAAACCAAGTTAGCGGGAGAAAAAGCATTACAAGAGCATTGTGCG
AAGCACCTTATTTTCCGGACCAGCTGGGTCTATGCAGGTAAAGGAAATAACTTCG
CCAAAACAATGTTGCGTCTGGCAAAAGAGCGTGAAGAATTAGCCGTTATTAATG
ATCAGTTTGGTGCGCCAACTGGCGCAGAGTTACTGGCTGATTGTACGGCACATGC
TATTCGTGTGGCACTGAATAAACCGGAAGTCGCAGGCTTGTACCATCTGGTAGCT
AGTGGTACCACAACGTGGCACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCA
AAGCAGGCATTCCCCTTGCACTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAACAACAGCCT
ATCCTACACCAGCTCGTCGTCCACATAACTCTCGCCTTAATACAGAAAAATTTCA
GCAGAACTTTGCGCTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTTGGCGTGAAACGAATGCTT
AACGAATTATTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTAATGG
TGGAGCAAGATGTATTAAAAGGAATGATGAAATGAAAACGCGTAAAGGTATTAT
TTTGGCGGGTGGTTCTGGTACTCGTCTTTATCCTGTGACGATGGCCGTCAGTAAA
CAGCTGTTACCGATTTATGATAAACCGATGATCTATTACCCGCTCTCTACACTGAT
GTTAGCGGGTATTCGCGATATTCTGATTATCAGTACACCACAGGATACTCCTCGT
TTTCAACAACTGCTGGGTGACGGGAGCCAGTGGGGCCTGAATCTTCAGTACAAA
GTGCAACCGAGTCCGGATGGTCTTGCGCAGGCGTTTATTATCGGTGAAGAGTTTA
TTGGTGGTGATGATTGTGCTTTGGTACTTGGTGATAATATCTTCTACGGCCACGAC
CTGCCGAAGTTAATGGACGTAGCTGTTAACAAAGAAAGTGGTGCAACGGTATTT

GCCTATCACGTTAATGATCCTGAACGTTATGGTGTCGTGGAGTTTGATAATAACG
GTACTGCAATTAGCCTGGAAGAAAAACCGCTGGAACCAAAAAGTAACTATGCGG
TTACTGGGCTTTATTTCTATGACAATGACGTTGTGGAAATGGCGAAAAACCTTAA
GCCTTCTGCCCGAGGTGAACTGGAAATTACCGATATTAACCGTATTTATATGGAA
CAAGGACGTTTGTCTGTCGCTATGATGGGGCGTGGCTATGCATGGCTGGATACAG
GGACGCATCAAAGTCTTATTGAAGCAAGCAACTTCATTGCCACCATTGAAGAGC
GCCAGGGACTAAAGGTTTCCTGTCCGGAAGAAATTGCTTATCGTAAAGGGTTTAT
TGATGCTGAGCAGGTAAAAGTATTAGCCGAACCGTTGAAGAAAAATGCTTATGG
TCAGTATCTGCTCAAAATGATTAAAGGTTATTAATAAGATGAACGTAATTAAAAC
TGAAATTCCTGATGTGCTGATTTTTGAACCAAAAGTTTTTGGGGATGAACGTGGC
TTCTTTTTTGAGAGTTTTAATCAGAGGATTTTTGAAGAAGCAGTAGGTCGTAAGG
TTGAGTTTGTTCAGGATAACCATTCTAAGTCCAGTAAAGGTGTTTTACGTGGTCTT
CATTATCAGTTAGAACCTTATGCTCAAGGAAAACTGGTGCGCTGTGTTGTTGGCG
AGGTTTTTGATGTTGCGGTTGATATTCGTAAATCGTCACCTACATTTGGGAAATG
GGTTGGGGTGAATTTGTCTGCTGAGAATAAGCGTCAGTTGTGGATTCCTGAGGGA
TTTGCACATGGTTTTTTGGTGCTGAGTGATTTAGCAGAAGTTTTATATAAAACGA
ATCAATATTATGCTCCATCACATGAAAAAAATATTATATGGAATGACCTCTTGCT
TAATATTAAATGGCCGAGCACAGCACTGATCACTCTGTCTGATAAGGATGCAAAT
GGGGAAAGATTTGAACTAAGTGAGTTTTGAAATGTCTCTCTTAAAACATAGTATA
TGGAATGTTGCGGGCTACTTTATACCAACATTAATTGCAATTCCCGCCTTTGGATT
AATTGCGAGGAAAATTGGTGTAGAACTATTTGGTTTGTATACGTTAGCAATGATT
TTTATAGGGTATGCAAGTATATTTGATGCTGGGTTAACAAGAGCTGTTGTGCGTG
AAATAGCATTACTAAAAAACAGAGTGGACGATTGTAATACGATAATAGTAACTT
CTATTATCGCTGTGATATTTTTAGGGTTTATCGGAGGCGGGGGAGTGTTTCTGCTT
AAAGGCGATATTATTGAACTGTTAAATATCTCACCAATATATTACGCCGATTCGA
TAAAGTCTCTAGTATTATTATCATCTCTGATACCTGTATTCTTAGTCACGCAAATA
CTATTAGCAGAGCTTGAGGGTCGGGAATATTTTGGGATTCTAAATATACAAAAAA
GTGTAGGGAATTCTTTAATTGCAGGGTTACCTGCATTATTTGTTTTAATTAATCAA
ACGCTTTTTTCTGCAATTATTGGTGTAGCGATTGCAAGAGTTATATGCTTGTGGTT
AAGCTACATTATGAGCAGGGAAAGAATAACTATCGATATCTCATTTTTTTCAATA
ACTGTTTTAAAGCGGTTATTTAGATATGGCGGGTGGGTAACTATAAGTAACATAA
TATCTCCTATATTAGCGAGTATGGATAGATTTATTCTATCCCATATCCAGGGAGC
ATCAAAAATATCATTCTATACAGTCCCTAATGAGCTGGTAACTAGGCTTGGAATA
GTTCCAGGCTCTCTTGGGAAAGCTGTTTTTCCAAAATTAAGTCATGCAAGGAATT

TTACAGCGTCATATGCAGAGCAAAAAAAAGCTTATATATTAATGACTGTCATTGT
AATGCCTTTGGTTTTATTTGTATATTATTACGCAAAGTTTATTTTAACATTGTGGA
TGGGGGCTGAGTATGCAGGGATTTCGGTCGAAATATTACGGATTATGCTTATAGG
GTATATTTTTAACTGTTATTCACAAATCTCTTTTGCCAACATACAGGCCTTTGGAA
AAGCAAAATACACTGCATACATCCATATGATGGAATTTATTCCTTATTTGATAAT
GTTATATATAATTTCAAAGGAATATGGGGTTATTGGTGTTGCGTGGTTATGGACA
ATTCGAGTAATAATTGATTTTTTGATGCTTTTATATATGAGTTATCGTTGTAATAA
TCTTATGAAAAAAGGGTAGCCTGATGATATATATTGTGGTATTAAATTGGAATGG
GGCTATAGATACCATTAATTGTGTTAAAAGTTTAATGGATTTAAATGTTAGCGAT
TATAAAATTATCATTGTTGATAACTGTTCTATGGATAACTCATATGATACTATAA
AAGAAAATCTTAATTCATTATATATTGCTGATAAAAGTATCATTGAGGTGAAGTA
TGAGGATAGAAATAAATATAAAACCTTAGAAAACGATAAAATCATATTAATACA
ATCTCCGCAAAATAATGGGTACGCAAGTGGTAATAATATTGGCATAGAGTTCGCT
CTTAATCAGGAGAATATGAAATACGTCTGGGTTCTGAATAATGATACTGAAGTGG
ATAAAGAGGCTTTAACTCATTTAATTAGTAAATGTGATTCAGATAAAAGTATAGG
GATTTGCGGTTCTCGTTTAGTCTATTTTGCCGACAGAGAGATGCAGCAAGGACTA
GGTGGGGTGCATAACAAATGGTTATGCACTACAAAAAATTATGAAATGGGAAGA
TTAGTTTCCAAAAAATATGATGATGAAGTCATTAGTAATGATATAGATTATATAA
TTGGCGCATCGATGTTTTTCTCTAGAGAATGTTTGGAAACAGTTGGATTGATGAA
TGAAGAATATTTTTTATACTATGAAGAGTTAGATATTTGCCTCAGAGCAAAAGCA
AAGAACTTTAAATTAGGTATTTGCTCAGAAAGTTTGGTTTATCATAAAATAGGTG
CAAGTACTGATGGGGGAAAGAGCATGATGGCTGATCTTTGCTCAATAAAAAATA
GGCTGGTCATTACAGAAAGGTTTTATCCCCAATATTATTGGACGGTATGGTTGTC
ACTTTTTGTTGTAGCATTTAACCGTGCTAGAAGAGGTGAGTTTAATAAGATGAAA
AGATGTTTGAATGTTATGTTTAACTTCAAACGAAACAAAGGTAGCAAATGCCATT
AGAATATGCACTTAATCATGGTGTTAATAAATCTATAGTTTGATATGTTATTAAA
GGGTATTTAATGAAAGTGGCTTTTTTATCTGCTTATGATCCACTATCTACATCCAG
TTGGTCTGGCACACCTTATTATATGCTAAAGGCATTATCGAAGAGAAATATTTCC
ATTGAAATATTAGGACCGGTAAATAGCTATATGATATACATGTTAAAAGTATATA
AATTAATATTAAGGTGTTTCGGAAAAGAATATGATTATAGTCATTCGAAGTTGCT
TTCCAGGTATTACGGTAGAATATTCGGTAGGAAATTAAAAAAAATTGATGGTTTG
GATTTTATTATCGCACCTGCAGGTTCCTCACAAATTGCTTTTTTAAAAACAACCAT
ACCAATAATATATCTATCGGATACAACATATGATCAATTAAAAAGCTATTATCCG
AATTTAAATAAAAAAACAATTATAAATGATGAGGATGCAAGTTTAATCGAACGC

AAGGCTATTGAAAAAGCAACAGTAGTATCTTTCCCATCTAAATGGGCAATGGATT
TTTGCAGGAATTATTACAGATTAGATTTTGATAAATTAGTTGAAATACCATGGGG
GGCTAATTTATTTGATGATATTCACTTTGCTAATAAAAATATAATTCAAAAGAAT
AGTTATACTTGTCTTTTCTTGGGAGTTGATTGGGAAAGAAAAGGTGGGAAAACAG
5 CCTTGAAAGCAATTGAATATGTAAGGCAGTTATATGGGATCGATGTTAGACTAAA
AATTTGTGGATGTACTCCGAATCAAAAGATTTTACCTACTTGGGTTGAATTAATT
GATAAAGTAGATAAAAATAACGTTGACGAATATCAGAAATTCATCGATGTGTTA
TCTAACGCTGATATACTTCTTTTACCAACCATTGCTGAATGTTATGGAATGGTATT
TTGTGAAGCTGCTGCTTTTGGATTGCCTGTTGTCGCTACAGATACAGGTGGAGTC
10 AGTTCTATAGTTATCAACGAAAGGACGGGGATATTAATTAAAGACCCGTTAGACT
ATAAGCACTTTGGAAATGCAATTCATAAAATAATTAGTTCCGTAGAGACTTATCA
AAACTACTCCCAAAACGCAAGAATTAGATATAATAATATATTGCATTGGGACAA
TTGGGCTAAAAAGATAATTGAGATTATGTATGAGCATAAGAATAGAAGAATCAA
ATAGCACAAAAAGAATTATATGTTTATTTATACTTTTTCTTGTTTTCCCTGATTTTT
15 TGTTTTATACATTAGGGGTTGATAATTTTAGCATTTCAACGATAATCTCAATTACA
TTGCTTTTTGTTTTTTTAAGAGCTAAAAATATTTGCAAAGATAATTTTCTAATAAT
AGTAGCGTTATTCATATTGTTGTGTTTTAACTGTTTGTTAAGTATGCTATTTAATA
TTGAACAGGCTTTAACATTTAAAGTTGTACTTTCAATATATAGCATCTTAATAATG
GCATACGTCTCCTCTTGTTATGCACAGACGTTGTGGTTATGTTCTGAAGAAATACT
20 TAAGAGATCCGTCTTTTATTTGTTCGCATTTCTTTGCCTTATTGGCATTATAAGTA
TTCTTTTACAGAAGACTGAGATTATACATGATAAAAGTATGATTCTTTTTCCTGAA
CCATCAGCATTTGCATTGGTTTTTATACCTATCTTTTCATTTTGTTTATACTATACA
AGAGGGGGGGGGCTACTATTGCTCTATATATTATCTTTGGGTATTGCGTTAGGTA
TCCAGAATTTAACAATGTTGGTAGGCATTGTGATTAGTGTTTTTGTGATGAAAAA
25 AATAACTATAAGGCAAACTATTGTTATACTTTTGGGGGCATGGATTTTTTCCATG
ATATTAAGTGATTTAGACATTTCTTACTATACATCGCGGCTTGATTTTAAAAATAC
TACGAACCTATCAGTGCTTGTATATCTTTCAGGAATTGAAAGAGCTTTCTTGAATT
TTATTACAAGTTATGGTCTTGGTATTGGTTTTCAACAAATGGGAGTGAATGGGGA
GATAGGAATATATCAACAAATTTTAGCTGAACTTGATGCCCCTATGTTAAATATA
30 TACGATGGCTCATTTATTTCTTCTAAGTTAATATCTGAGTTTGGGGTTATTGGTGC
ATTAATGTGTATTTTCTATTTTTTTTATTTTTCCCGATTTTATCTGCGTTTCAAAAA
AAGTAAGAGATATTCACCGCAGTATATTTTAGCATATAGCTTCTACATGTGTTTCT
TCATCCCTCTTTTTATACGTGGTGCTGGTTATATAAACCCCTATGTGTTTATGTTA
TTTTCATCAATATTTTTGTGCAAATATCACGCTAAAAATATCTTGATGAAATCTAA

TGTCCAGATAGCTATATAATAGTAGATTATATTATCATTATCACGTAAATTACAT
ATTAATAGCATATATGATAACTAGGACATAAATAATGTGCATTAAAAAAAAACT
TAAGTTAATTAAACGATATGGCCTTTATGGTGGTCTTAGGCTTCTTAAAGATATA
TTCTTAACAAAATTTTTATTTTGTTCAAATGTTAGGATTATTAGATTTCCATGTTA
5 TATTAGAAAAGATGGAAGTGTTAGTTTTGGAAAAGGTTTTACATCAGGTGTAGGA
TTACGAGTTGATGCATTTATGGATGCCGTAGTTTCCATTGGAGAAAATGTTCAAA
TTAATGACTATGTTCACATCGCGGCTATTAATAATGTCATTATTGGTAGAGATAC
ATTAATAGCAAGTAAAGTATTTATTAGTGATCATAATCATGGTATTTTTTCTAAAT
CCGATATCCATAGTTCACCAACTATTATTCCTTCGTCTAGGCCCCTTGAATCTGCA
10 CCTGTGTATATTGGAGAGCGTGTGTGGATTGGCGAAAATGTGACAATATTACCAG
GTGCGTGTATAGGTAATGGTGTAGTTATTGGCGCAAACAGTGTTGTTCGTGGTGA
GATTCCTAATAATGTGATCATTGCTGGTGTTCCAGCTAAAATTGTTAAAAAATAT
AACTATGAGCGTATGCAATGGGAAAGAATATAGTTGTAATATCGGCTGTTAATTT
TACAACCGGAGGCCCCTTTACCGTACTAAAAAATGTGCTTACAGCAACTAAAGAT
15 AGAGCCGAATGTAAATTTATTGCACTGGTTCATAGCTCTGCTGAACTAATGGAAT
TATTTCCGTGGGTTGAATTTATAGAGTATCCAGAAGTCAAGTCTTCGTGGGTTAA
AAGATTATATTTCGAATATATAACTTGCAATAGATTATCTAAGGTGATTAAGGCA
ACTCATTGGGTATGCTTACATGATATTACAGCAAATGTTAGTGTACCCTATAGAT
TTGTTTATTGCCACAATCCTGCACCGTTCTATAAATATTTAAGCTATCGAGATATT
20 ATAGGAGAACCTAAATTTTATCTTTTTTATCTTTTTTATGGGCTTTTATACAATAT
CAATATAAAAAAGAACACAGCAGTTTTTGTTCAGCAGCAGTGGCTAAAAAAAGA
ATTCGAAAAAAAATATAAGTTAAAGAATGTTGTTGTTAGTCGCCCTGAAGATATT
TGCCCTTTTGAAAGTGATGGTTTGGTAAGAAATAATAATAAAAAGGATGTGAGG
ATATTTTACCCAGCAGTGCCCCGTATATTTAAAAACTTTGAAGTTATCATACGTG
25 CTGCACAAATATTACAAGATAAAAATATTCATTTTTATCTTACTTTTGATGGTACT
GAAAATAAGTATGCAAAAAGAATATATAAATTAGCTTCCGAACTGAAAAATGTA
CATTTCCTCGGTTACCTTAATGCAACCGAGATGGTTAACTTTTATCAAGATTCAG
ATATTATTTGTTTCCCATCGAAACTAGAAACGTGGGGATTACCATTATCAGAAGC
TAAAACATACAAAAAATGGATATTTGCGGCAGACTTACCTTATGCTCATGAAGTT
30 TTATATAACTATTCAAAAACTAGATATTTTCCATTTGACGATGAGAAAATACTTG
TTCGCTACATATTAGAGTACACAAGTAAAAATATGCATGAAGATATAAAAAATA
GTAGGGTGAATTTTAATAATGATGCATTGACTGGTTTTGAACAGTTTATTGAATA
TATCCTCAAGGGGAACTGACGTGGTTTATATTATAATCGTTTCACATGGCCATGA
TGACTATATAGAAAATCTTTTATTAAATTTAAAGTTGCCCTCTGGAAGATTTAAA

ATAATAGTTCGTGATAACAAAAGTTCAATGGTTTTAAAAAAAACATGCGAAAAA
AATTGCGTAACCTATTTGCATGGAGGGCAATATGGATTTGGACATAATAATAACA
TAGCAGTGTCATATATAATTAATAACTTCATGATTATGAATAATGATTATTTTCTC
TTTCTTAACCCCGATGTATTCATAACCAGTGAAAGTTTGATTAATTATGTTGATTA
TATAATTAGTAATGATTATAAGTTTAGCACATTATGTCTTTATCGAGATTTTACTA
AAAGCAAACATGATTATTCAATACGGAGTTTTCCAACTTTATATGATTTTCTTTGT
TCTTTTTTATTGGGGGTGAATAAAAGTAAAATTAAGAAGGAAAATATACTTTCTG
ATACTGTAGTTGATTGGTGTGCTGGCTCATTTATGCTTATTCATGCTTTAAGTTTC
TTAAATGTGAATGGTTTTGATCAAAAATATTTTATGTATTGTGAAGATATTGACCT
TTGTATGCGTTTAAAATTAAGTGGAGTAGATCTTTACTATACTCCCCATTTTGATG
CTATTCATTATGCGCAGCATGAAAATAGAAGAATATTTACTAAAGCATTTCGATG
GCATATAAGGAGTATTACGCGCTACATATTACGGAAACCAATTCTTTCTTATAAA
AACTATAGAAAAATTACATCCGAACTGGTAAAGTGATTAAGGATCCGTGTAGGC
TGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGA
ACTAAGGAGGATATTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGC
TATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTCCAGGCCGCGA
GCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGA
TCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCGCTCAACATCGAAA
GCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGAAGT
GATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAAACTGGTTCCTTACTATACGGTGAAAGAGTTT
GTCGAATCTCTGGAAACGCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCAGGTGCAG
GCACGGATGCTGCTATTGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCAT
CATTGATGGTGGTAACACCTTCTTCCAGGACACTATTCGTCGTAATCGTGAGCTTT
CAGCAGAGGGCTTTAACTTCATCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGG
CGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTGGT
AGCACCGATCCTGACCAAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGT
TACCTATATTGGTGCCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTTCACAACGGT
ATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTG
GCCTGAACCTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGAATAACG
GTGAACTGAGCAGTTACCTGATCGACATCACCAAAGATATCTTCACCAAAAAAG
ATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAG
GTACCGGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGCTGTCGC
TGATTACCGAGTCTGTGTTTGCACGTTATATCTCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTT
GCCGCATCTAAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCGACAAGGCT

GAGTTCATCGAAAAAGTTCGTCGTGCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACG
CCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGCTGCGTCTGAAGAGTACAACTGGGATCTGAA
CTACGGCGAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTC
CTGCAGAAAATCACCGATGCTTATGCCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGC
TGGCTCCGTACTTCAAGCAAATTGCCGATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGATGT
CGTTGCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCCGGTTCCGACCTTCTCCGCAGCGGTT
GCCTATTACGACAGCTACCGTGCTGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCAC
AGCGTGACTATTTTGGTGCGCATACTTATAAGCGTATTGATAAAGAAGGTGTGTT
CCATACCGAATGGCTGGATTAA

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

ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGC
CTGCCACTAAGGCGATACCCAAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGA
TTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGATCAAAGAAATCCTCCTGGT
AACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTA
GAATCACTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCC
ATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATGAACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTT
TAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCATTTGTCGT
GGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAA
CCTTGCTGCCATGATTGCACGTTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCA
AAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCCGTCATCCAGACTAAAGAGCCGC
TGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGATC
AGCCGCAGACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTCGCTATGTGCTTTCTGC
CGATATTTGGCCGGAACTGGAACGTACTCAGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAG
CTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCCGTTGATGCAATGCTGA
TGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTG
TGAAGTATGGCCTACGCAACCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTG
AGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAATCTGACCGGATGTAACGGTTGATAAGAA
AATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAATCTTCCTG
CCGTTGTTTTATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATT
CAAAGTTTTCCAGGATTTTCCTTGTTTCCAGAGCGGATTGGTAAGACAATTAGCG
TTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTAACGCTCGTCACATCATAGGCATG
CATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATACCTC
TATTAATCAAACTGAGAGCCGCTTATTTCACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAA

TAAATTAAGCTAGCAGTGAAGATACTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTATTGGTT
CTGCTGTTGTTCGTCACATAATAAATAATACGCAAGATAGTGTTGTTAATGTCGA
TAAATTAACATACGCCGGAAACCTGGAATCGCTCGCTGAAATTTCTGATTCTGAA
CGTTATTCATTTGAGCATGCAGATATCTGCGATGCCGAAGCGATGGCTCGTATTT
TCGCACAGCACCAGCCAGACGCGGTGATGCACCTGGCAGCAGAGAGCCACGTTG
ACCGCTCAATAACTGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTGGGTACTTA
TGTTCTTTTAGAAGCGGCGCGCAATTATTGGTCTGGTCTGGATGATGAAAAGAAA
AAAAACTTCCGCTTTCATCATATTTCTACTGATGAGGTGTATGGTGACTTACCCCA
TCCGGATGAAGTAAATAGCAATGAAACGTTGCCGCTATTTACGGAAATGACAGC
ATACGCGCCAAGTAGTCCATATTCTGCTTCTAAAGCTTCCAGCGATCATTTGGTTC
GCGCATGGAAACGTACTTATGGTTTACCGACCATTGTGACTAATTGCTCGAACAA
CTATGGTCCTTATCATTTCCCGGAAAAGCTTATTCCACTGGTTATTCTTAATGCAC
TGGAAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAAAGGAGATCAGATCCGCGACTGGT
TGTATGTAGAGGATCATGCTCGAGCGTTATATACCGTCGTAACCGAAGGTAAAGC
GGGCGAAACTTATAACATTGGTGGACACAACGAAAAGAAAAACATCGACGTAGT
GTTCACTATTTGTGATTTGTTGGATGAGATAGTCCCGAAAGAGAAATCTTATCGT
GAGCAAATTACCTATGTTGCTGATCGCCCAGGGCATGATCGCCGTTATGCAATTG
ATGCCGATAAAATTAGCCGCGAATTGGGCTGGAAACCACAGGAAACGTTTGAGA
GCGGGATTCGTAAAACTGTGGAATGGTATCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATA
ATGTGAAAAGTGGTGCCTATCAATCGTGGATTGAACAGAACTATGGGGGCCGCC
ACTAATGAATATCCTCCTTTTTGGCAAAACAGGGCAGGTTGGTTGGGAACTACAG
CGTGCTCTGGCACCTCTGGGTAATTTGATTGCTCTTGATGTTCACTCCACTGATTA
CTGTGGTGATTTTAGTAACCCTGAAGGTGTGGCTGAAACCGTTAGAAGCATTCGG
CCTGATATTATTGTCAACGCAGCCGCTCACACCGCAGTAGACAAAGCAGAATCA
GAACCGGAGTTTGCACAATTACTGAACGCGACGAGTGTCGAAGCGATCGCGAAA
GCAGCCAATGAAGTCGGCGCTTGGGTTATTCACTACTCTACTGACTACGTATTTC
CGGGGACCGGTGAAATACCATGGCAGGAGGAGGATGCAACCGCACCGCTAAATG
TTTACGGTGAAACCAAGTTAGCAGGAGAAAAAGCATTACAAGAGCATTGTGCGA
AGCACCTTATTTTCCGGACCAGCTGGGTCTATGCAGGTAAAGGAAATAACTTCGC
CAAAACGATGTTGCGTCTGGCAAAAGAGCGTGAAGAATTAGCCGTTATTAATGA
TCAGTTTGGTGCGCCAACTGGCGCAGAGTTGCTGGCTGATTGTACGGCACATGCC
ATTCGTGTGGCACTGAATAAACCGGAAGTCGCAGGTTTGTACCATCTGGTAGCCA
GTGGTACCACAACCTGGCACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAA
AGCAGGCATTCCCCTTGCACTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAACAACAGTCTAT

CCTACACCAGCTCGTCGTCCACATAACTCTCGCCTTAATACAGAAAAATTTCAGC
AGAACTTTGCGCTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTTGGTGTGAAACGCATGCTCAA
CGAATTATTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTGATGGTG
GAACAAGATGAATTAAAAGGAATGATGGAATGAATACGCGTAAAGGTATTATTT
TAGCGGGTGGTTCTGGTACACGTCTTTATCCTGTGACTATGGCTGTCAGTAAACA
GCTGTTACCGATTTATGATAAACCGATGATCTATTACCCGCTCTCTACACTGATGT
TGGCGGGTATTCGCGATATTTTGATTATCAGCACGCCACAGGATACTCCTCGTTTT
CAACAACTGCTGGGTGATGGGAGCCAGTGGGGGCTAAATCTTCACTACAAAGTG
CAACCGAGTCCGGATGGTCTTGCGCAGGCATTTATCATCGGTGAAGAGTTTATCG
GTGGTGATGATTGTGCTTTGGTACTTGGTGATAATATCTTCTACGGTCACGACCTG
CCTAAGTTAATGGATGCCGCTGTTAACAAAGAAAGTGGTGCAACGGTATTTGCCT
ATCACGTTAATGATCCTGAACGCTATGGTGTCGTTGAGTTTGATAAAAACGGTAC
TGCAATCAGCCTGGAAGAAAAACCGTTACAACCAAAAAGTAATTATGCGGTAAC
CGGGCTTTATTTCTATGATAACTACGTTGTGGAAATGGCGAAAAATCTTAAGCCT
TCTGCCCGCGGTGAACTGGAAATTACCGATATTAACCGTATCTATATGGAACAGG
GGCATTTATCTGTTGCCATGATGGGACGTGGATATGCCTGGCTGGACACGGGGAC
ACATCAAAGTCTTATTGAAGCAAGCAACTTCATTGCCACCATTGAAGAGCGCCAG
GGCTTGAAAGTTTCCTGCCCGGAAGAAATTGCTTACCGTAAAGGGTTTATTGATG
CTGAGCAGGTGAAAGTATTAGCTAAACCGCTGAAAAAAAATGCTTATGGTCAGT
ATCTGCTAAAAATGATTAAAGGTTATTAATAAAATGAATGTTATTAAAACAGAA
ATTCCAGATGTACTGATTTTTGAACCGAAAGTTTTTGGTGATGAGCGTGGTTTCTT
TATGGAAAGCTTTAATCAGAAAGTTTTCGAAGAGGCTGTAGGGCGGAAGGTTGA
ATTTGTTCAGGATAATCATTCTAAATCGTGTAAAGGTGTACTTAGAGGTTTACAC
TTTCAGCTTCCTCCCTTTGAGCAGGCAAAATTAGTAAGGTGTATAGTTGGCGAGG
TATTTGATGTTGCAGTAGACATTAGACCTAATTCTGAAACATTTGGTTCATGGGTT
GGAGTAACTCTTTCGTCAGAAAATAAAAGGCAGCTATGGATTCCAGAAGGATTC
GCCCATGGTTTTTTAACTTTAAGTGATATTGCAGAGTTTGTTTATAAAACTAACAA
CTATTATTCTTTAAATCATGAAAGGGGAGTCATTTGGAACGATGAGGAAATTAAC
ATTGCCTGGCCCTCTCAATCAGAGAAGATTCTGTCACAGAAAGATATTAATTTAC
CATCATTTAGATTTGTTCAAATGTTTAGCAAGTAGTGTTATCTTTACACTGCACAT
AGTCATCATTTTTTATGCTTTAAGTAAATTATATTGCACATCTATAACACAAAGCG
CAATAATATTTCGACCTGATGAAGGTTTGTGGTTATTTATCTTTCTAGGCGTTTTT
TATGACTAAAATAGTTGTGGTTTCTACAGCTCCAATATTCCCGACAAATAATGGG
TACAAAAGTTCTGTATTAGGAAGAATTGATGAGTTATTAAATGAGGATAATGAG

GTCGTTTTGATTGAAATAAACCTTGAAAATGTTACGGAAAAGAAAGATGAATTA
ATACCAACAAGATTTAATAATATTCAAAGATATGAAGTAAAAAAAATATCTAGA
TCATTTATTGCCGAGTTACAAATATTATTTGATATCAGAACTCGGTATGAACAAT
TATTTTCTTCTGCTGACATTAGAGATAACATAAAAAAGATAATTGATTTAGAAAA
ACCTTCTATTATTATTGCTGAGTCTATATGGGCGTTGCAAGCATTGCCTATTGAAA
TTAGTGCGAGAATACACTGTGTTATTCATGATGTGGCAACTGATTTCTTTAAAGA
AATGTTTGTATCTCATAATGAGGTTGTACGAAAAATTTTGTTTTTTAATGATTACC
TAAAGTTGAAAATTACTGAAGAAAATATTATCAAACGTTTGAGAGTTGAGCAATT
TATCTTTCTGACAGAAGAAGATAAATGTTGGTATAAAACAAGATACAATATTGAT
GAGGGTTGTTGTTCCTTAGCGAGCAATCATCTTTATGTAGAAAAGATTAAGAGAA
CTATCAATTTCCAAACCCCTTTCCTGCTTATTCCCGGTAGCATTGAATTTTCACAA
AATTTTTACGGCTTAAATTGGTTTATAAAAAATATATATCCTGGATTAAATAGGA
AAATAAGAATAGTTGTAACAGGAAAGGCATCAGATAAAAAAATAAAGATGTTAA
ACTGTGGAGAGGAAATTACCTTTACGGGAGAGCTTGACTTTTCCACATATAATAA
ACTTAGCTCAACATGCTTGTGTGTTATTGCACCGATTACAACGGGCACTGGAATT
AAAATAAAAATATTAGAAGCTGTACAAAAAGGTATTCCTGTACTTACAACAAAA
TTTGCTTCAAAAGGAATATGTTCCGATTTATGTTTTTATTGCGAGGAGGATACTG
ACACAAACTTTGTCAATTTAATTAACAGTTTTCTTGAAACGACATTAAGAGTCCA
AGAATGAATTTATTGCTTTTTTCAGTCCTTGCGTTTGGTTTAATATTGGCTTTGGC
CCATAATAATAAAAGTGGAGATATTAACGCATACTTAATGTTTTTTCTCGTGGTC
CTAATGGTATTAATATCAGGGCTGCGTATGAATGATAGTGATTATATCGAATACA
GGAAAATGTATAATGAAGTGCCTATTTTATGTGACTTTAGTCTCGCATCTATAAG
AGATATACATGGGGAGGTAGGCTATCTATTCTTATCATCAATCTTTAAAACTTTA
TGCTTGCCATTTCAATTATTTCTTTTTTTTATTGCTTTTTTATCACTCCTGCTTACAT
ATTTTTCATTCAGAAAAATAAGTTTAATACCGATACTATCGTTAGTTTTTTATTTA
AGCCATGCTTTTATAGTTAGAGATTTGATTCAAATTAGGGCAGGATTAGCTGTTA
GCATATCATTATATTCAATAATTAAATTTAAAGGAAATAAAAGTATAATTACAGG
AGTTTTATTTGCTTCTTTGATTCATTCTGGGGCGCTTATTATTGCTCTTTGTTATCC
TTTTTTCAAAAAAAAATACATAACATTAAAAATGATGTTGTTTTTATTTTTAGTGT
CAATTATTTTTTCTTATTTGAATGGGCTTAATTTATCGATACAACTCTTATCTCAA
TATAGTTTGCTTCCAACTGCAATTTCGAATTATGTTGGTTGGGAAGAATATGATT
ATCGGGTGAGTATATTTACTAATCCGGTTTTTATTAAAGGTGTTTTTTTAATTGTC
TTAATGCACAAATATGTACTTTCAGATATTAAAAATGAGAAAATTATAGTGCTTT
ATAACTTATATGTTTTAGGTGTATTAGCTATGGTTGCATTGAGTGGGATGGCTATT

CTTTCAGGCCGTCTTTCATCCTTTCTGACACTAGGTGAAAGCATTTTAATTGTATA
TGCTCTGTTCTACAAAAGAAATACACCTCTGGCGTTTCTAATTTTTTCTTTTTTAA
CAATTGTGCAATTAGGATATGATCTATTTATTTCTAATGTGCATCCTGAGCTTACT
CTGATTATATTTGGGTGAATCTAAGTGAAAAATAATAAAATAGGCATACTTATCT
CTAAAATACAAAATCTTGGACCTGTGAATGTAGTACGAGGATTGATAAAAGAAA
ATAAAAAATATGCTTTTACTGTTTTTTGTTTAACAAATAGCGTAGATAAAAATAT
ATATGATGAGTTATGCTGTTTAGGAGCCAAGGTTATATTAATACCAGATGGTACT
TGGTTCAGCAAAATTTTATTTGTGAGAAGTTTTTTAAAGGAACATCCACATAATA
TCTTACATTCACATGGGATCACGGCCGATATGTTTTCTTACTTTCTGAATGGCGTG
AAAATATCTACTATTCACAATAGACTAGATGAGGATTATATCCCATTATTTGGCG
CGGTTAAAGGGAATGCTATATATTATCTTCATCGTTTTATATTACGAAGATTTAAT
CATATCGTTGCTTGCTCAGCAGCGGTCCAATCAAAACTGAAACAATCGAAAGTA
AAAACTAAAATAACCACCATCCAGAATGGGATTGATATAACTAGGTTTAAGACA
CTTGAGTCTGATAAAAAAAAATTATTGAGGGAAAAACACGGATTTGATAGTGAA
AAAAGAATATTTATATATTGTGGCTCGTTATCATTAAGGAAAAATATTGCTTACC
TCTTGGAACACTTAGCCATCGAAGAAAATGATATATTTTTAATTCTAGGTGATGG
TGAACTTTTTAGATATTGTAAGGATAAATATTCTAAAGATTTACGGTATATATTTA
TGGGGAAAGTTGAATGCCCTCTTGAATATTATCAATTATCAGATATTTTTGTTTCC
GCTTCTTTATCGGAAGGGCTCCCCTTGGCACTATTAGAAGCTGCCTCTACTGGGT
GCTATTTATATGTTAGCGATATAGAGCCCCATAGAGAAATTGCATCTCTATTAGG
AGAGGAAAATATTTCTATGTTTAAAATTAAGGATGGATCATATAATTATTTGCAA
CCTAAAATAAAAAAAGCTGACTATAACGCTCTTTCTGACGATAAACTTTACAATA
TATCCGATAAAAAAATGTCAAATCTTTATGACAAACTTTTTGTTTCTTTATTAGAG
CAGAGGCACTAATATAATGATTTATGTTTCGGTAATTTCTCATGGTCATTTCAAA
ACTCTTAAGGAATTAGGAGCAGTATCAAAATTAAATAATCACAGCAGAATTAAA
GTTATCATCAAAGATAATTTAGGAGAGAGCGAGCTTTTGGATTTTTGTCAGGAAA
ACAAAATAACTTATTTAAGGTCTAAAGAGAAAAAAGGATTTGGAGAGAATAATA
ATGAAGTTTTTTCCTCTATATCCTCCTTAATTACTAAGGAAGATTTTTTTGTGGTT
ATGAATCCTGATATATATATTGAGTGCTCTGATCTATTAGATGTCGTAGATGAGT
GTGGTTCAGCGAATGTTAATCTAGCAACGATAAATTTATACAGGGATTTTGATAA
AAAAACATATGATAACTCAGTAAGGAAATTTCCCTCGGCAATTGATTTTTTTATG
TCATTTTTATTTAAGAAAAATGACTGTGTAGTAAATAAGAACAAAATAACGAAA
CCAACATATGTTGATTGGGCTGCAGGTTCTTTTCTAATATTTAATGCCTTCTTTTA
TTCAAAACTCAACGGATTCAACGAAAAGTATTTTATGTATTGCGAAGATATTGAT

ATATGTTGGCGAGCTAAAAAACACTTCAATACTTCAGTTTTATACTATCCATGCT
ATGCAGCAATTCATTTGGCACAATTTAACAATCGTAGGATTTTTAGTAGACATTT
CATTTGGCATATAAAAAGTATTATCCTTTTTTTATTATATAAAAATGGTATGCTGC
GTTCTAGTAAGTTGCTTTAATGCTAATATTCTTTTAAGAGGTGAGAATGATACCT
GTTATTTTGGCTGGTGGTTCGGGAAGTCGCTTGTGGCCACTTTCACGAGAAAAGT
TCCCCAAGCAGTTTTTAAAGTTGACTGGCAGTTTGACAATGTTGCAGTCAACATT
GTCACGTCTTAATAATTTAAATGCTGATGATTCAATAGTTATATGCAACGAAGAG
CATAGATTTATTGTTGCAGAACAATTAAGAGAGTTAGGCAAACTTTCAAATAACA
TTATTCTTGAACCCAAAGGTCGTAATACAGCCCCTGCTATAACACTCGCAGCATT
AGCAGCAAAAAGAAAATTCGCTGATGAAGATCCATTGATTCTTATTTTAGCTGCA
GATCACAACATCCAAGACGAACATGTTTTCTGTGAGGCAATTAATAAGGCGTCAT
CTTTAGCTAGTTATGGAAAACTAGTGACTTTTGGTATCGTTCCATTCAAACCTGA
AACTGGGTATGGCTATATTCGTCGCGGTGATGAAGTGCCTGTAGATGAGCAGCAT
GCGGTGGCCTTTGAAGTGGCGCAGTTTGTCGAAAAACCGAATCTGGAAACCGCG
CAGGCCTATGTGGCAAGCGGCGAATATTACTGGAACAGCGGTATGTTCCTGTTCC
GTGCCGGACGCTATCTCGAAGAACTGAAAAAGTATCGTCCGGATATTCTCGATGC
CTGTGAAAAAGCGATGAGCGCCGTCGATCCGGATCTCGATTTTATTCGTGTGGAT
GAAGAGGCGTTTCTCGCTTGTCCGGAAGAGTCGGTGGATTACGCGGTCATGGAAT
GCACGGCAGATGCCGTTGTGGTGCCGATGGATGCGGGCTGGAGCGATGTCGGTT
CCTGGTCTTCATTATGGGAGATCAGCGCCCACACCGCCGAGGGCAACGTTTGCCA
CGGCGATGTGATTAATCACAAAACTGAAAACAGCTATGTGTACGCCGAATCTGG
CCTGGTCACCACCGTCGGGGTGAAAGATTTGGTGGTAGTGCAGACCAAAGATGC
AGTGCTGATTGCCGACCGTAATGCGGTGCAGGATGTGAAGAAAGTGGTCGAGCA
GATCAAAGCTGATGGTCGCCATGAGCATCGGGTGCATCGCGAAGTGTATCGTCC
GTGGGGCAAATATGACTCTATCGACGCGGGCGACCGCTACCAGGTGAAACGCAT
CACCGTGAAACCGGGCGAAGGTTTGTCGGTACAGATGCATTATCATCGCGCGGA
ACACTGGGTGGTTGTCGCGGGAACGGCAAAAGTCACTATCAACGGTGATATCAA
ACTGCTTGGTGAAAACGAGTCCATTTATATTCCGCTGGGGGCGATGCACTGCCTG
GAAAACCCGGGGAAAATAGATTTAGAATTAATTGAAGTTCGCTCTGGTGCATATC
TTGAAGAAGATGATGTTATTAGATGTTATGATCGCTATGGACGAAAGTAATATAT
AATAATTATTTCAGAATTAGAAATGATAATTATAAGTTTTCGTCTGGATAAACAA
TAGATAGTATGGGTTGGAAAATATGAGTTCTTTAACTTGTTTTAAAGCTTACGAC
ATTCGCGGGAAATTAGGTGAAGAACTGAATGAAGATATCGCCTGGCGCATTGGT
CGCGCCTATGGCGAATTTCTCAAACCGAAAACCATTGTGTTAGGCGGTGATGTCC

GTCTCACCAGCGAAACCTTAAAACTGGCGCTGGCAAAAGGTTTACAGGATGCGG
GCGTCGATGTGCTGGATATTGGCATGTCCGGCACCGAAGAGATTTATTTCGCCAC
GTTCCATCTCGGCGTGGATGGCGGCATTGAAGTTACCGCCAGCCATAATCCGATG
GATTACAACGGCATGAAGCTGGTGCGCGAAGGGGCTCGCCCGATCAGCGGTGAT
ACCGGACTGCGCGACGTCCAGCGTCTGGCAGAAGCTAACGACTTTCCTCCCGTCG
ATGAAACCAAACGCGGTCGCTATCAGCAAATCAATCTGCGTGACGCTTACGTTGA
TCACCTGTTCGGTTATATCAATGTCAAAAACCTTACGCCGCTCAAGCTGGTGATC
AACTCCGGGAATGGCGCAGCGGGTCCGGTGGTGGACGCTATCGAAGCCCGCTTT
AAAGCCCTCGGCGCACCGGTGGAGTTAATCAAAGTGCATAACACGCCGGACGGC
AATTTCCCCAACGGTATTCCTAACCCGTTGCTGCCGGAATGTCGCGACGACACCC
GCAATGCGGTCATCAAACACGGCGCGGATATGGGCATTGCCTTTGATGGCGATTT
TGACCGCTGTTTCCTGTTTGACGAAAAAGGGCAGTTTATTGAGGGCTACTACATT
GTCGGCCTGCTGGCAGAAGCGTTCCTCGAAAAAAATCCCGGCGCGAAGATCATC
CACGATCCACGTCTCTCCTGGAACACCATTGATGTGGTGACGGCCGCGGGCGGC
ACGCCGGTGATGTCGAAAACAGGACACGCCTTTATTAAAGAACGTATGCGCAAG
GAAGACGCCATCTACGGTGGCGAAATGAGCGCTCACCATTACTTCCGCGATTTCG
CTTACTGTGACAGCGGCATGATCCCGTGGCTGCTGGTCGCCGAACTGGTGTGCCT
GAAAGGAAAAACGCTGGGCGAACTGGTGCGCGACCGGATGGCGGCGTTTCCGGC
AAGCGGTGAGATCAACAGAAAACTGGCGCACCCTGTTGAGGCGATTAACCGCGT
GGAACAGCATTTTAGCCGTGAGGTGCTGGCGGTGGATCGCACCGATGGCATCAG
CATGACCTTTGCCGACTGGCGCTTTAACCTGCGCTCTTCCAACACCGAACCGGTG
GTGCGCCTGAATGTGGAATCTCGCGGTGATGTTCAGGTTATGGTAATCCATACTC
AAGAAATATTATCAATTTTGACGTCATAAAGAATAAGCCCTGACAAGTTAGGGCT
TAATTAATATATATTTTTTTTGAATTGGGGATTTGTGGTAAGATTTTTAATATGTT
ATTTAATGTGGTTGAATTAATGTTGACTGGAAAATAATAATGAGAACGAAAAAA
GCATTACACAACTTTAAAGTTGATTTATTAATTACTTTTTTATTGGTTTTGCTAGG
GTTTTATATTCGAACTGTTTTTGTTTCAAAAATGGGAAGTGATATTACTGGAGTG
ATGTTACTATTCACACAGTTGACAGCATATCTCAATTTGGCAGAATTAGGTATTG
GAATTGCAGCTGCCAGCGTATTATATAAACCGCTCAGCGAGAATGAATACAATA
AAATAACTTACATAATATCTTTGCTCTCAGTCATATACAAATATATATTTGTGTTT
GTTTTGATTCTTGGCGTTGTTATAGGTATCTGTATTTATTACTTTATTGATTCTGTA
AAGGTTGTAAATGGCGTTTTTTTATATTGGGCTTTGTTCGTTTTTAATACATCGTT
GACATATAGTTATGCTAAATACTCCACATTATTAACTGCTAATCAGCGGTACTCA
GCAGTAAGAAAAATTCAAGGTGGCGGAAAAGTTATAATAATTGTATTTCAGATA

TTAATTTTGTGCTTTACGCAAAGTTTCATACTTTATTTGTTAGTTGAGACTTTAGG
TATTTTTTCTCAATATTTGATTTTTAAAAAAATAATTGGGAACGGAAATCAATATC
TCAGTAATGAGGTTTTACTTATTGAAAGCGATAAACTTTTGATAAAAAAAGAATT
AAAAATAAGAATAAAAAATATGTTCTTCCATAAAATAGGTGCTGTGCTTGTCCTT
AATACAGACTACCTGCTTGTATCAAAGTTTCTGACATTAAGTTATGTGACAATTTT
TGGCAGCTATATGATGGTATTTCAGATAGTAACTGTTTTGATGTCAAGTTTTGTTA
ATGCTATTACTGCAGGAATGGGTAATTACTTAATTAATAAAAGTAATTTAGAAAT
TAAGGAAATTACACGTCAATTTTATGTGATATTTATCGCCTTTGCAACATTCATAT
CACTAAATATGTTTTTTCTTGTTAATGATTTTATCGCAAAATGGATAGGTGTTAAT
TATACATTAAGTAACACCCTAGTTGCATTAATGATTGTTAACGTATTCATTAGTGT
TGTCAGGGTACCTTCTGATATATTAAAAAACGCAAGTGGACATTTTGGTGATATT
TATTATCCATTATTAGAAGGTGTGCTGAATATTACGATATCCATCATTTTGGCTAT
CATTATTGGATTACCTGGCATTATTATAGGGACAATAGTATCTAACTTAATAGTA
ATAATGCTTGCGAAACCATTATATCTTTACTCTAAGTTATTTAATCTTAGAAATCC
GACGAGGGTTTATTTTGAATTTATTTCTCGGCCTATGTTATATTCATTATGTGTGA
TTGGGGTGAGCTATTTATTGCGCGATGAAATATATTCATTTAAAGTAAGTACATG
GTTGGATTTTATTAACAAGCTACTCTTAGTCTCTACTCCTAGCATATTGGTAATAT
GTGCTATTTTCTCTACGGATAGTGACTTTAGATTATTTTTCAGAAAAATTATATAT
GTGATTATGAAGAAATAAAAATTTCGAAAATGTATTAATCGAAATTATGCAACG
AGCTTTATTTTTATAAATGATATGTGATCTTTTCGCGAATAGGAGTAAGGATCCG
TGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGG
AATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATG
GATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTCCAG
GCCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAG
CAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCGCTCAAC
ATCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGG
AAGAAGTGATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAAACTGGTTCCTTACTATACGGTGA
AAGAGTTTGTCGAATCTCTGGAAACGCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGC
AGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGA
GACATCATCATTGATGGTGGTAACACCTTCTTCCAGGACACTATTCGTCGTAATC
GTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTTAACTTCATCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGA
AGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTA
TGAATTGGTAGCACCGATCCTGACCAAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGGTGA
ACCATGCGTTACCTATATTGGTGCCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTT

CACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTCTCTGC
TTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGT
GGAATAACGGTGAACTGAGCAGTTACCTGATCGACATCACCAAAGATATCTTCA
CCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGG
CTAACAAAGGTACCGGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAAC
CGCTGTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTTTGCACGTTATATCTCTTCTCTGAAAGAT
CAGCGTGTTGCCGCATCTAAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCG
ACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTCGTGCGCTGTATCTGGGCAAAATCGT
TTCTTACGCCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGCTGCGTCTGAAGAGTACAACTGG
GATCTGAACTACGGCGAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTG
CGCAGTTCCTGCAGAAAATCACCGATGCTTATGCCGAAAATCCACAGATCGCTAA
CCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAATTGCCGATGACTACCAGCAGGCGCTG
CGTGATGTCGTTGCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCCGGTTCCGACCTTCTCCG
CAGCGGTTGCCTATTACGACAGCTACCGTGCTGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGAT
CCAGGCACAGCGTGACTATTTTGGTGCGCATACTTATAAGCGTATTGATAAAGAA
GGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

SEQ ID NO: 20 (пример последовательности CRM197)

GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYDDDWKEFYST
DNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTE
PLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETR
GKRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPI
KNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWA
VNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMV
AQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLHDGYAVS
WNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNKSKTHISVNGRKI
RMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNGVHANLHVAFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQ
KTVDHTKVNSKLSLFFEIKS

[0454] Варианты осуществления, описанные в данном документе, предназначены только для иллюстративных целей, и специалистам в данной области будет известно или они смогут установить с помощью постановки стандартного эксперимента многие эквиваленты конкретных процедур, описанных в данном документе. Считается, что все

такие эквиваленты входят в объем настоящего изобретения и охватываются нижеследующей формулой изобретения.

[0455] Все ссылки (включая заявки на патенты, патенты и публикации), цитируемые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и для всех целей в такой степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент была конкретно и отдельно указана как включенная в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

ПЕРВОНАЧАЛЬНАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая полисахаридные антигены O1, O2, O4, O15, O16, O18, O25, O75 и O6 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, и где концентрация каждого из полисахаридных антигенов O75 и O25 независимо увеличена по сравнению с концентрацией каждого из полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O15, O16, O18 и O6.

2. Композиция по п. 1, где весовое отношение концентраций полисахаридного антигена O75 независимо к каждому из полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O15, O16, O18 и O6 составляет от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 2,5:1.

3. Композиция по п. 1 или п. 2, где весовое отношение концентраций полисахаридного антигена O75 независимо к каждому из полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O15, O16, O18 и O6 составляет приблизительно 2:1.

4. Композиция, содержащая полисахаридные антигены O1, O2, O4, O15, O16, O18, O25, O75 и O6 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, и где весовое отношение концентраций полисахаридного антигена O75 к полисахаридным антигенам O1, O2 и/или O6 составляет от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, предпочтительно приблизительно 2:1.

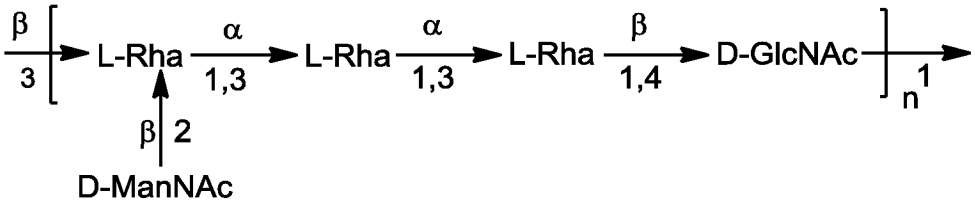
5. Композиция по п. 4, где весовое отношение концентраций полисахаридного антигена O75 к полисахаридным антигенам O4, O15, O16 и/или O18 составляет от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, предпочтительно приблизительно 2:1.

6. Композиция по любому из пп. 1-5, где весовое отношение концентраций полисахаридного антигена O75 к полисахаридному антигену O25 в композиции составляет приблизительно 1:1.

7. Композиция по любому из пп. 1-6, где весовое отношение концентраций полисахаридных антигенов O1:O2:O4:O6:O15:O16:O18:O25:O75 *E. coli* составляет 1:1:1:1:1:1:1:2:2.

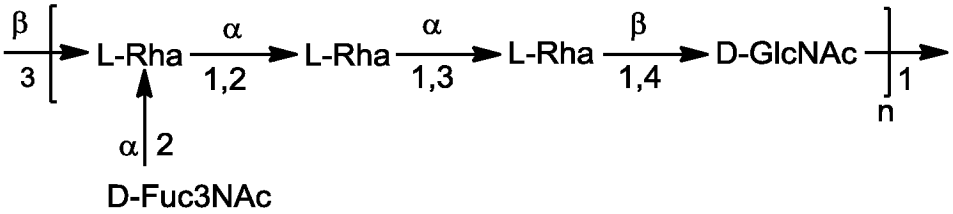
8. Композиция по любому из пп. 1-7, где антиген O1 представляет собой O1A, O4 является глюкозилированным, антиген O6 представляет собой O6A, антиген O18 представляет собой O18A, и антиген O25 представляет собой O25B, где:

(x) полисахаридный антиген O1 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O1A):



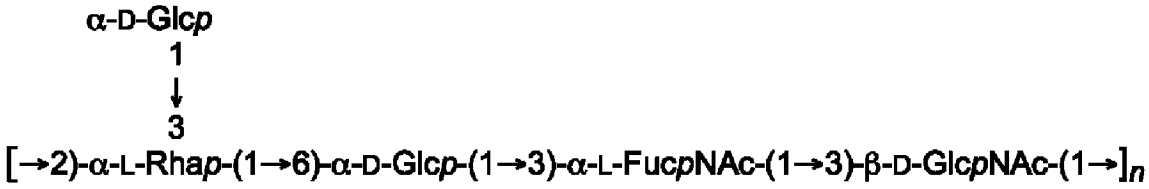
,

(xi) полисахаридный антиген O2 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O2):



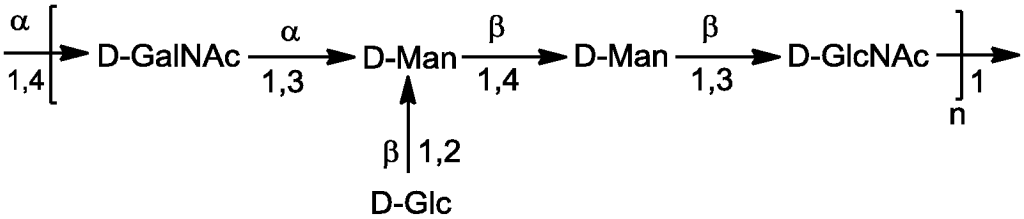
,

(xii) полисахаридный антиген O4 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O4-Glc+):



,

(xiii) полисахаридный антиген O6 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O6A):



,

(xiv) полисахаридный антиген O15 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O15):

[→2)-β-D-Gal*p*-(1→3)-α-L-Fuc*p*NAc-(1→3)-β-D-Glc*p*NAc-(1→]$_n$,

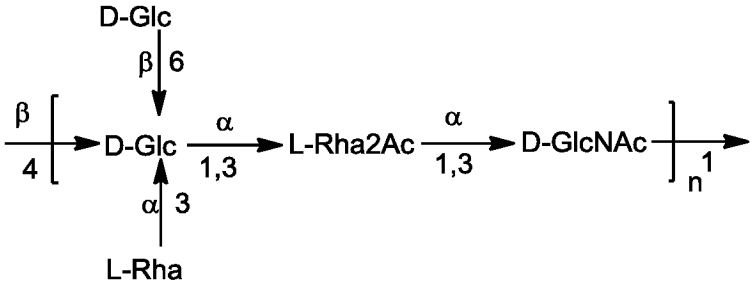
(xv) полисахаридный антиген O16 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O16):

[→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
,

(xvi) полисахаридный антиген O18 *E. coli* характеризуется структурой формулы (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
,

(xvii)полисахаридный антиген O25 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O25B):



, и

(xviii) полисахаридный антиген O75 *E. coli* характеризуется структурой формулы (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→]$_n$,

где каждое n независимо представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20.

9. Композиция по любому из пп. 1-8, где концентрация полисахаридного антигена O75 составляет от приблизительно 8 до приблизительно 64 мкг/мл, предпочтительно от приблизительно 8 до приблизительно 50 мкг/мл, предпочтительно от

приблизительно 12 до приблизительно 40 мкг/мл, предпочтительно от приблизительно 16 до приблизительно 32 мкг/мл, предпочтительно от приблизительно 28 до приблизительно 36 мкг/мл, предпочтительно приблизительно 32 мкг/мл.

10. Композиция по любому из пп. 1-9, где полисахаридные О-антигены *E. coli*, присутствующие в композиции, состоят из O1, O2, O4, O15, O16, O18, O25, O75 и O6.

11. Композиция по любому из пп. 1-9, дополнительно содержащая по меньшей мере один дополнительный полисахаридный антиген *E. coli*, ковалентно связанный с белком-переносчиком, где предпочтительно по меньшей мере один дополнительный полисахаридный антиген *E. coli* включает в себя полисахаридный антиген O8 с формулой (O8):

$$\alpha\text{-D-Man}p3\text{Me-}(1\rightarrow[3)\text{-}\beta\text{-D-Man}p\text{-}(1\rightarrow2)\text{-}\alpha\text{-D-Man}p\text{-}(1\rightarrow2)\text{-}\alpha\text{-D-Man}p\text{-}(1\rightarrow]_n,$$

где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20.

12. Композиция по любому из пп. 1-11, где белок-переносчик представляет собой детоксифицированный экзотоксин A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) или CRM_{197}, предпочтительно EPA, где предпочтительно белок-переносчик содержит от 1 до 20, как, например, от 1 до 10 или от 2 до 4, консенсусных последовательностей гликозилирования, имеющих аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, таких как консенсусные последовательности, имеющие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, более предпочтительно белок-переносчик содержит четыре консенсусные последовательности гликозилирования, наиболее предпочтительно каждый белок-переносчик представляет собой EPA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3.

13. Композиция по любому из пп. 1-11, где полисахаридные антигены *E. coli* ковалентно связаны с белком-переносчиком посредством биоконъюгации или посредством химической конъюгации, предпочтительно полисахаридные антигены

E. coli ковалентно связаны с белком-переносчиком посредством биоконъюгации, предпочтительно полисахарид ковалентно связан с остатком Asn в участке гликозилирования в белке-переносчике.

14. Способ индуцирования иммунного ответа на *E. coli*, предпочтительно внекишечную патогенную *E. coli* (ExPEC), у субъекта, включающий введение субъекту композиции по любому из пп. 1-13.

15. Способ индуцирования иммунного ответа на *E. coli*, предпочтительно внекишечную патогенную *E. coli* (ExPEC), у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества каждого из полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O15, O16, O18, O25, O75 и O6 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, где эффективное количество каждого из полисахаридных антигенов O75 и O25 независимо увеличено по сравнению с каждым из полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O15, O16, O18 и O6.

16. Способ по п. 15, где:

a) эффективное количество полисахаридного антигена O75 вводят в весовом отношении, независимо составляющем от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 2,5:1, предпочтительно приблизительно 2:1, к каждому из полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O15, O16, O18 и O6; или

b) эффективное количество полисахаридного антигена O75 вводят в весовом отношении, независимо составляющем от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, предпочтительно приблизительно 2:1, к полисахаридным антигенам O1, O2 и/или O6, где дополнительно эффективное количество полисахаридного антигена O75 вводят в весовом отношении 1:1 к полисахаридному антигену O25.

17. Способ по любому из пп. 14-16, где иммунный ответ ограничивает тяжесть инвазивного заболевания, вызываемого ExPEC, у субъекта или предупреждает его, где предпочтительно инвазивное заболевание, вызываемое ExPEC, включает сепсис и/или бактериемию.

18. Способ по любому из пп. 15-17, где антиген O1 представляет собой O1A, O4 является глюкозилированным, антиген O6 представляет собой O6A, антиген O18 представляет собой O18A, и антиген O25 представляет собой O25B, где предпочтительно полисахаридные антигены O1A, O2, глюкозилированный O4, O6A, O15, O16, O18A, O25B и O75 характеризуются структурами формул (O1A), (O2), (O4-Glc+), (O6A), (O15), (O16), (O18A), (O25B) и (O75) соответственно, как показано в таблице 1, где каждое n независимо представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20, где весовое отношение полисахаридного антигена O75 к полисахаридному антигену O6 составляет от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 4:1, более предпочтительно приблизительно 2:1.

19. Способ по любому из пп. 15-18, где полисахаридные O-антигены *E. coli*, вводимые субъекту:

a) состоят из O1, O2, O4, O15, O16, O18, O25, O75 и O6 или

b) дополнительно включают в себя от 1 до 15 дополнительных полисахаридных O-антигенов *E. coli*, каждый из которых независимо ковалентно связан с белком-переносчиком.

20. Способ по любому из пп. 14-19, где субъект является человеком, у которого имеется инфекция, вызываемая *E. coli* (предпочтительно ExPEC), предпочтительно инвазивное заболевание, вызываемое ExPEC, или который подвержен риску их наличия.

21. Способ по любому из пп. 14-20, где за одно введение вводят приблизительно 8-16 мкг, предпочтительно приблизительно 16 мкг, полисахаридного антигена O75.

22. Способ по любому из пп. 14-21, где эффективное количество вводимых полисахаридных антигенов O1:O2:O4:O6:O15:O16:O18:O25:O75 *E. coli* вводят в весовом отношении 1:1:1:1:1:1:1:2:2.

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая полисахаридные антигены O1, O2, O4, O15, O16, O18, O25, O75 и O6 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, и где концентрация каждого из полисахаридных антигенов O75 и O25 независимо увеличена по сравнению с концентрацией каждого из полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O15, O16, O18 и O6, где весовое отношение концентраций полисахаридного антигена O75 независимо к каждому из полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O15, O16, O18 и O6 составляет от 1,5:1 до 2,5:1.

2. Композиция по п. 1, где весовое отношение концентраций полисахаридного антигена O75 независимо к каждому из полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O15, O16, O18 и O6 составляет 2:1.

3. Композиция, содержащая полисахаридные антигены O1, O2, O4, O15, O16, O18, O25, O75 и O6 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, и где весовое отношение концентраций полисахаридного антигена O75 к полисахаридным антигенам O1, O2 и/или O6 составляет от 1,5:1 до 4:1, предпочтительно 2:1.

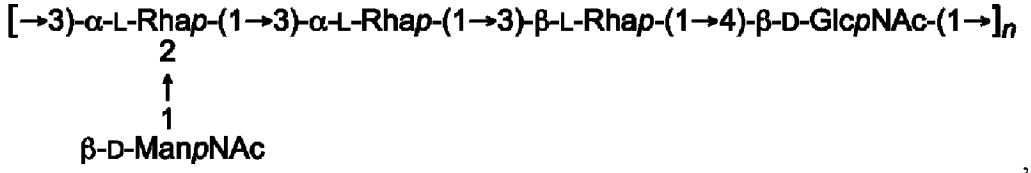
4. Композиция по п. 3, где весовое отношение концентраций полисахаридного антигена O75 к полисахаридным антигенам O4, O15, O16 и/или O18 составляет от 1,5:1 до 4:1, предпочтительно 2:1.

5. Композиция по любому из пп. 1-4, где весовое отношение концентраций полисахаридного антигена O75 к полисахаридному антигену O25 в композиции составляет 1:1.

6. Композиция по любому из пп. 1-5, где весовое отношение концентраций полисахаридных антигенов O1:O2:O4:O6:O15:O16:O18:O25:O75 *E. coli* составляет 1:1:1:1:1:1:1:2:2.

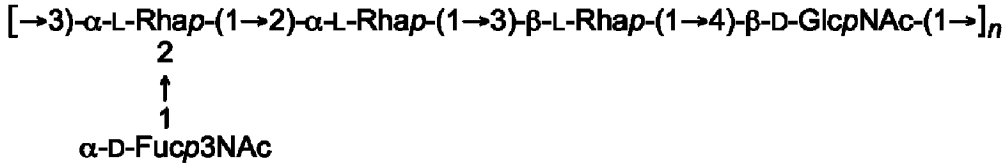
7. Композиция по любому из пп. 1-6, где антиген O1 представляет собой O1A, O4 является глюкозилированным, антиген O6 представляет собой O6A, антиген O18 представляет собой O18A, и антиген O25 представляет собой O25B, где:

(i) полисахаридный антиген O1 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O1A):



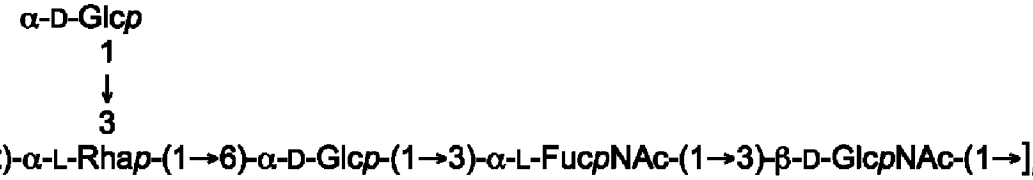
,

(ii) полисахаридный антиген O2 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O2):



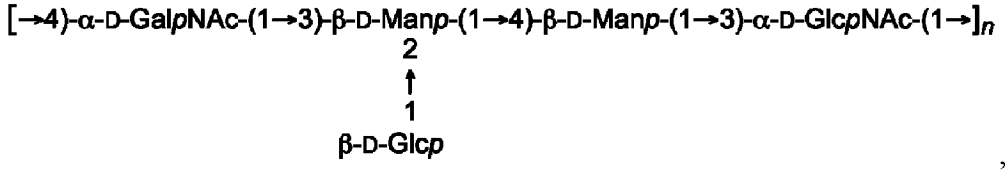
,

(iii) полисахаридный антиген O4 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O4-Glc+):



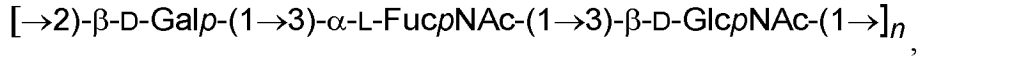
,

(iv) полисахаридный антиген O6 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O6A):



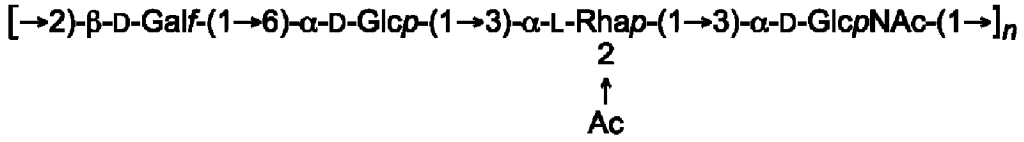
,

(v) полисахаридный антиген O15 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O15):



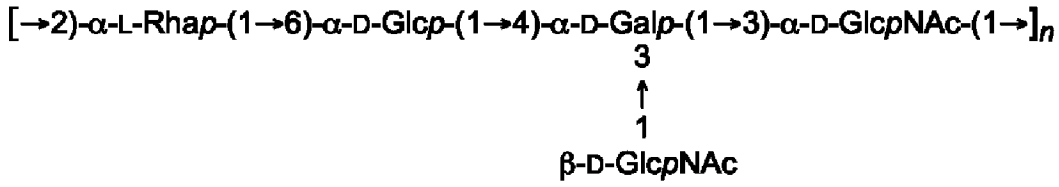
,

(vi) полисахаридный антиген O16 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O16):



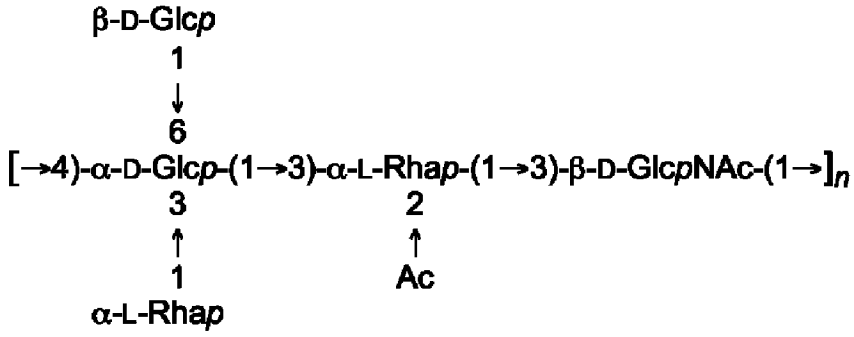
,

(vii) полисахаридный антиген O18 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O18A):



,

(viii) полисахаридный антиген O25 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O25B):



, и

(ix) полисахаридный антиген O75 *E. coli* характеризуется структурой формулы (O75):

,

где каждое n независимо представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20.

8. Композиция по любому из пп. 1-7, где концентрация полисахаридного антигена O75 составляет от 8 до 64 мкг/мл, предпочтительно от 8 до 50 мкг/мл, предпочтительно от 12 до 40 мкг/мл, предпочтительно от 16 до 32 мкг/мл, предпочтительно от 28 до 36 мкг/мл, предпочтительно 32 мкг/мл.

9. Композиция по любому из пп. 1-8, где полисахаридные O-антигены *E. coli*, присутствующие в композиции, состоят из O1, O2, O4, O15, O16, O18, O25, O75 и O6.

10. Композиция по любому из пп. 1-8, дополнительно содержащая по меньшей мере один дополнительный полисахаридный антиген *E. coli*, ковалентно связанный с белком-переносчиком, где предпочтительно по меньшей мере один дополнительный полисахаридный антиген *E. coli* включает в себя полисахаридный антиген O8 с формулой (O8):

$$\alpha\text{-D-Man}p3\text{Me-}(1\rightarrow[3)\text{-}\beta\text{-D-Man}p\text{-}(1\rightarrow2)\text{-}\alpha\text{-D-Man}p\text{-}(1\rightarrow2)\text{-}\alpha\text{-D-Man}p\text{-}(1\rightarrow]_n,$$

где n представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20.

11. Композиция по любому из пп. 1-10, где белок-переносчик представляет собой детоксифицированный экзотоксин A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) или CRM_{197}, предпочтительно EPA, где предпочтительно белок-переносчик содержит от 1 до 20, как, например, от 1 до 10 или от 2 до 4, консенсусных последовательностей гликозилирования, имеющих аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, таких как консенсусные последовательности, имеющие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, более предпочтительно белок-переносчик содержит четыре консенсусные последовательности гликозилирования, наиболее предпочтительно каждый белок-переносчик представляет собой EPA, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3.

12. Композиция по любому из пп. 1-10, где полисахаридные антигены *E. coli* ковалентно связаны с белком-переносчиком посредством биоконъюгации или посредством химической конъюгации, предпочтительно полисахаридные антигены *E. coli* ковалентно связаны с белком-переносчиком посредством биоконъюгации, предпочтительно полисахарид ковалентно связан с остатком Asn в участке гликозилирования в белке-переносчике.

13. Способ индуцирования иммунного ответа на *E. coli*, предпочтительно внекишечную патогенную *E. coli* (ExPEC), у субъекта, включающий введение субъекту композиции по любому из пп. 1-12.

14. Способ индуцирования иммунного ответа на *E. coli*, предпочтительно внекишечную патогенную *E. coli* (ExPEC), у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества каждого из полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O15, O16, O18, O25, O75 и O6 *E. coli*, где каждый из полисахаридных антигенов независимо ковалентно связан с белком-переносчиком, где эффективное количество каждого из полисахаридных антигенов O75 и O25 независимо увеличено по сравнению с каждым из полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O15, O16, O18 и O6, где:

a) эффективное количество полисахаридного антигена O75 вводят в весовом отношении, независимо составляющем от 1,5:1 до 2,5:1, предпочтительно 2:1, к каждому из полисахаридных антигенов O1, O2, O4, O15, O16, O18 и O6; или

b) эффективное количество полисахаридного антигена O75 вводят в весовом отношении, независимо составляющем от 1,5:1 до 4:1, предпочтительно 2:1, к полисахаридным антигенам O1, O2 и/или O6, где дополнительно эффективное количество полисахаридного антигена O75 вводят в весовом отношении 1:1 к полисахаридному антигену O25.

15. Способ по п. 13 или п. 14, где иммунный ответ ограничивает тяжесть инвазивного заболевания, вызываемого ExPEC, у субъекта или предупреждает его, где предпочтительно инвазивное заболевание, вызываемое ExPEC, включает сепсис и/или бактериемию.

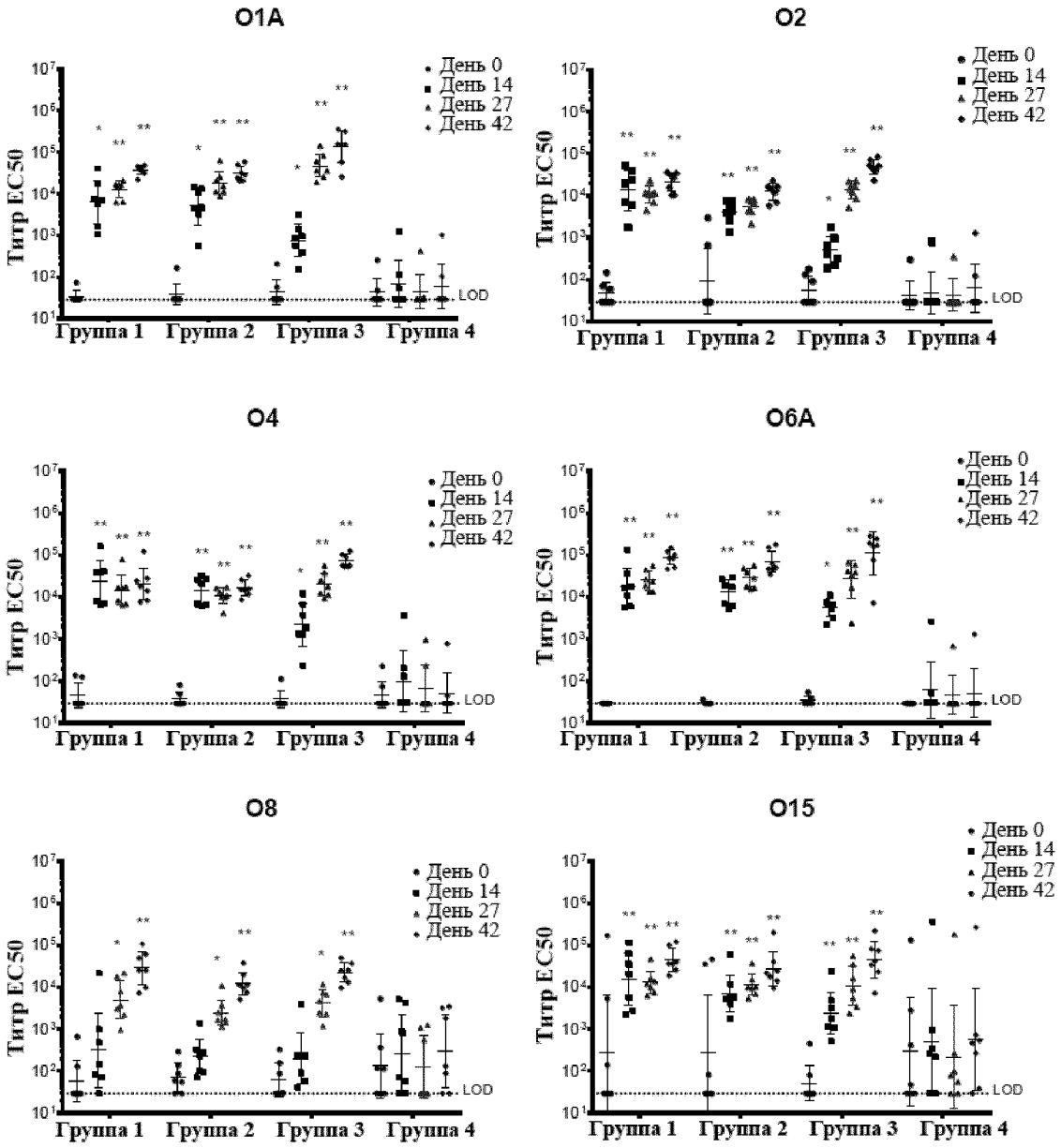
16. Способ по п. 14 или п. 15, где антиген O1 представляет собой O1A, O4 является глюкозилированным, антиген O6 представляет собой O6A, антиген O18 представляет собой O18A, и антиген O25 представляет собой O25B, где предпочтительно полисахаридные антигены O1A, O2, глюкозилированный O4, O6A, O15, O16, O18A, O25B и O75 характеризуются структурами формул (O1A), (O2), (O4-Glc+), (O6A), (O15), (O16), (O18A), (O25B) и (O75) соответственно, как показано в таблице 1, где каждое n независимо представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно от 3 до 50, например, от 5 до 40, предпочтительно от 5 до 30, например, от 7 до 25, например, от 10 до 20, где весовое отношение полисахаридного антигена O75 к полисахаридному антигену O6 составляет от 1,5:1 до 4:1, более предпочтительно 2:1.

17. Способ по любому из пп. 14-16, где полисахаридные О-антигены *E. coli*, вводимые субъекту:
a) состоят из O1, O2, O4, O15, O16, O18, O25, O75 и O6 или
b) дополнительно включают в себя от 1 до 15 дополнительных полисахаридных О-антигенов *E. coli*, каждый из которых независимо ковалентно связан с белком-переносчиком.

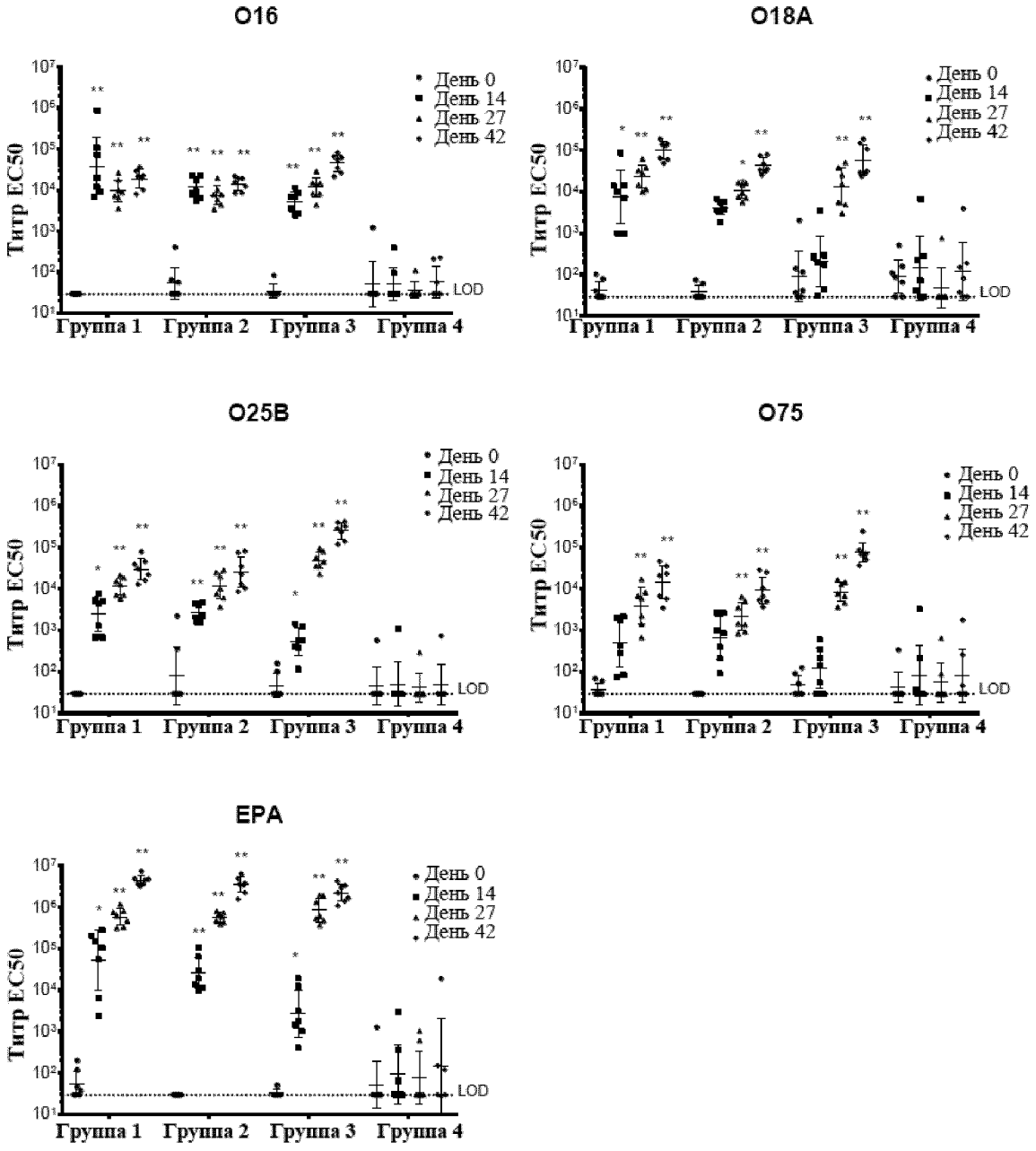
18. Способ по любому из пп. 13-17, где субъект является человеком, у которого имеется инфекция, вызываемая *E. coli* (предпочтительно ExPEC), предпочтительно инвазивное заболевание, вызываемое ExPEC, или который подвержен риску их наличия.

19. Способ по любому из пп. 13-18, где за одно введение вводят 8-16 мкг, предпочтительно 16 мкг, полисахаридного антигена O75.

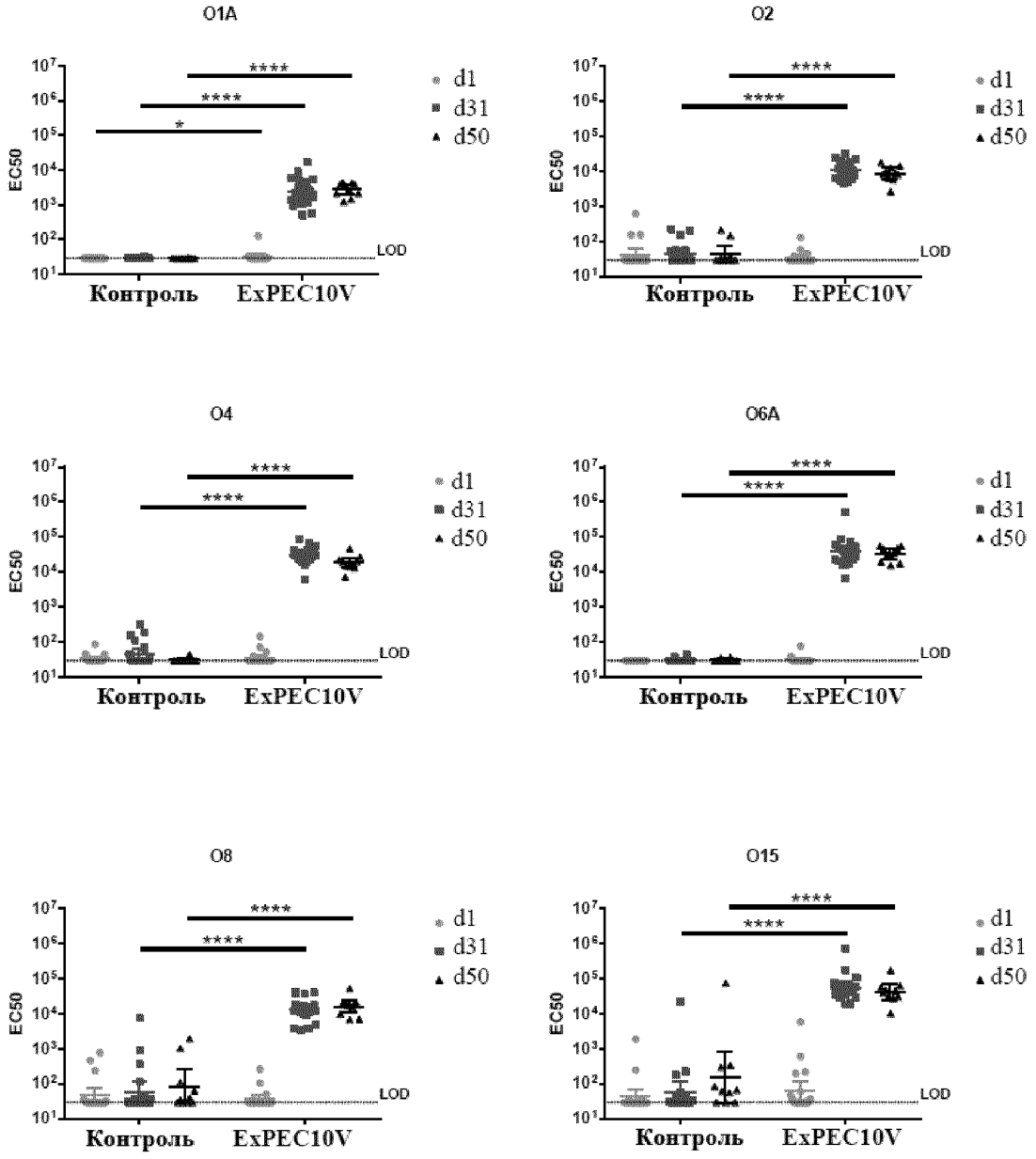
20. Способ по любому из пп. 13-19, где эффективное количество вводимых полисахаридных антигенов O1:O2:O4:O6:O15:O16:O18:O25:O75 *E. coli* вводят в весовом отношении 1:1:1:1:1:1:1:2:2.


O1A
O2
O4
O6A
O8
O15
Титр EC50
День 0
День 14
День 27
День 42
LOD
Группа 1
Группа 2
Группа 3
Группа 4

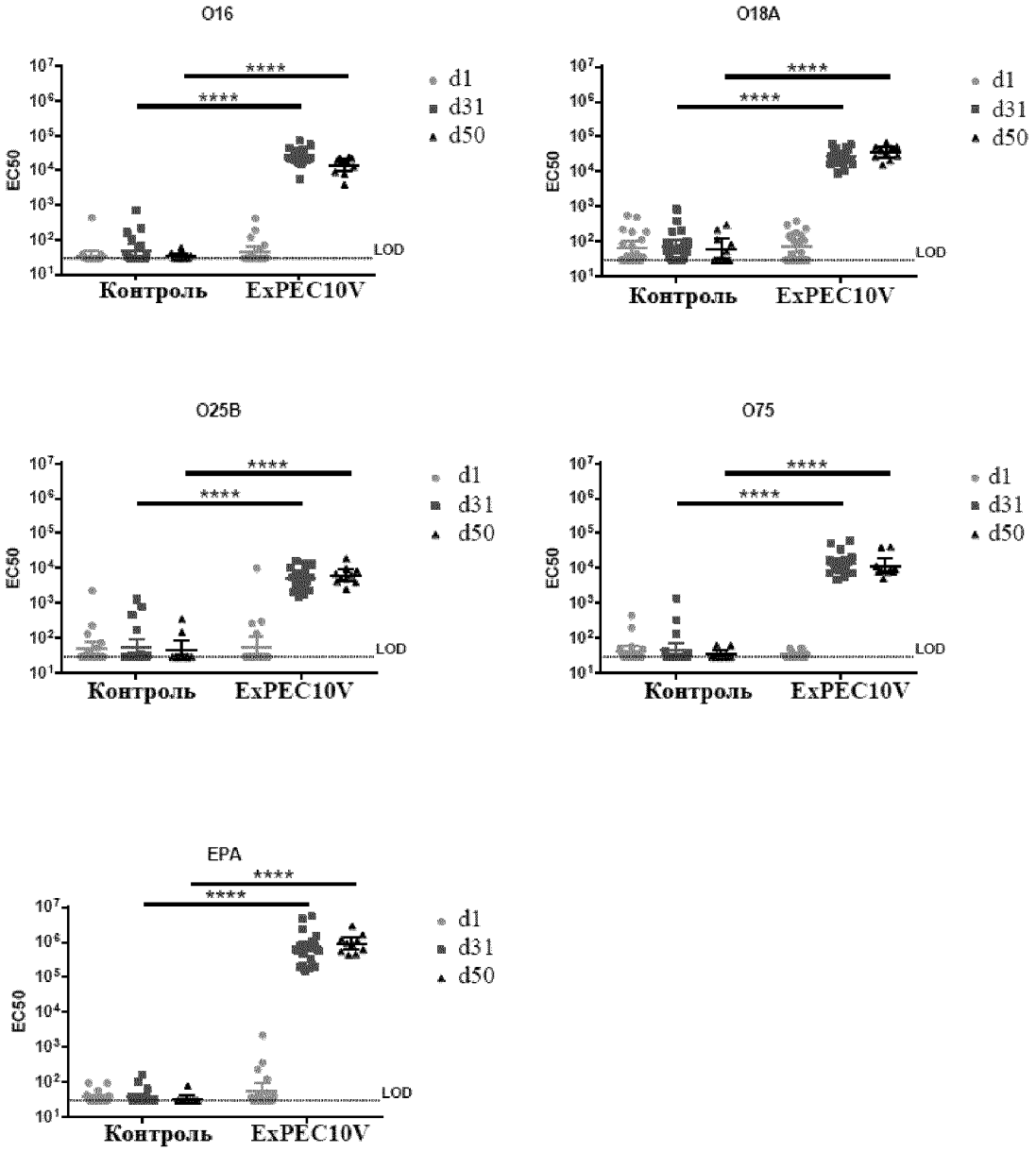
ФИГ. 1



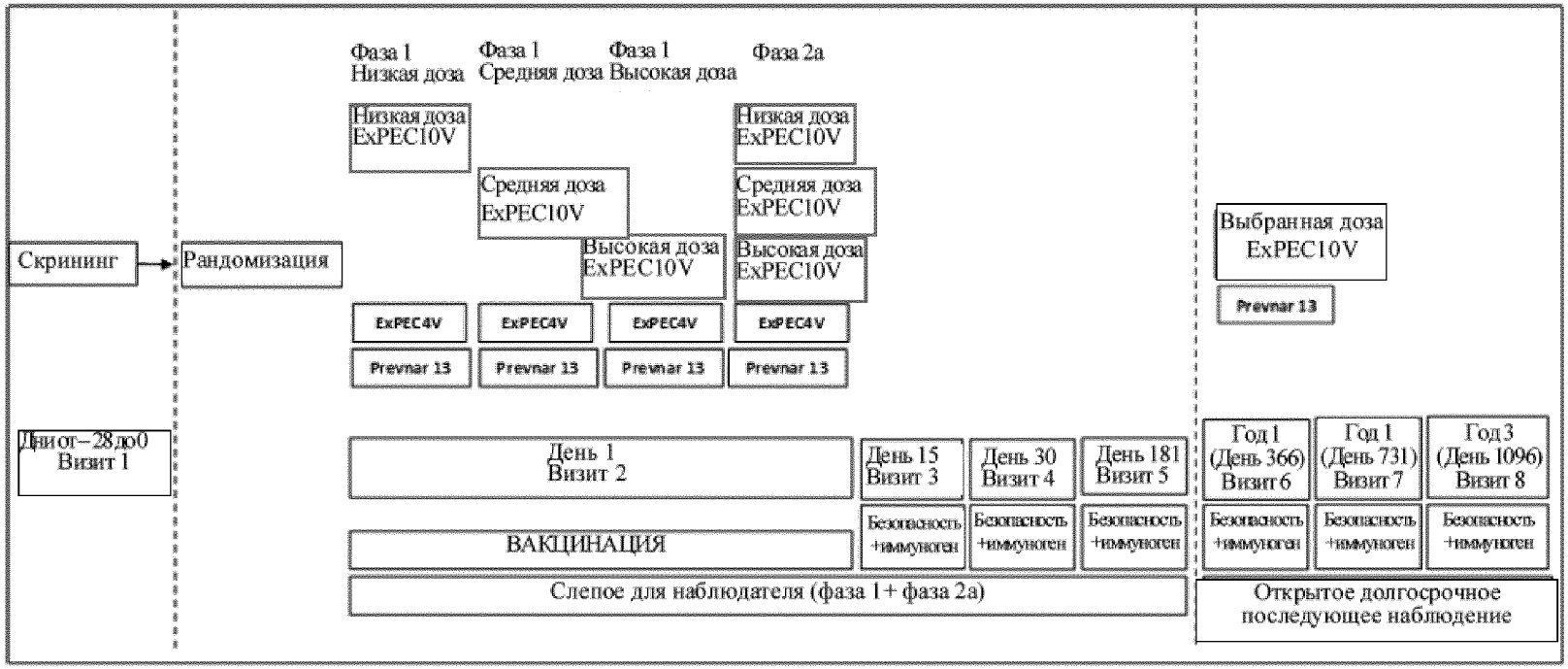
ФИГ. 1, продолжение



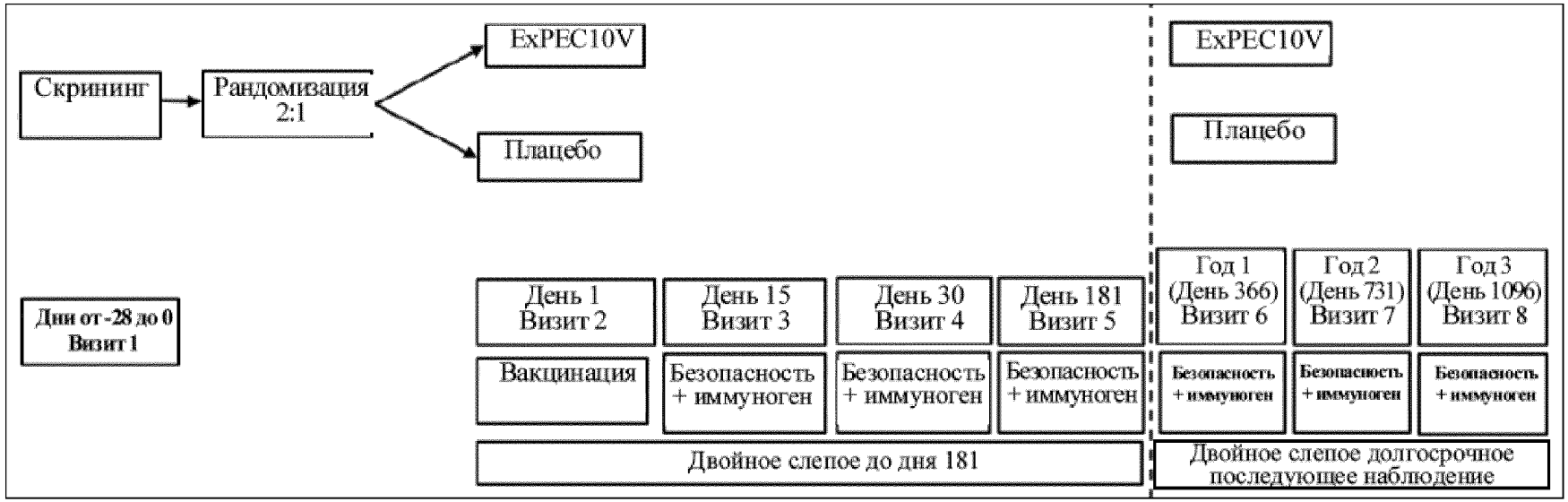
ФИГ. 2



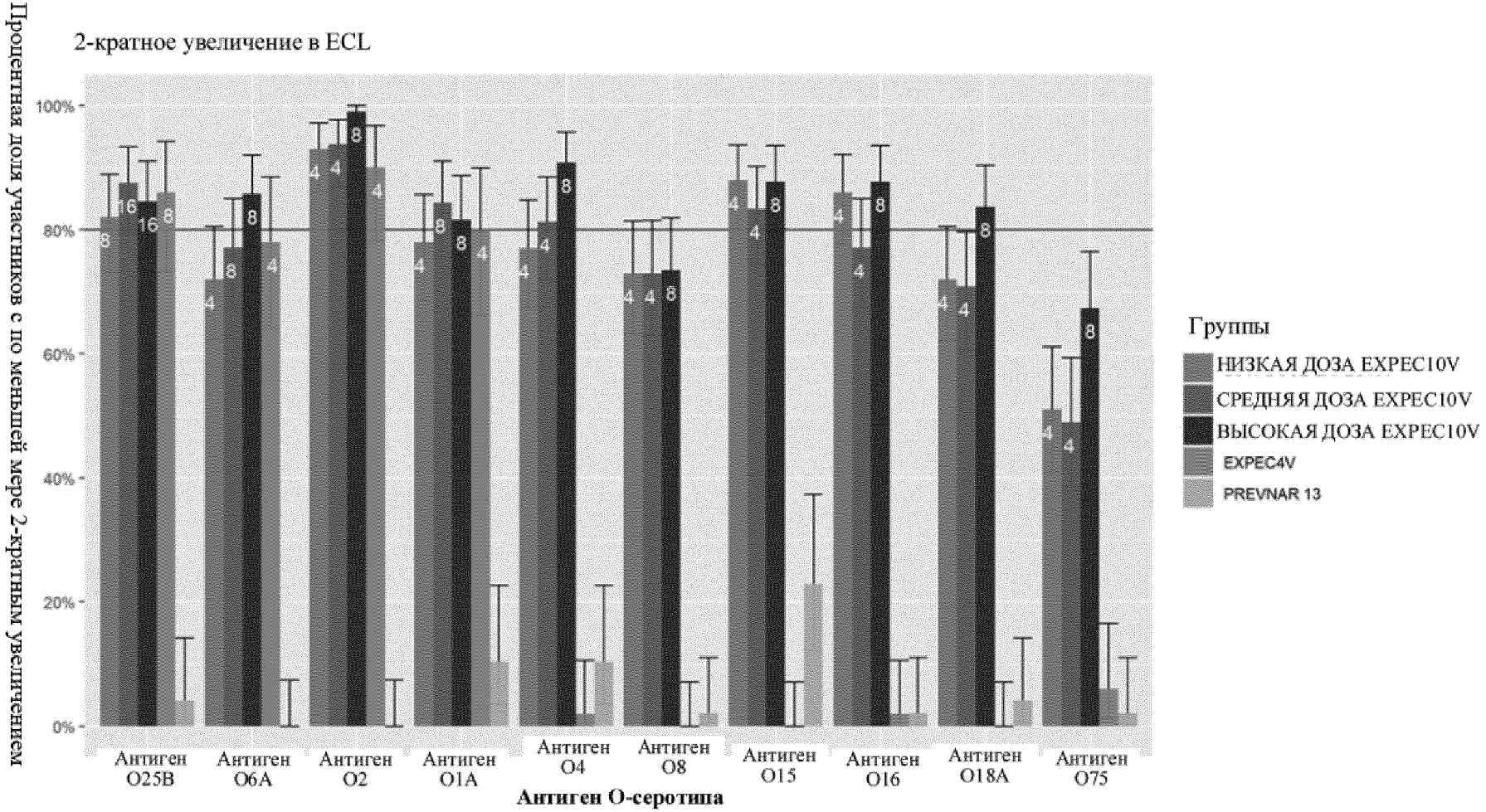
ФИГ. 2, продолжение


Фаза 1
Низкая доза
Фаза 1
Средняя доза
Фаза 1
Высокая доза
Фаза 2а
Скрининг
Рандомизация
Низкая доза ExPEC10V
Средняя доза ExPEC10V
Высокая доза ExPEC10V
Низкая доза ExPEC10V
Средняя доза ExPEC10V
Высокая доза ExPEC10V
ExPEC4V
Prevnar 13
Выбранная доза ExPEC10V
Prevnar 13
Дни от −28 до 0
Визит 1
День 1
Визит 2
День 15
Визит 3
День 30
Визит 4
День 181
Визит 5
Год 1
(День 366)
Визит 6
Год 1
(День 731)
Визит 7
Год 3
(День 1096)
Визит 8
ВАКЦИНАЦИЯ
Безопасность +иммуноген
Слепое для наблюдателя (фаза 1+ фаза 2а)
Открытое долгосрочное последующее наблюдение

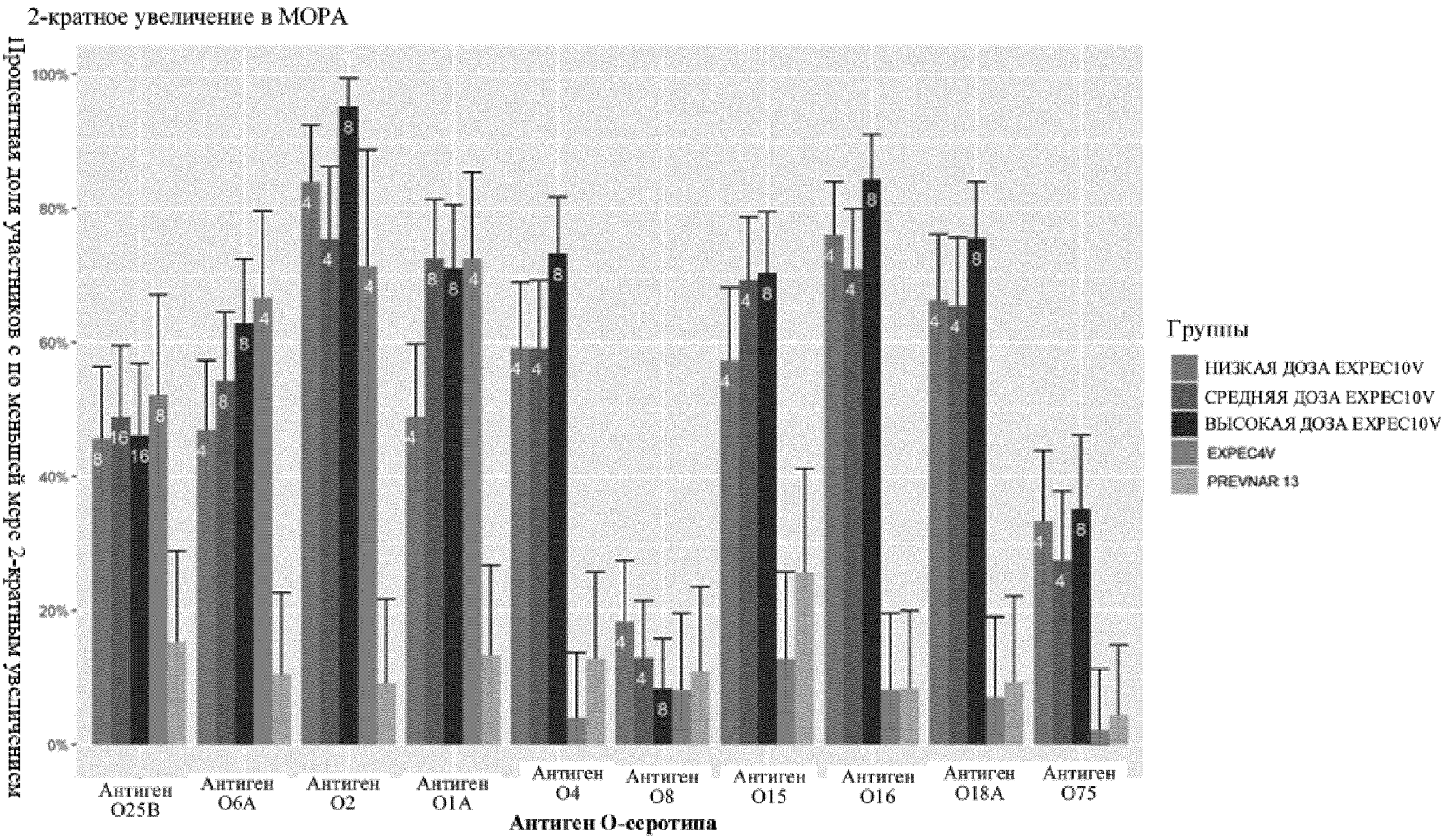
ФИГ. 3А


Скрининг
Рандомизация 2:1
ExPEC10V
Плацебо
ExPEC10V
Плацебо
Дни от -28 до 0
Визит 1
День 1
Визит 2
День 15
Визит 3
День 30
Визит 4
День 181
Визит 5
Год 1
(День 366)
Визит 6
Год 2
(День 731)
Визит 7
Год 3
(День 1096)
Визит 8
Вакцинация
Безопасность + иммуноген
Безопасность + иммуноген
Безопасность + иммуноген
Безопасность + иммуноген
Безопасность + иммуноген
Безопасность + иммуноген
Двойное слепое до дня 181
Двойное слепое долгосрочное последующее наблюдение

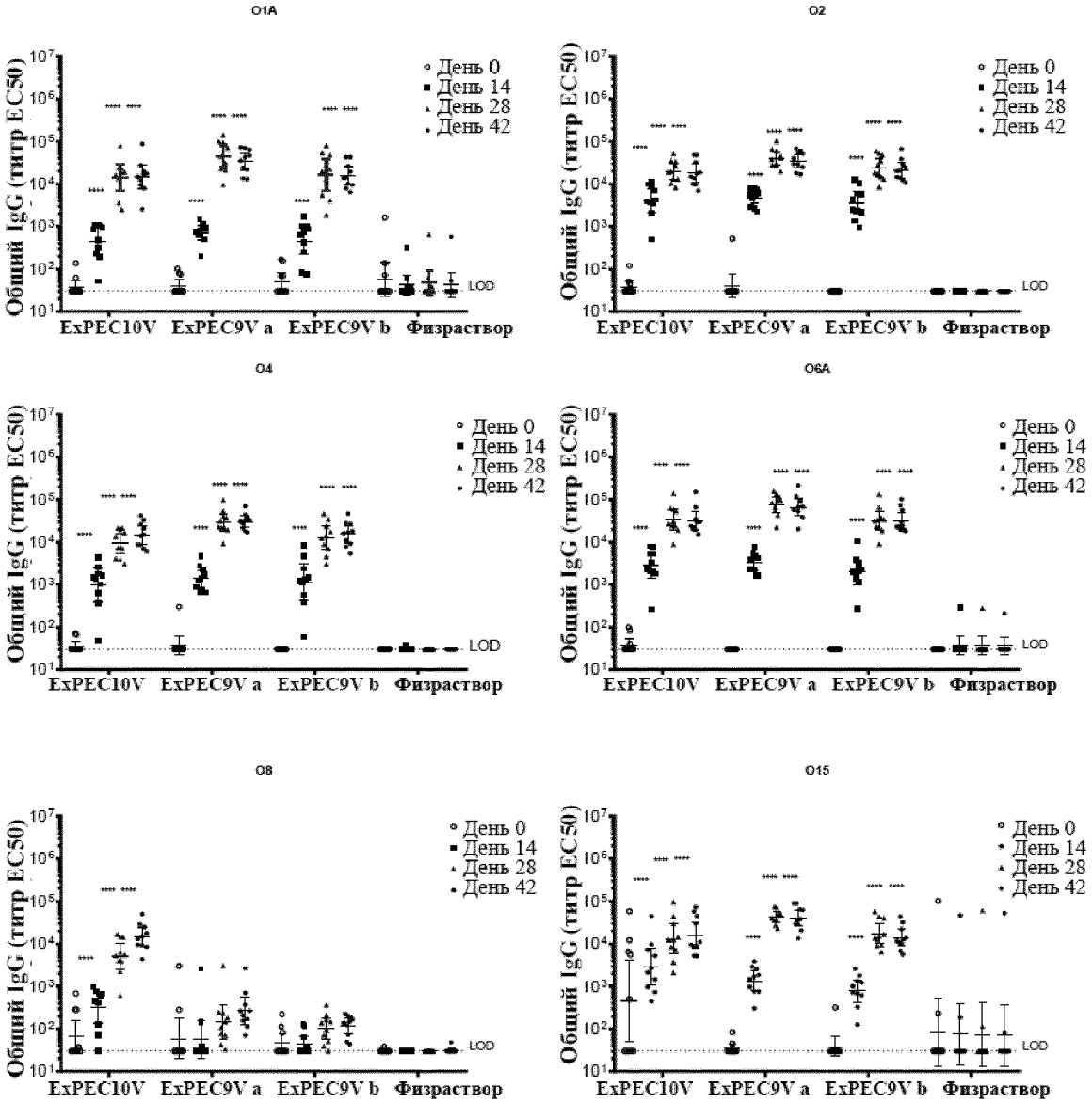
ФИГ. 3B


2-кратное увеличение в ECL
Процентная доля участников с по меньшей мере 2-кратным увеличением
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Антиген O25B
Антиген O6A
Антиген O2
Антиген O1A
Антиген O4
Антиген O8
Антиген O15
Антиген O16
Антиген O18A
Антиген O75
Антиген O-серотипа
Группы
НИЗКАЯ ДОЗА EXPEC10V
СРЕДНЯЯ ДОЗА EXPEC10V
ВЫСОКАЯ ДОЗА EXPEC10V
EXPEC4V
PREVNAR 13

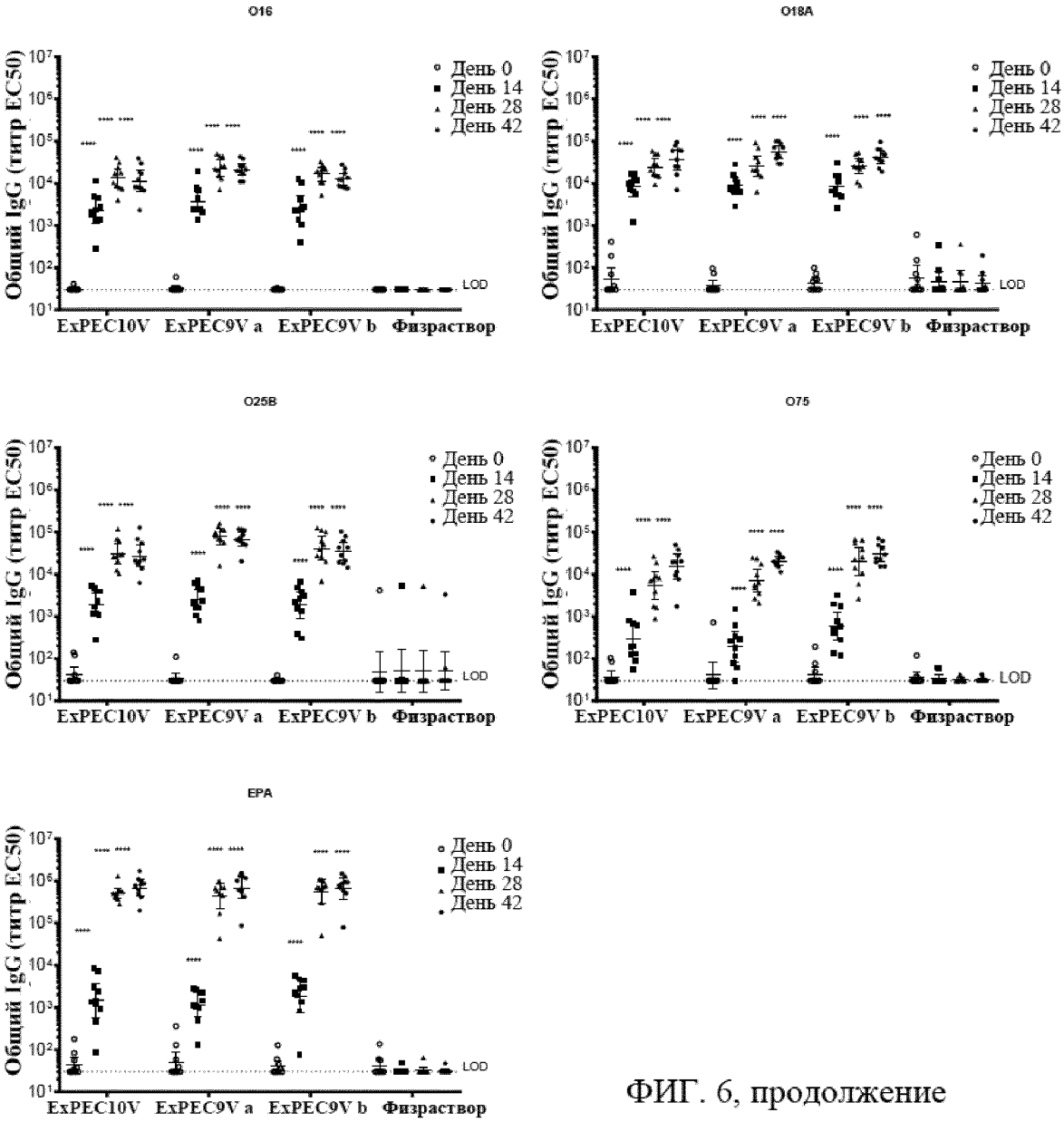
ФИГ. 4


2-кратное увеличение в MOPA
Процентная доля участников с по меньшей мере 2-кратным увеличением
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Антиген O25B
Антиген O6A
Антиген O2
Антиген O1A
Антиген O4
Антиген O8
Антиген O15
Антиген O16
Антиген O18A
Антиген O75
Антиген O-серотипа
Группы
НИЗКАЯ ДОЗА EXPEC10V
СРЕДНЯЯ ДОЗА EXPEC10V
ВЫСОКАЯ ДОЗА EXPEC10V
EXPEC4V
PREVNAR 13

ФИГ. 5


O1A
O2
O4
O6A
O8
O15
Общий IgG (титр EC50)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
LOD
ExPEC10V
ExPEC9V a
ExPEC9V b
Физраствор
День 0
День 14
День 28
День 42

ФИГ. 6



ФИГ. 6, продолжение