(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119454927 A
(43)申请公布日 2025.02.18

(21)申请号 202411689646.5
(22)申请日 2021.09.17
(30)优先权数据
21154782.3 2021.02.02 EP
63/079,734 2020.09.17 US
63/191,471 2021.05.21 US
(62)分案原申请数据
202180049038.6 2021.09.17
(71)申请人 杨森制药公司
地址 美国新泽西州
(72)发明人 J·T·普尔曼 K·C·法埃
M·萨内基 J·戈尔特森
D·R·阿巴纳特
B·G·M·施皮森斯
F·G·F·斯特勒伊夫
(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司 72002
专利代理师 区斌
(51)Int.Cl.
A61K 39/385(2006.01)
A61K 39/108(2006.01)
A61K 39/116(2006.01)
A61P 31/04(2006.01)

权利要求书3页 说明书153页
序列表（电子公布） 附图10页

(54)发明名称

多价疫苗组合物及其用途

(57)摘要

描述了用于诱导针对肠外致病性大肠杆菌(ExPEC)的免疫应答从而提供免疫保护免于与ExPEC相关的疾病的组合物和方法。特别地,描述了使用与载体蛋白共价结合的大肠杆菌多糖抗原O75的缀合物来预防侵袭性ExPEC疾病的组合物和方法。

CN 119454927 A

1.一种组合物,所述组合物包含以下i)-viii)任一项:

i)大肠杆菌075抗原多糖和大肠杆菌01抗原多糖;

ii)大肠杆菌075抗原多糖和大肠杆菌02抗原多糖;

iii)大肠杆菌075抗原多糖和大肠杆菌04抗原多糖;

iv)大肠杆菌075抗原多糖和大肠杆菌06抗原多糖;

v)大肠杆菌075抗原多糖和大肠杆菌015抗原多糖;

vi)大肠杆菌075抗原多糖和大肠杆菌016抗原多糖;

vii)大肠杆菌075抗原多糖和大肠杆菌018抗原多糖;

viii)大肠杆菌075抗原多糖和大肠杆菌025抗原多糖;

其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白。

2.如权利要求1所述的组合物,其中

i)075抗原多糖与01抗原多糖的浓度比为2:1;

ii)075抗原多糖与02抗原多糖的浓度比为2:1;

iii)075抗原多糖与04抗原多糖的浓度比为2:1;

iv)075抗原多糖与06抗原多糖的浓度比为2:1;

v)075抗原多糖与015抗原多糖的浓度比为2:1;

vi)075抗原多糖与016抗原多糖的浓度比为2:1;

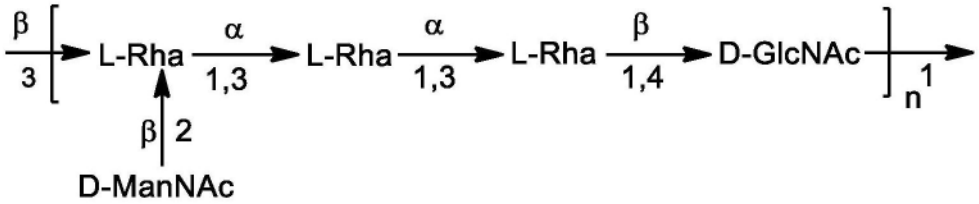
vii)075抗原多糖与018抗原多糖的浓度比为2:1;和/或

viii)075抗原多糖与025抗原多糖的浓度比为1:1。

3.如权利要求1或2所述的组合物,其中所述01抗原为01A,所述04为葡糖基化的,所述06抗原为06A,所述018抗原为018A,和/或所述025抗原为025B。

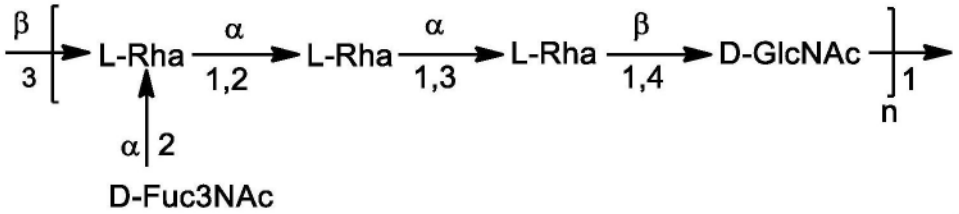
4.如权利要求1-3中任一项所述的组合物,其中:

(i)所述大肠杆菌01抗原多糖包含式(01A)的结构:



,

(ii)所述大肠杆菌02抗原多糖包含式(02)的结构:

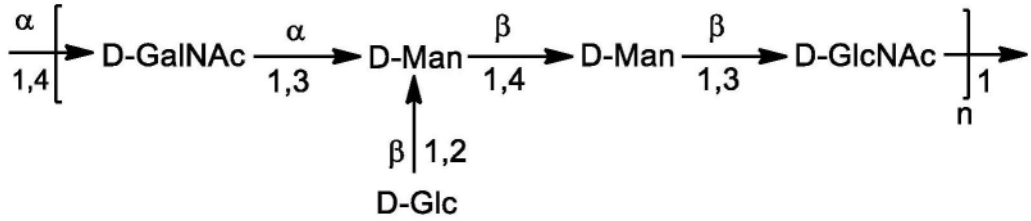


,

(iii)所述大肠杆菌04抗原多糖包含式(04-Glc+)的结构:

,

(iv)所述大肠杆菌06抗原多糖包含式(06A)的结构：

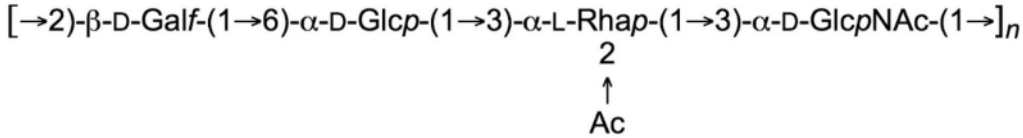


,

(v)所述大肠杆菌015抗原多糖包含式(015)的结构：

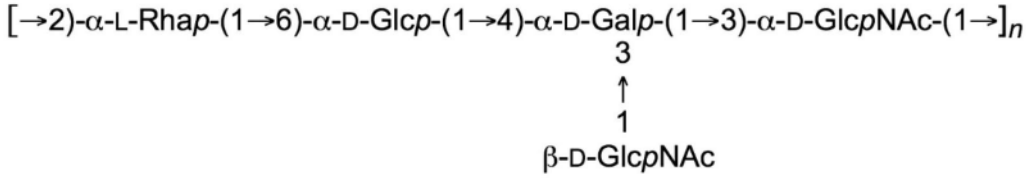
[→2)-β-D-Galp-(1→3)-α-L-FucpNAc-(1→3)-β-D-GlcpNAc-(1→]n,

(vi)所述大肠杆菌016抗原多糖包含式(016)的结构：



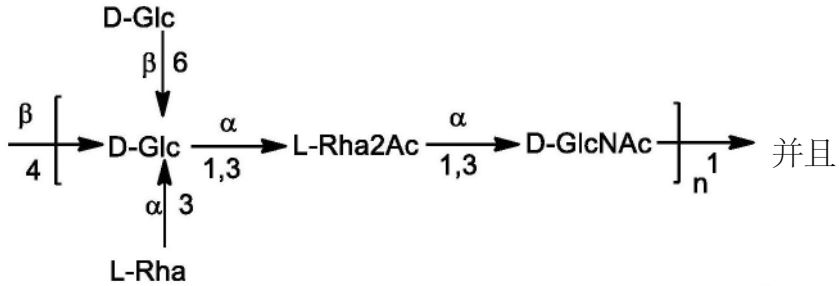
,

(vii)所述大肠杆菌018抗原多糖包含式(018A)的结构：



,

(viii)所述大肠杆菌025抗原多糖包含式(025B)的结构：



并且

,

(ix)所述大肠杆菌075抗原多糖包含式(075)的结构：

,

其中每个n独立地为1至100的整数,优选3至50,例如5至40,优选5至30,例如7至25,例如10至20。

5.如权利要求1-3中任一项所述的组合物,其中所述075抗原多糖的浓度为约8至约50μ

g/mL,优选约12至约40μg/mL,例如约16至约32μg/mL,优选约28至约36μg/mL,优选约32μg/mL。

6.如权利要求1-3中任一项所述的组合物,所述组合物进一步包含至少一种共价连接至载体蛋白的额外大肠杆菌抗原多糖。

7.如权利要求6所述的组合物,其中所述至少一种额外的大肠杆菌抗原多糖包含具有式(O8)的O8抗原多糖:

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

其中n为1至100的整数,优选3至50,例如5至40,优选5至30,例如7至25,例如10至20。

8.如权利要求1-3中任一项所述的组合物,其中每种载体蛋白独立地选自由以下组成的组:铜绿假单胞菌去毒外毒素A(EPA)、大肠杆菌鞭毛蛋白(FliC)、CRM_{197}、麦芽糖结合蛋白(MBP)、白喉类毒素、破伤风类毒素、金黄色葡萄球菌的去毒溶血素A、凝集因子A、凝集因子B、大肠杆菌不耐热肠毒素、大肠杆菌不耐热肠毒素的去毒变体、霍乱毒素B亚基(CTB)、霍乱毒素、霍乱毒素的去毒变体、大肠杆菌Sat蛋白、大肠杆菌Sat蛋白的载客结构域、肺炎链球菌溶血素、钥孔戚血蓝蛋白(KLH)、铜绿假单胞菌PcrV、脑膜炎奈瑟菌的外膜蛋白(OMPC)、以及来自不可分型流感嗜血杆菌的蛋白D。

9.一种宿主细胞(例如重组宿主细胞),所述宿主细胞用于产生共价连接至载体蛋白的大肠杆菌抗原多糖的缀合物,其中所述宿主细胞包含编码能够产生以下的酶(例如糖基转移酶)的核酸:

i)大肠杆菌O75抗原多糖,ii)大肠杆菌O1A抗原多糖,iii)大肠杆菌O2抗原多糖,iv)葡糖基化的或非葡糖基化的大肠杆菌O4抗原多糖,v)大肠杆菌O6A抗原多糖,vi)大肠杆菌O8抗原多糖,vii)大肠杆菌O15抗原多糖,viii)大肠杆菌O16抗原多糖,ix)大肠杆菌O18A抗原多糖,或x)大肠杆菌O25B抗原多糖。

10.如权利要求9所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞天然表达能够产生目的O抗原的核酸,或者使所述宿主细胞表达这样的核酸。

多价疫苗组合物及其用途

[0001] 本申请为申请日为2021年9月17日、申请号为202180049038.6、发明名称为“多价疫苗组合物及其用途”的发明专利申请的分案申请。

背景技术

[0002] 肠外致病性大肠杆菌(ExPEC)与共生大肠杆菌菌株一起通常是人类肠道中无害的栖居生物。然而,ExPEC菌株可能具有用于定植和感染胃肠道外部位从而导致多种严重的侵袭性疾病的毒力因子,这导致每年显著的发病率、死亡率和费用(参见例如,Johnson等人,J Lab Clin Med.[实验室与临床医学杂志]2002;139(3):155-162;Kohler等人,Int J Med Microbiol.[国际医学微生物学杂志]2011;301(8):642-647;Foxman,Am J Med.[美国医学杂志]2002;113增刊1A:5S-13S;以及Russo等人,Microbes Infect.[微生物感染]2003;5(5):449-456)。ExPEC菌株是尿路感染(UTI)的最常见原因。它们也是手术部位感染和新生儿脑膜炎的促成因素(Johnson等人,2002;Russo等人,2003),与腹部和盆腔感染以及医院获得性肺炎有关,偶尔还涉及其他肠外感染,例如骨髓炎、蜂窝组织炎和伤口感染。所有这些主要感染部位都可能导致ExPEC菌血症(Russo等人,2003)。新生儿、老年人和免疫功能低下的患者特别容易受到ExPEC感染,包括侵袭性ExPEC疾病(IED)。

[0003] 细菌对抗生素的耐药性是对抗细菌感染的主要问题,并且多药耐药性(MDR)大肠杆菌菌株正变得越来越普遍(参见例如,Schito等人,2009,Int.J.Antimicrob.Agents[国际抗微生物药剂杂志]34(5):407-413;以及Pitout等人,2012,Expert Rev.Anti.Infect.Ther.[抗感染治疗专家评论]10(10):1165-1176)。ExPEC序列类型131(ST131)的出现和快速全球传播被认为是耐药性(包括多药耐药性)增加的主要驱动因素(Johnson等人,Antimicrob Agents Chemother.[抗微生物药剂与化学疗法]2010;54(1):546-550;Rogers等人,J Antimicrob Chemother.[抗微生物药剂与化学疗法杂志]2011;66(1):1-14)。该克隆存在于所有ExPEC临床分离株的12.5%至30%中,主要表现出血清型O25B:H4,并显示出高水平的氟喹诺酮耐药性,这通常伴随着甲氧苄啶/磺胺甲噁唑耐药性和赋予对头孢菌素的耐药性的超广谱β-内酰胺酶(Rogers等人,2011,以及Banerjee等人,Antimicrob Agents Chemother.[抗微生物药剂与化学疗法]2014;58(9):4997-5004)。

[0004] O抗原血清型基于O多糖抗原的化学结构,该O多糖抗原是革兰氏阴性细菌中脂多糖(LPS)的外膜部分。已经报道了超过180种血清学独特的大肠杆菌O抗原(Stenutz等人,FEMS Microbial Rev.[FEMS微生物学评论]2006;30:382-403),尽管绝大多数ExPEC分离株被归类在不到20种O抗原血清型中。全长大肠杆菌O抗原典型地由附接到高度保守的LPS核心结构的约10至25个重复糖单元组成,每个组分分别由主要在rfb和rfa基因簇中编码的酶独立地合成。O抗原聚合后,典型地可以通过添加乙酰基或葡萄糖残基来修饰O抗原多糖骨架。这些修饰通过产生具有共同多糖骨架但侧枝不同的抗原性不同血清型而有效地增加了血清型的多样性。编码O抗原修饰酶的基因典型地位于染色体上的rfb簇之外,并且在某些情况下,这些基因存在于溶原性噬菌体中。

[0005] ExPEC感染可由任何血清型引起。尽管ExPEC感染中某些血清型的比例过高,但来

自ExPEC分离株的表面多糖仍然表现出相当大的抗原多样性,这使得基于表面多糖的ExPEC疫苗的开发极具挑战性(Russo等人,Vaccine.[疫苗]2007;25:3859-3870)。而且,某些O抗原可能免疫原性较差。此外,根据肺炎球菌结合疫苗的研究,当多种血清型可引起疾病时,疫苗组合物(例如对包含在疫苗中的血清型和所包含血清型的剂量水平的选择)可能至关重要,因为使用针对某些血清型的疫苗可能会潜在地增加疫苗中未包含的血清型的携带以及由未包含的血清型引起的疾病,或者甚至增加疫苗中包含的血清型但在针对该血清型的免疫方面效果不佳的血清型的携带以及由其引起的疾病(Lipsitch,Emerging Infectious Diseases[新发传染病];1999,5:336-345)。理想地,疫苗应最大限度地发挥其在预防由疫苗中包含的血清型引起的疾病方面的有益作用,同时使因非疫苗血清型携带增加而引起的新增疾病的风险最小化。

[0006] 开发疫苗以预防ExPEC感染的努力集中在O抗原多糖缀合物上。通过提取和纯化O抗原多糖以及化学缀合至去毒的铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)外毒素A,合成了12价O抗原结合疫苗,并在1期临床研究中测试了其安全性和免疫原性(Cross等人,J.Infect.Dis.[传染病杂志](1994)第170卷,第834-40页)。这种候选疫苗从未获得临床使用许可。最近在大肠杆菌中开发了一种生物缀合系统,其中多糖抗原和载体蛋白都在体内合成,随后通过寡糖基转移酶PglB(一种在大肠杆菌中表达的空肠弯曲杆菌(Campylobacter jejuni)酶)的活性在体内缀合(Wacker等人,Proc.Nat.Acad.Sci.[美国国家科学院院刊](2006)第103卷,第7088-93页)。这种N连接的蛋白质糖基化系统能够将多种多糖转移到载体蛋白上,从而可以使用简单明了的方法来纯化缀合物。

[0007] 生物缀合已成功地用于生产大肠杆菌四价O抗原候选疫苗的缀合多糖(Poolman和Wacker,J.Infect.Dis.[传染病杂志](2016)第213(1)卷,第6-13页)。然而,成功的ExPEC疫苗的开发需要覆盖主要血清型,并且在ExPEC分离株亚群中存在进一步的O抗原修饰对覆盖展现出未修饰和修饰LPS的分离株提出了进一步的挑战。此外,对包含来自多种血清型的O抗原的疫苗组合物的免疫应答可能因血清型而异。因此,本领域持续需要针对ExPEC的疫苗。特别地,需要一种基于表面多糖的ExPEC疫苗,该疫苗可用于提供针对ExPEC O75血清型和ExPEC中普遍存在的其他血清型的有效免疫保护。

发明内容

[0008] 令人惊讶地发现,当以O抗原(各自与临床试验中具有相同浓度的此类其他O抗原的组合物中的载体蛋白共价结合)的缀合物形式进行测试时,大肠杆菌O75抗原似乎比其他大肠杆菌O抗原(例如,O1、O2和O6)的免疫原性更低。用如下组合物进行疫苗接种提供了针对ExPEC O75血清型和一种或多种额外ExPEC O-血清型的提高的免疫应答,该组合物含有合适的剂量和比率的大肠杆菌O75抗原的缀合物以及一种或多种额外大肠杆菌O抗原的缀合物。

[0009] 因此,在第一个一般方面,本文提供了组合物,该组合物包含大肠杆菌O1、O2、O4、O15、O16、O18、O25、O75和O6抗原多糖,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,并且其中O75和O25抗原多糖中的每一种的浓度相对于O1、O2、O4、O15、O16、O18和O6抗原多糖中的每一种的浓度独立地增加。

[0010] 在某些实施例中,O75抗原多糖独立地与O1、O2、O4、O15、O16、O18和O6抗原多糖中

的每一种的浓度权重比为约1.5:1至约2.5:1。

[0011] 在某些实施例中,075抗原多糖独立地与01、02、04、015、016、018和06抗原多糖中的每一种的浓度权重比为约2:1。

[0012] 在第二个一般方面,本文提供了组合物,该组合物包含大肠杆菌01、02、04、015、016、018、025、075和06抗原多糖,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,并且其中075抗原多糖与01、02和/或06抗原多糖的浓度权重比为约1.5:1至约4:1。优选地,其中075抗原多糖与01、02和/或06的浓度权重比为约2:1。

[0013] 在某些实施例中,075抗原多糖与04、015、016和/或018抗原多糖的浓度权重比为约1.5:1至约4:1。优选地,075抗原多糖与04、015、016和/或018抗原多糖的浓度权重比为约2:1。

[0014] 在第三个一般方面,本文提供了组合物,该组合物包含大肠杆菌01、02、04、015、016、018、025、075和06抗原多糖,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,并且其中075和025抗原多糖中的每一种的浓度相对于01、02、04、015、016、018和06抗原多糖中的每一种的浓度独立地增加,其中075抗原多糖与01、02和/或06抗原多糖的浓度权重比为约1.5:1至约4:1。优选地,075抗原多糖与01、02和/或06抗原多糖的浓度权重比为约2:1。

[0015] 现在描述第一个、第二个和第三个一般方面的某些实施例。

[0016] 在某些实施例中,组合物中075抗原多糖与025抗原多糖的浓度权重比为约1:1。

[0017] 在某些实施例中,大肠杆菌抗原多糖01:02:04:06:015:016:018:025:075的浓度权重比为1:1:1:1:1:1:1:2:2。

[0018] 在某些实施例中,01抗原为01A,04为葡糖基化的,06抗原为06A,018抗原为018A,并且025抗原为025B,其中:

[0019] (i)大肠杆菌01抗原多糖包含表1所示的式(01A)的结构,

[0020] (ii)大肠杆菌02抗原多糖包含表1所示的式(02)的结构:shown in Table 1,

[0021] (iii)大肠杆菌04抗原多糖包含表1所示的式(04-Glc+)的结构,

[0022] (iv)大肠杆菌06抗原多糖包含表1所示的式(06A)的结构,

[0023] (v)大肠杆菌015抗原多糖包含表1所示的式(015)的结构,

[0024] (vi)大肠杆菌016抗原多糖包含表1所示的式(016)的结构,

[0025] (vii)大肠杆菌018抗原多糖包含表1所示的式(018A)的结构,

[0026] (viii)大肠杆菌025抗原多糖包含表1所示的式(025B)的结构,并且

[0027] (ix)大肠杆菌075抗原多糖包含表1所示的式(075)的结构,

[0028] 其中每个n独立地为1至100的整数,优选3至50,例如5至40,优选5至30,例如7至25,例如10至20。

[0029] 在某些实施例中,075抗原多糖的浓度为约8至约64μg/mL,优选约8至约50μg/mL,优选约12至约40μg/mL,优选约16至约32μg/mL,优选约28至约36μg/mL,优选约32μg/mL。

[0030] 在某些实施例中,组合物中存在的大肠杆菌0抗原多糖由01、02、04、015、016、018、025、075和06组成。

[0031] 在某些实施例中,组合物进一步包含至少一种共价连接至载体蛋白的额外大肠杆菌抗原多糖,优选其中该至少一种额外大肠杆菌抗原多糖包含具有表1所示的式(08)的08抗原多糖,其中n是1至100的整数,优选3至50,例如5至40,优选5至30,例如7至25,例如10至

20。

[0032] 在某些实施例中,载体蛋白是铜绿假单胞菌去毒外毒素A(EPA)或CRM_{197},优选EPA。优选地,载体蛋白包含1至20个,如1至10个或2至4个具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的糖基化共有序列,例如具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的共有序列。更优选地,载体蛋白包含四个糖基化共有序列。最优选地,每种载体蛋白均是包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的EPA。

[0033] 在某些实施例中,大肠杆菌抗原多糖通过生物缀合或通过化学缀合共价连接至载体蛋白,优选大肠杆菌抗原多糖通过生物缀合共价连接至载体蛋白,优选多糖共价连接至载体蛋白中糖基化位点中的Asn残基。

[0034] 在另一方面,提供了在受试者中诱导针对大肠杆菌、优选肠外致病性大肠杆菌(ExPEC)的免疫应答的方法,该方法包括向该受试者施用本发明的组合物。

[0035] 在另一方面,提供了在受试者中诱导针对大肠杆菌、优选肠外致病性大肠杆菌(ExPEC)的免疫应答的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的大肠杆菌01、02、04、015、016、018、025、075和06抗原多糖中的每一种,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,其中075和025抗原多糖中的每一种的有效量相对于01、02、04、015、016、018和06抗原多糖中的每一种的有效量独立地增加。

[0036] 在根据本发明方法的某些实施例中,有效量的075抗原多糖以与01、02、04、015、016、018和06抗原多糖中的每一种的独立地为约1.5:1至约2.5:1、优选约2:1的权重比施用。

[0037] 在根据本发明方法的某些实施例中,有效量的075抗原多糖以与01、02和/或06抗原多糖的独立地为约1.5:1至约4:1、优选约2:1的权重比施用,进一步优选地,其中有效量的075抗原多糖以与025抗原多糖的权重比为约1:1施用。

[0038] 在另一方面,提供了在受试者中诱导针对大肠杆菌、优选肠外致病性大肠杆菌(ExPEC)的免疫应答的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的大肠杆菌01、02、04、015、016、018、025、075和06抗原多糖中的每一种,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,有效量的075抗原多糖以与01、02和/或06抗原多糖的独立地为1.5:1至约4:1的权重比施用。有效量的075抗原多糖可以优选地以与025抗原多糖的约1:1的权重比施用。优选地,有效量的075抗原多糖以与01、02和/或06抗原多糖的独立地为约2:1的权重比施用。

[0039] 下文提供了本发明的任何方法方面的实施例。

[0040] 在根据本发明方法的某些实施例中,免疫应答限制了受试者中侵袭性ExPEC疾病的严重性或预防了该疾病,优选其中该侵袭性ExPEC疾病包括脓毒症和/或菌血症。

[0041] 在根据本发明方法的某些实施例中,01抗原为01A,04为葡糖基化的,06抗原为06A,018抗原为018A,并且025抗原为025B。优选地,01A、02、葡糖基化04、06A、015、016、018A、025B和075抗原多糖分别包含如表1所示的式(01A)、(02)、(04-Glc+)、(06A)、(015)、(016)、(018A)、(025B)和(075)的结构,其中每个n独立地为1至100的整数,优选3至50,例如5至40,优选5至30,例如7至25,例如10至20,其中075抗原多糖与06抗原多糖的权重比为约1.5:1至约4:1,更优选约2:1。

[0042] 在根据本发明方法的某些实施例中,向受试者施用的大肠杆菌O抗原多糖由01、02、04、015、016、018、025、075和06组成。

[0043] 在根据本发明方法的某些实施例中,向受试者施用的大肠杆菌O抗原多糖进一步

包含1至15种额外大肠杆菌O抗原多糖,每一种独立地共价连接至载体蛋白。

[0044] 在根据本发明方法的某些实施例中,受试者是患有大肠杆菌(优选ExPEC)感染、优选侵袭性ExPEC疾病或有患其风险的人。

[0045] 在根据本发明方法的某些实施例中,针对每次施用,施用8-16μg、优选约16μg的075抗原多糖。

[0046] 在根据本发明方法的某些实施例中,所施用的有效量的大肠杆菌抗原多糖01:02:04:06:015:016:018:025:075以1:1:1:1:1:1:1:2:2的权重比施用。

附图说明

[0047] 当结合附图阅读时,将更好地理解前述概述以及本发明的以下详述。应理解的是本发明不限于附图中示出的准确实施例。

[0048] 图1显示在新西兰白兔中由ExPEC10V疫苗诱导的抗体应答。动物接受3次肌内ExPEC10V免疫或生理盐水,间隔2周施用。ExPEC10V疫苗以3种不同浓度施用(组1:高剂量,组2:中等剂量,以及组3:低剂量,表11),对照组仅接受生理盐水(组4,0.9%(w/v)氯化钠溶液)。在第0天(疫苗接种前)以及第14、27和42天(疫苗接种后)通过ELISA测量抗体水平。显示了个体滴度(EC50滴度)和几何平均滴度(GMT)±95% CI。使用威尔科克森(Wilcoxon)秩和检验与邦费罗尼(Bonferroni)校正进行多重比较。将接种ExPEC10V的动物(组1、2和3)与生理盐水对照(组4)进行比较。*p≤0.05,**p≤0.01;***p≤0.001;****p≤0.0001。LOD:检测限。

[0049] 图2显示由ExPEC10V诱导的抗体应答。新西兰白兔接受3次肌内ExPEC10V免疫(105.6μg总多糖)或0.9%w/v氯化钠溶液(对照)。在第1天(免疫前,n=20只/组)、第31天(免疫后,n=20只/组)和第50天(免疫后,n=10只/组),通过ELISA测定IgG滴度。小图显示每组的个体滴度和几何平均值±95%置信区间。使用具有似然比检验的Tobit模型分析ExPEC10V和对照组之间的IgG滴度差异。P值≤0.05被认为是显著的。*P≤0.05,****P≤0.0001。

[0050] 图3A-图3B显示在人类中使用ExPEC10V疫苗进行的1/2a期临床试验的总体研究设计。图3A显示群组1的总体研究设计,图3B显示群组2的总体研究设计。详见实例7。

[0051] 图4显示在BAC1001临床试验中在疫苗接种后第15天的血清O抗原特异性抗体滴度比基线(第1天)测量值增加至少2倍的参与者的百分比(详见实例7)。通过基于ECL的免疫测定法测量O抗原特异性血清抗体滴度。

[0052] 图5显示在BAC1001临床试验中在疫苗接种后第15天的血清调理吞噬性抗体滴度比基线(第1天)测量值增加至少2倍的参与者的百分比(详见实例7)。通过MOPA测量血清调理吞噬性抗体的水平。

[0053] 图6显示在新西兰白兔中由不同的ExPEC疫苗组合物诱导的血清抗体水平(总IgG)。详见实例8。各小图显示个体滴度(EC50滴度)和几何平均滴度(GMT)±95%置信区间。使用具有似然比检验的Tobit模型对疫苗组与生理盐水对照之间的比较进行统计学评估,并使用邦费罗尼校正进行多重比较。p值≤0.05被认为是统计学上显著的。****p≤0.0001。

具体实施方式

[0054] 在背景和整个说明书中引用或描述了各种出版物、文章和专利;这些参考文献中的每一篇通过引用以其全文并入本文。包括在本说明书中的对文件、法案、材料、装置、制品等的讨论是出于提供本发明的背景的目的。这种讨论不承认任何或所有这些事项形成关于所披露或要求保护的任何发明的现有技术的一部分。

[0055] 除非另外定义,否则本文使用的所有科学和技术术语具有本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。否则,本文引用的某些术语具有如说明书中阐述的含义。必须注意,除非上下文另外明确规定,否则如本文和所附权利要求书中所使用,单数形式“一个/一种(a/an)”和“该”包括复数指示物。

[0056] 除非另外指明,否则在一系列要素前面的术语“至少”应被理解为指该系列中的每一个要素。

[0057] 当结合数字使用时,术语“约”是指在引用的数字的±10%(例如±5或±1%)内的任何数字。

[0058] 本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验便确定本文所述的本发明的特定实施例的许多等效物。这些等效物也旨在包括在本发明中。

[0059] 贯穿本说明书和以下权利要求,除非上下文另有要求,否则词语“包含(comprise)”以及变化形式如“包含(comprises)”和“包含(comprising)”将理解为隐含包括所陈述的整体或步骤或一组整体或步骤,但不排除任何其他整体或步骤或任何其他组整体或步骤。当在本文中使用时,术语“包含(comprising)”可以被术语“含有(containing)”或“包括(including)”替代或者当在本文中使用时有时被术语“具有(having)”替代。

[0060] 当在本文中使用时,“由……组成”不包括未在权利要求要素中指定的任何要素、步骤或成分。当在本文中使用时,“基本上由……组成”并不排除不会实质性地影响权利要求的基本和新颖特征的材料或步骤。无论何时本文在本发明的一个方面或实施例的上下文中使用时,前述术语“包含(comprising)”、“含有(containing)”、“包括(including)”和“具有(having)”中的任一种可以被术语“由……组成(consisting of)”或“基本上由……组成”替代以改变本披露内容的范围。

[0061] 如本文所用,多个引用的要素之间的连接术语“和/或”应被理解为涵盖单独的和组合的选项两者。例如,当两种要素由“和/或”连接时,第一选项是指在没有第二要素的情况下第一要素的适用性。第二选项是指在没有第一要素的情况下第二要素的适用性。第三选项是指第一要素和第二要素一起的适用性。这些选项中的任一种应被理解为落入该含义内,因此满足如本文所用的术语“和/或”的要求。这些选项中的多于一种的同时适用性也应被理解为落入该含义内,因此满足术语“和/或”的要求。

[0062] 如本文所用,术语“O多糖”、“O抗原(O-antigen)”、“O抗原(O-antigen)”、“O抗原多糖”、“O多糖抗原”、以及缩写“OPS”都是指革兰氏阴性菌的O抗原,它是脂多糖(LPS)的组分,并且对革兰氏阴性菌的每一种血清型或血清(亚)型具有特异性。O抗原通常包含二至七个糖残基的重复单元(RU)。如本文所用,RU被设定为等于生物学重复单元(BRU)。BRU描述了O抗原的RU,因为它在体内合成。不同血清型的大肠杆菌表达不同的O抗原。在大肠杆菌中,参与O抗原生物发生的基因产物由rfb基因簇编码。除非另有说明,否则本文中每当提及O抗原多糖时,均可指各个大肠杆菌血清型的O抗原多糖及其任何存在的血清亚型,例如,当提及

01抗原多糖时,其可以是大肠杆菌血清亚型01A、01A1、01B或01C的O抗原多糖,同时025抗原多糖可以意指025A或025B抗原多糖等。WO 2020/039359(通过引用并入本文)的表1中提供了许多大肠杆菌血清型和血清亚型以及其O抗原多糖的RU(部分结构或O单元)的相应结构。

[0063] 如本文所用,“rfb簇”和“rfb基因簇”是指编码能够合成O抗原骨架结构的酶机制的基因簇。术语rfb簇可以适用于任何O抗原生物合成簇,并且优选地是指来自埃希氏杆菌属(Escherichia)、特别是大肠杆菌的基因簇。

[0064] 如本文所用,术语“01A”是指大肠杆菌的01A抗原(大肠杆菌血清型01的血清亚型)。术语“02”是指大肠杆菌的02抗原(大肠杆菌血清型02)。术语“04”是指大肠杆菌的04抗原(大肠杆菌血清型04)。术语“06A”是指大肠杆菌的06A抗原(大肠杆菌血清型06的血清亚型)。术语“08”是指大肠杆菌的08抗原(大肠杆菌血清型08)。术语“015”是指大肠杆菌的015抗原(大肠杆菌血清型015)。术语“016”是指大肠杆菌的016抗原(大肠杆菌血清型016)。术语“018A”是指大肠杆菌的018A抗原(大肠杆菌血清型018的血清亚型)。术语“025B”是指来自大肠杆菌的025B抗原(大肠杆菌血清型025的血清亚型)。术语“075”是指大肠杆菌的075抗原(大肠杆菌血清型075)。如本文所用,术语“葡糖基化04”、“葡萄糖支化04”、“04 Glc+”和“Glc+04”O抗原是指具有葡萄糖侧枝的大肠杆菌04 O抗原(大肠杆菌血清型04),而“非葡糖基化04”、“04 Glc-”和“Glc-04”是指没有葡萄糖侧枝的04抗原。

[0065] 本申请中提及的几种大肠杆菌O抗原多糖的结构如下表1所示。示出了每种大肠杆菌O抗原多糖的单个重复单元。

[0066] 表1:大肠杆菌O抗原多糖的结构

大肠杆菌 O 抗原多糖	重复单元的结构[1]
O1A 抗原多糖（O1A）	[→3)-α-L-Rha*p*-(1→3)-α-L-Rha*p*-(1→3)-β-L-Rha*p*-(1→4)-β-D-Glc*p*NAc-(1→]$_n$ 2 ↑ 1 β-D-Man*p*NAc
O2 抗原多糖（O2）	[→3)-α-L-Rha*p*-(1→2)-α-L-Rha*p*-(1→3)-β-L-Rha*p*-(1→4)-β-D-Glc*p*NAc-(1→]$_n$ 2 ↑ 1 α-D-Fuc*p*3NAc
非葡糖基化 O4 抗原多糖（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→]$_n$
葡糖基化 O4 抗原多糖（O4-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→]$_n$
O6A 抗原多糖（O6A）	[→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*
O8 抗原多糖（O8）	α-D-Man*p*3Me-(1→[3)-β-D-Man*p*-(1→2)-α-D-Man*p*-(1→2)-α-D-Man*p*-(1→]$_n$
O15 抗原多糖（O15）	[→2)-β-D-Gal*p*-(1→3)-α-L-Fuc*p*NAc-(1→3)-β-D-Glc*p*NAc-(1→]$_n$
O16 抗原多糖（O16）	[→2)-β-D-Gal*f*-(1→6)-α-D-Glc*p*-(1→3)-α-L-Rha*p*-(1→3)-α-D-Glc*p*NAc-(1→]$_n$ 2 ↑ Ac
O18A 抗原多糖（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

[0067]

[0068]

O25B 抗原多糖 （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*
O75 抗原多糖 （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→]$_n$

[0069] [1]每个n独立地为1至100的整数,例如1-50、1-40、1-30、1-20和1-10、3-50、3-40、5-30,例如至少5,例如5-40,例如7-30,例如7至25,例如10至20,但在一些情况下可以是1-2。

[0070] 本文所述的所有单糖均具有本领域已知的它们的常用含义。单糖可以具有D或L构型。如果未指定D或L,则糖被理解为具有D构型。单糖典型地由本领域公知和使用的缩写表示。例如,Glc是指葡萄糖;D-Glc是指D-葡萄糖;并且L-Glc是指L-葡萄糖。单糖的其他常见缩写包括:Rha,鼠李糖;GlcNAc,N-乙酰葡糖胺;GalNAc,N-乙酰半乳糖胺;Fuc,岩藻糖;Man,甘露糖;Man3Me,3-O-甲基-甘露糖;Gal,半乳糖;FucNAc,N-乙酰岩藻糖胺;以及Rib,核糖。后缀“f”是指呋喃糖,后缀“p”是指吡喃糖。

[0071] 关于O抗原使用的术语“RU”、“重复单元(repeat unit和repeating unit)”是指O抗原的生物学重复单元(BRU),因为它是在体内通过细胞机制(例如,糖基转移酶)合成的。O抗原的RU数量可以根据血清型而变化,并且在本发明的实施例中典型地从约1-100个RU变化,优选约1至50个RU,例如1-50个RU、1-40个RU、1-30个RU、1-20个RU和1-10个RU,并且更优选至少3个RU、至少4个RU、至少5个RU,例如3-50个RU,优选5-40个RU,优选5-30个RU,例如7-25个RU,例如10-20个RU。然而,在一些情况下,O抗原的RU数量可以是1-2。本文具体描述的每个O抗原的结构显示为含有一个RU,带有表示RU的数量的变量“n”。在本发明的生物缀合物中的每个O抗原多糖中,n独立地为1-100的整数,例如1-50、1-40、1-30、1-20、1-10,优选至少3,更优选至少5,例如3-50,优选5-40(例如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或40),更优选5-30,但在一些情况下可以是1-2。在一些实施例中,n独立地为约7-25的整数,例如约10-20。这些值可以在组合物中的各个O抗原多糖之间变化,并且在本文中作为平均值提供,即,如果生物缀合物在本文中被描述为具有独立为5-40的整数的n,则该组合物含有大部分具有5-40个重复单元的O抗原多糖,但也可能含有一些具有少于5个或超过40个重复单元的O抗原多糖。

[0072] 如本文所用,术语“缀合物”和“糖缀合物”是指糖或糖抗原(例如,寡糖和多糖)-蛋白质缀合物,其连接至另一种化学物质,该另一种化学物质包括但不限于蛋白质、肽、脂质等。糖缀合物可以化学地制备,例如通过蛋白质和糖或糖抗原的化学(合成)连接。术语糖缀合物还包括生物缀合物。

[0073] 如本文所用,在根据本发明实施例的方法中向受试者施用O抗原的背景下,术语“有效量”是指足以在该受试者中诱导所希望的免疫作用或免疫应答的O抗原的量。在某些实施例中,“有效量”是指足以在受试者中产生免疫力以在该受试者中实现一种或多种以下作用的O抗原的量:(i)预防ExPEC感染、优选侵袭性ExPEC疾病或与其相关的症状的发展或发作;(ii)预防ExPEC感染、优选侵袭性ExPEC疾病或与其相关的症状的复发;(iii)预防ExPEC感染、优选侵袭性ExPEC疾病或与其相关的症状,降低或改善其严重性;(iv)减少ExPEC感染、优选侵袭性ExPEC疾病或与其相关的症状的持续时间;(v)预防ExPEC感染、优选侵袭性ExPEC疾病或与其相关的症状的进展;(vi)引起ExPEC感染或与其相关的症状的消退;(vii)预防或减少与ExPEC感染相关的器官衰竭;(viii)降低患有ExPEC感染的受试者住院的可能性或频率;(ix)减少患有ExPEC感染的受试者的住院时间;(x)增加患有ExPEC感染、优选侵袭性ExPEC疾病的受试者的存活率;(xi)消除ExPEC感染、优选侵袭性ExPEC疾病;(xii)抑制或减少ExPEC复制;和/或(xii)增强或提高另一种疗法的一种或多种预防性或治疗性作用。

[0074] “有效量”可以根据多种因素而变化,如受试者的身体状况、年龄、体重、健康状况等;施用途径,如口服或肠胃外;所施用的组合物,如目标O抗原、其他共同施用的O抗原、佐剂等;以及需要免疫力的特定疾病。当O抗原共价结合至蛋白载体时,仅基于缀合物中的O抗原多糖部分来计算O抗原的有效量。如本文所述的缀合物(包括生物缀合物)的所有浓度、量和比率也仅基于缀合物中O抗原多糖部分的重量计算,而不管任何缀合的载体蛋白的浓度、量或比率,除非另有说明。例如,施用16μg的特定生物缀合物意味着所施用的生物缀合物包含16μg的特定O抗原多糖,并且缀合的载体蛋白的量不包括在该数字中。又例如,如果说组合物包含比率为2:1的来自血清型A和B的O抗原多糖的缀合物,则表明在组合物中,基于缀合的O抗原多糖的重量,不考虑缀合的载体蛋白的重量,缀合的O抗原多糖A的浓度或量是缀合的O抗原多糖B的浓度或量的两倍。

[0075] 如本文所用的术语“侵袭性肠外致病性大肠杆菌(ExPEC)疾病(IED)”是一种与全身细菌感染并存的急性疾病,其通过从血液或其他通常无菌的身体部位中分离和鉴定大肠杆菌、或通过从存在侵袭性疾病(全身炎症反应综合征(SIRS)、脓毒症或脓毒症休克)的体征和症状且没有其他可鉴别感染源的患者的尿液中分离和鉴定大肠杆菌来被微生物学证实。在某些实施例中,IED是一种与全身细菌感染并存的急性疾病,其通过(i)从血液或其他通常无菌的身体部位分离和鉴定大肠杆菌,或通过(ii)从由于宿主对源自泌尿道和/或男性生殖器官的感染的应答失调而具有危及生命的器官功能障碍并且没有其他可鉴别感染源的患者的尿液中分离和鉴定大肠杆菌来被微生物学证实。

[0076] IED可以包括但不一定限于尿路感染(UTI)、手术部位感染、腹部或盆腔感染、肺炎、骨髓炎、蜂窝组织炎、脓毒症、菌血症、伤口感染、肾盂肾炎、前列腺活检相关感染(如经直肠超声引导的前列腺穿刺活检[TRUS-PNB]相关感染)、尿脓毒症、脑膜炎、腹膜炎、胆管炎、软组织感染、脓性肌炎、脓毒性关节炎、眼内炎、化脓性甲状腺炎、鼻窦炎、心内膜炎、中性粒细胞减少性发热和前列腺炎(包括但不限于急性细菌性前列腺炎[ABP])。

[0077] 在某些优选的实施例中,IED包括脓毒症。在某些优选的实施例中,IED包括菌血症。在某些实施例中,本发明提供了用于预防由大肠杆菌引起的脓毒症的根据本发明的组合物。在某些实施例中,本发明提供了用于预防由大肠杆菌引起的菌血症的根据本发明的

组合物。

[0078] 术语“符合脓毒症标准的IED事件”表示一种IED病例,其包括由于宿主对感染的应答失调而具有危及生命的器官功能障碍的证据。如果序贯器官衰竭估计(Sequential Organ Failure Assessment,SOFA)总评分从基线出现2分或更高的急剧变化,则IED病例符合脓毒症标准并被视为继发于IED。在某些实施例中,本发明提供了用于预防符合脓毒症标准的IED的根据本发明的组合物。如本文所用的术语“尿脓毒症”是由源自泌尿生殖道和/或男性生殖器官的感染引起的脓毒症。

[0079] 术语“菌血症IED”是一种IED病例,其包括从血液中分离和鉴定大肠杆菌。在某些实施例中,本发明提供了用于预防菌血症IED的根据本发明的组合物。

[0080] 如本文所用,对抗原或组合物的“免疫学应答”或“免疫应答”是指在受试者中发展对该抗原或该组合物中存在的抗原的体液和/或细胞免疫应答。

[0081] 如本文所用,包含多于一种大肠杆菌抗原多糖的“组合物”可以是在同一药物组合物中包含多于一种大肠杆菌抗原多糖的单一药物组合物,或在单独的药物组合物中包含多于一种大肠杆菌抗原多糖的多于一种药物组合物的组合。在优选的实施例中,组合物是单一药物组合物。在诱导对大肠杆菌的免疫应答的方法中,包含多于一种大肠杆菌抗原多糖的“组合物”能以包含多于一种大肠杆菌抗原多糖的单一药物组合物施用于有需要的受试者,或能以单独的药物组合物组合施用于受试者。在优选的实施例中,向受试者施用单一药物组合物。

[0082] 如本文所用,在向受试者施用两种或更多种O抗原或组合物的背景下,术语“组合”或“……的组合”不限制向受试者施用的O抗原或组合物的顺序。例如,可以在向受试者施用第二组合物之前(例如,5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、16小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周、或12周之前)、同时、或之后(例如,5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、16小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周、或12周之后)施用第一组合物。优选地,基本上同时、例如在彼此相隔五分钟内向受试者施用两种或更多种O抗原,并且更优选地通过同时施用至少两种组合物来同时施用两种或更多种O抗原,最优选地通过施用包含两种或更多种O抗原的单一组合物。

[0083] 如本文所用,“受试者”意指将或已经通过根据本发明的实施例所述的方法或组合物进行疫苗接种的任何动物,优选哺乳动物,最优选人。如本文所用的术语“哺乳动物”涵盖任何哺乳动物。哺乳动物的实例包括但不限于牛、马、羊、猪、猫、狗、小鼠、大鼠、兔、豚鼠、猴、人等,最优选人。术语“受试者”和“患者”在本文可互换地使用。

[0084] 术语“百分比(%)序列同一性”或“%同一性”描述了两个或更多个经比对的氨基酸序列与组成这些氨基酸序列的总长度的氨基酸残基数相比而言相同的氨基酸的匹配(“命中”)数。换句话说,使用比对,针对两个或更多个序列,当为了最大对应性(如使用本领域已知的序列比较算法所测量)对序列进行比较和比对时,或当手动比对和目视检查时,可以确定相同的氨基酸残基的百分比(例如,90%、95%、97%或98%同一性)。被比较以确定序列同一性的序列由此可以相差氨基酸的一个或多个取代、一个或多个添加或一个或多个缺失。用于比对蛋白质序列的合适程序是本领域技术人员已知的。蛋白质序列的百分比序列同一性可以例如用程序如CLUSTALW、Clustal Omega、FASTA或BLAST来确定,例如使用

NCBI BLAST算法(Altschul SF等人(1997),Nucleic Acids Res.[核酸研究]25:3389-3402)。

[0085] 例如,对于氨基酸序列,可以通过使用本领域已知的标准技术、或通过检查来确定序列同一性和/或相似性,所述技术包括但不限于以下:Smith和Waterman,1981,Adv.Appl.Math.[应用数学进展]2:482的局部序列同一性算法;Needleman和Wunsch,1970,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]48:443的序列同一性比对算法;Pearson和Lipman,1988,Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.[美国国家科学院院刊]85:2444的相似性搜索方法;这些算法的计算机化实现(威斯康辛遗传学软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,遗传学计算机集团(Genetics Computer Group),威斯康星州麦迪逊市科学大道575号(575Science Drive,Madison,Wis.));Devereux等人,1984,Nucl.Acid Res.[核酸研究]12:387-395描述的最佳拟合序列程序(优选地使用默认设置)。在某些实施例中,基于以下参数由FastDB计算百分比同一性:不匹配罚分为1;空位罚分为1;空位大小罚分为0.33;以及结合罚分为30,“Current Methods in Sequence Comparison and Analysis[序列比较和分析中的当前方法]”,Macromolecule Sequencing and Synthesis[大分子测序和合成],Selected Methods and Applications[选择的方法和应用],第127-149页(1988),Alan R.Liss公司。

[0086] 有用的算法的另一个实例是BLAST算法,其描述于:Altschul等人,1990,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]215:403-410;Altschul等人,1997,Nucleic Acids Res.[核酸研究]25:3389-3402;和Karin等人,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.[美国国家科学院院刊]90:5873-5787。一种特别有用的BLAST程序是WU-BLAST-2程序,其获自Altschul等人,1996,Methods in Enzymology[酶学方法]266:460-480。WU-BLAST-2使用若干搜索参数,将其中大多数设置为默认值。

[0087] 另一种有用的算法是由Altschul等人,1993,Nucl.Acids Res.[核酸研究]25:3389-3402报道的空位BLAST。

[0088] 大肠杆菌O抗原

[0089] 在本发明中令人惊讶地发现,在多价疫苗组合物中,在相同的多糖浓度下,缀合至载体蛋白的大肠杆菌O75抗原似乎比缀合至载体蛋白的其他大肠杆菌O抗原(例如,O1A、O2、O4、O6A、O15、O16和O18A)具有更低的免疫原性。这一发现导致进一步研究大肠杆菌O75抗原的剂量和多价疫苗中各种大肠杆菌O抗原的剂量比,从而开发了基于大肠杆菌O抗原的多价疫苗和免疫方法,以提高针对O75血清型和其他ExPEC血清型的免疫应答。

[0090] 本发明的实施例涉及与大肠杆菌O75抗原多糖和一种或多种额外大肠杆菌O抗原多糖相关的组合物和方法。优选地,一种或多种额外的O抗原普遍存在于大肠杆菌的临床分离株中。可用于本发明中的此类大肠杆菌抗原的实例包括但不限于大肠杆菌O1、O2、O4、O6、O8、O15、O16、O18和O25抗原。根据需要,组合物可包括多于一种的额外大肠杆菌O抗原,如二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四或十五种额外大肠杆菌O抗原,以提供除了大肠杆菌O75血清型以外还针对多种大肠杆菌血清型的免疫保护。在一些实施例中,额外的大肠杆菌O抗原选自由大肠杆菌O1、O2、O4、O6、O15、O16、O18和O25抗原组成的组。在优选的实施例中,额外的大肠杆菌O抗原选自由O1A、O2、葡糖基化O4、O6A、O15、O16、O18A和O25B组成的组。更优选地,组合物包括全部的O1A、O2、葡糖基化O4、O6A、O15、O16、O18A和O25B大肠杆菌O抗原。在一个特定实施例中,大肠杆菌O抗原包含如表1所示的结构,其中n为

1至100的整数。在一些实施例中,n为3至50的整数,例如5至40,优选5至30,例如7至25,例如10至20。

[0091] 在一个实施例中,本发明的组合物包含大肠杆菌O75和O6抗原多糖,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,并且其中O75抗原多糖与O6抗原多糖的浓度比为约1.2:1至约8:1,优选约1.5:1至约4:1,更优选约2:1,例如约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或2.5:1。在一些实施例中,组合物进一步包含一种或多种、优选全部的大肠杆菌O1、O2、O4、O15、O16、O18、O25抗原多糖,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,优选地,O1抗原为O1A,O4为葡糖基化的,O6抗原为O6A,O18抗原为O18A,并且O25抗原为O25B。

[0092] 可用于本发明中的大肠杆菌O抗原可以通过本领域中已知的方法鉴于本披露内容来生产。例如,它们可以由细胞生产,优选被优化用于O抗原的生物合成的重组细胞。参见例如,WO 2006/119987、WO 2009/104074、国际专利申请号PCT/EP2015/053739、Ihssen等人,2010,Microbial Cell Factories[微生物细胞工厂]9,61中关于用于大肠杆菌O抗原生物合成的核酸、蛋白质、宿主细胞、生产方法等的相关披露内容,将这些文献的披露内容通过引用以其全文并入本文。

[0093] 载体蛋白

[0094] 根据本发明的实施例,每种大肠杆菌O抗原共价结合至载体蛋白,优选通过糖苷键联。鉴于本披露内容,可以使用本领域已知的任何载体蛋白。合适的载体蛋白包括但不限于铜绿假单胞菌(P.aeruginosa)的去毒外毒素A(EPA)、CRM_{197}、大肠杆菌鞭毛蛋白(FliC)、麦芽糖结合蛋白(MBP)、白喉类毒素、破伤风类毒素、金黄色葡萄球菌(S.aureus)的去毒溶血素A、凝集因子A、凝集因子B、大肠杆菌不耐热肠毒素、大肠杆菌不耐热肠毒素的去毒变体、霍乱毒素B亚基(CTB)、霍乱毒素、霍乱毒素的去毒变体、大肠杆菌Sat蛋白、大肠杆菌Sat蛋白的载客结构域、肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)溶血素(Pneumolysin)、钥孔戚血蓝蛋白(KLH)、铜绿假单胞菌PcrV、脑膜炎奈瑟菌(Neisseria meningitidis)的外膜蛋白(OMPC)、以及来自不可分型流感嗜血杆菌(Haemophilus influenzae)的蛋白D。已经描述了与包含所需共有糖基化序列的各种不同载体蛋白的生物缀合,这表明可以使用该技术糖基化多种蛋白质(参见例如,WO 06/119987、WO 2015/124769、WO 2015/158403、WO 2015/82571、WO 2017/216286和WO 2017/67964,一起示出了多种成功用于生物缀合的载体蛋白)。

[0095] 在某些实施例中,对载体蛋白进行修饰,例如以使蛋白质毒性较低和/或对糖基化更敏感的方式进行修饰。在一个特定实施例中,对本文所使用的载体蛋白进行修饰,使得这些载体蛋白中糖基化位点的数量最大化,这样一种方式使得例如在免疫原性组合物(特别地呈其生物缀合物形式)中待施用的蛋白质的浓度更低。

[0096] 因此,在某些实施例中,对本文所述的载体蛋白进行修饰以包括比通常与载体蛋白缔合的糖基化位点多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个糖基化位点(例如,相对于与呈其天然/自然,即“野生型”状态的载体蛋白相关的糖基化位点的数量)。将糖基化位点引入载体蛋白可以通过将糖基化共有序列插入蛋白质一级结构中的任何位置来实现,例如通过向蛋白质的一级结构添加新的氨基酸使得完整或部分地添加糖基化位点,或通过突变蛋白质中现有的氨基酸来产生糖基化位点。本领域普通技术人员将认识到,可以使用本领域已

知的方法(例如,包括对编码蛋白质的核酸序列进行修饰的重组方法)容易地修饰蛋白质的氨基酸序列。在特定的实施例中,将糖基化共有序列引入载体蛋白的特定区域,例如蛋白质的表面结构、蛋白质的N或C末端、和/或通过蛋白质底部的二硫键稳定的环中。在一些实施例中,糖基化共有序列可以通过添加赖氨酸残基来扩展以实现更有效的糖基化。

[0097] 可插入或产生于载体蛋白中的糖基化共有序列的示例性实例包括Asn-X-Ser(Thr)(SEQ ID NO:1),其中X可为除Pro以外的任何氨基酸;并且优选Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr)(SEQ ID NO:2),其中X和Z独立地选自除Pro以外的任何氨基酸。

[0098] 在一些实施例中,大肠杆菌O抗原多糖共价连接至载体蛋白中的天冬酰胺(Asn)残基(例如,N-连接),其中Asn残基存在于包含糖基化共有序列的糖基化位点中,该糖基化共有序列具有SEQ ID NO:1,更优选地具有SEQ ID NO:2。典型地,载体蛋白包含1-10个糖基化位点,优选2-4个糖基化位点,最优选4个糖基化位点,例如1-10个、优选2-4个、并且更优选4个糖基化位点,每个糖基化位点包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列、更优选SEQ ID NO:2的氨基酸序列的糖基化共有序列。

[0099] 在特定的实施例中,载体蛋白是铜绿假单胞菌去毒外毒素A。对于EPA,各种去毒蛋白质变体已经在文献中进行了描述并且可以用作载体蛋白。例如,根据Lukac等人,1988,Infect Immun[感染与免疫],56:3095-3098以及Ho等人,2006,Hum Vaccin[人类疫苗],2:89-98,可以通过使催化必需残基L552V和ΔE553突变和缺失来实现去毒。如本文所用,“EPA”是指铜绿假单胞菌去毒外毒素A。在载体蛋白为EPA的那些实施例中,大肠杆菌抗原多糖可与包含具有SEQ ID NO:1的糖基化共有序列的糖基化位点中的Asn残基共价连接,并且优选地与包含具有SEQ ID NO:2的糖基化共有序列的糖基化位点中的Asn残基共价连接。优选地,EPA载体蛋白包含1-10个糖基化位点,优选2-4个糖基化位点,最优选4个糖基化位点,例如1-10个、优选2-4个、并且更优选4个糖基化位点,每个糖基化位点包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列、更优选SEQ ID NO:2的氨基酸序列的糖基化共有序列。

[0100] 在一些实施例中,EPA载体蛋白包含四个糖基化位点,每个糖基化位点包含糖基化共有序列,例如包含具有SEQ ID NO:2的糖基化共有序列的糖基化位点。如本文所用,“EPA-4载体蛋白”和“EPA-4”是指包含四个糖基化位点的、铜绿假单胞菌去毒外毒素A载体蛋白,每个糖基化位点包含具有SEQ ID NO:2的糖基化共有序列。EPA-4载体蛋白的示例性优选实例是包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的EPA载体蛋白。

[0101] 在某些实施例中,EPA载体蛋白可以与信号序列(如大肠杆菌DsbA、大肠杆菌外膜孔蛋白A(OmpA)、大肠杆菌麦芽糖结合蛋白(MalE)等的信号肽)一起产生,该信号序列使载体蛋白靶向表达该载体蛋白的宿主细胞的周质空间。EPA载体蛋白也可以被修饰为“标签”,即允许分离和/或鉴定载体蛋白的氨基酸序列。

[0102] 可用于本发明中的EPA载体蛋白可以通过本领域中已知的方法鉴于本披露内容来生产。参见例如,例如Ihssen等人,2010,Microbial Cell Factories[微生物细胞工厂]9,61以及WO 2006/119987、WO 2009/104074和WO 2015/124769中的相关披露内容,将这些文献的披露内容通过引用以其全文并入本文。

[0103] 在其他实施例中,载体蛋白是CRM_{197}。CRM_{197}蛋白是一种无毒形式的白喉毒素,但在免疫学上与白喉毒素无法区分。CRM_{197}由非产毒噬菌体$\beta197^{tox^-}$感染的白喉杆菌(Corynebacterium diphtheriae)产生,该非产毒噬菌体$\beta197^{tox^-}$由产毒棒状杆菌噬菌体β

的亚硝基胍诱变而产生(Uchida等人(1971)Nature New Biology[自然-新生物学]233:8-11)。CRM_{197}蛋白具有与白喉毒素相同的分子量,但与白喉毒素的不同之处在于结构基因中的单个碱基变化(鸟嘌呤变为腺嘌呤)。这种单个碱基变化会导致成熟蛋白质中的氨基酸取代(甘氨酸被谷氨酸取代)并消除白喉毒素的毒性。CRM_{197}蛋白是一种针对糖的安全有效的T细胞依赖性载体。CRM_{197}蛋白的氨基酸序列示于SEQ ID NO:20中。关于CRM_{197}及其生产的更多细节可以在例如美国专利号5,614,382中找到。在一个实施例中,本发明的O抗原多糖缀合至CRM_{197}蛋白或CRM_{197}的A链(参见CN 103495161)。在一个实施例中,本发明的O抗原多糖缀合至经由基因重组大肠杆菌表达而获得的CRM_{197}的A链(参见CN 103495161)。在一个实施例中,本发明的O抗原多糖各自独立地缀合至CRM_{197}。在一个实施例中,本发明的O抗原多糖各自独立地缀合至CRM_{197}的A链。

[0104] 缀合物

[0105] 术语“生物缀合物”是指在宿主细胞背景、优选细菌宿主细胞(例如大肠杆菌宿主细胞)中制备的蛋白质(例如载体蛋白)与糖或糖抗原(例如寡糖和多糖)之间的缀合物,其中宿主细胞机制将抗原连接至蛋白质(例如,N-连接)。优选地,术语“生物缀合物”是指在宿主细胞背景中制备的蛋白质(例如载体蛋白)与O抗原、优选大肠杆菌O抗原(例如,O1A、O2、O4、O6A、O8、O15、O16、O18A、O25B、O75等)之间的缀合物,其中宿主细胞机制将抗原连接至蛋白质(例如,N-连接)。因为生物缀合物是通过宿主细胞机制在宿主细胞中制备的,所以抗原和蛋白质经由生物缀合物中的糖苷键联或键共价连接。生物缀合物可以在重组宿主细胞中制备,这些宿主细胞被工程化以表达合成O抗原和/或将O抗原连接至靶蛋白所需的细胞机制。如本文所述,生物缀合物具有优于化学制备的糖缀合物(其中聚糖从细菌细胞壁纯化并随后与载体蛋白化学偶联)的有利特性,例如,生物缀合物在制造中需要更少的化学制品并且在产生的最终产物方面更加一致,并且含有较少或不含游离的(即,未结合至载体蛋白)聚糖。纯化不含脂质A的O抗原并随后化学缀合至载体蛋白是一个漫长且费力的过程。此外,纯化、脂质A去毒和化学缀合过程可能导致表位丢失、抗原异质性和缀合的多糖的免疫原性降低。通过生物缀合合成糖缀合物可以克服经典纯化和化学缀合的这些局限性。因此,在典型的实施例中,生物缀合物相比于化学生产的糖缀合物是优选的。

[0106] 在某些实施例中,宿主细胞可以产生大肠杆菌O抗原和EPA载体蛋白,并且使O抗原共价结合至EPA载体蛋白以形成可用于本发明中的生物缀合物。参见例如,例如Ihssen等人,2010,Microbial Cell Factories[微生物细胞工厂]9,61以及WO 2006/119987、WO 2009/104074和WO 2015/124769中的相关披露内容,将这些文献的披露内容通过引用以其全文并入本文。

[0107] 在一个特定实施例中,将载体蛋白N-连接至可用于本发明中的大肠杆菌O抗原。例如,将大肠杆菌O抗原连接至载体蛋白的糖基化序列中的Asn残基,该糖基化序列如Asn-X-Ser(Thr)(SEQ ID NO:2),其中X可以是除Pro以外的任何氨基酸,优选Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr)(SEQ ID NO:3),其中X和Z独立地选自除Pro以外的任何天然氨基酸。

[0108] 可替代地,糖缀合物可通过化学合成制备,即在宿主细胞外(体外)制备。例如,本文所述的大肠杆菌O抗原(例如,O75抗原)可以使用本领域技术人员已知的方法缀合至载体蛋白,包括通过在多糖/寡糖以及蛋白载体中使用活化反应性基团。参见例如,Pawlowski等人,2000,Vaccine[疫苗],18:1873-1885;和Robbins等人,2009,Proc Natl Acad Sci USA

[美国国家科学院院刊],106:7974-7978,将这些文献的披露内容通过引用并入本文。此类方法包括从宿主细胞中提取抗原多糖/寡糖,纯化这些多糖/寡糖,化学活化这些多糖/寡糖,并且使这些多糖/寡糖缀合至载体蛋白。WO 2020/039359中还描述了使用与载体蛋白的化学缀合来制备与载体蛋白缀合的大肠杆菌O抗原的糖缀合物的方法,以及包含此类糖缀合物的组合物。

[0109] 例如,可以使用CDAP化学法制备缀合物。在这些实施例中,将多糖用1-氰基-4-二甲基氨基吡啶鎓四氟硼酸盐(CDAP)活化以形成氰酸酯。然后将活化的多糖直接或经由间隔子(接头)基团与载体蛋白(例如,EPA或CRM_{197})上的氨基基团偶联。例如,间隔子可以是胱胺或半胱胺以给出硫醇化多糖,该硫醇化多糖可以经由与马来酰亚胺活化的载体蛋白(例如,使用N-[γ-马来酰亚胺基丁氧基]琥珀酰亚胺酯(GMBS))或卤代乙酰化的载体蛋白(例如,使用碘乙酰亚胺、N-琥珀酰亚胺基溴乙酸酯(SBA;SIB)、N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(SIAB)、磺基琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(磺基-SIAB)、N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯(SIA)或琥珀酰亚胺基3-[溴乙酰胺基]丙酸酯(SBAP))反应后获得的硫醚键联而与载体偶联。优选地,将氰酸酯(任选地通过CDAP化学法制备)与己二胺或己二酸二酰肼(ADH)偶联,并且使用碳二亚胺(例如,EDAC或EDC)化学法经由蛋白载体上的羧基基团将氨基衍生的糖缀合至载体蛋白(例如,EPA或CRM_{197})。此类缀合物例如描述于WO 93/15760、WO 95/08348和WO 96/129094中。

[0110] 其他合适的缀合技术使用碳二亚胺、酰肼、活性酯、降莰烷、对硝基苯甲酸、N-羟基琥珀酰亚胺、S-NHS、EDC、TSTU。多种缀合技术描述于WO 98/42721中。缀合可能涉及羰基接头,其可以通过糖的游离羟基基团与CDI反应(参见Bethell等人(1979)1.Biol.Chern.[生物化学]254:2572-2574;Hearn等人(1981)J.Chromatogr.[色谱杂志]218:509-518)、然后与蛋白质反应形成氨基甲酸酯键联而形成。这可能涉及伯羟基基团的端基异构末端的还原、伯羟基基团的任选保护/脱保护、伯羟基基团与CDI反应形成CDI氨基甲酸酯中间体以及将CDI氨基甲酸酯中间体与蛋白质上的氨基基团偶联。

[0111] 在其他实施例中,使用还原胺化制备缀合物。还原胺化包括两个步骤,(1)多糖的氧化,(2)活化的多糖和载体蛋白的还原以形成缀合物。在氧化之前,多糖任选地被水解。可以采用机械或化学水解。可以使用乙酸进行化学水解。

[0112] 氧化步骤可以涉及与高碘酸盐的反应。出于本发明的目的,术语“高碘酸盐”包括高碘酸盐和高碘酸二者;该术语还包括偏高碘酸盐(IO_4^-)和原高碘酸盐(IO_6^{5-})并且包括各种高碘酸盐(例如,高碘酸钠和高碘酸钾)。在一个实施例中,在偏高碘酸盐存在下、优选在高碘酸钠($NaIO_4$)存在下氧化荚膜多糖。在另一个实施例中,在原高碘酸盐存在下、优选在高碘酸存在下氧化荚膜多糖。

[0113] 在一个实施例中,氧化剂是稳定的硝酰基或硝基氧基团化合物,例如哌啶-N-氧基或吡咯烷-N-氧基化合物,在氧化剂存在下选择性氧化伯羟基(如WO 2014/097099中所述)。在所述反应中,实际氧化剂是催化循环中的N-氧代铵盐。在一方面,所述稳定的硝酰基或硝基氧基团化合物是哌啶-N-氧基或吡咯烷-N-氧基化合物。在一方面,所述稳定的硝酰基或硝基氧基团化合物具有TEMPO(2,2,6,6-四甲基-1-哌啶基氧基)或PROXYL(2,2,5,5-四甲基-1-吡咯烷基氧基)部分。在一方面,所述稳定的硝酰基基团化合物是TEMPO或其衍生物。在一方面,所述氧化剂是具有N-卤代部分的分子。在一方面,所述氧化剂选自由以下组成的

组:N-氯代琥珀酰亚胺、N-溴代琥珀酰亚胺、N-碘代琥珀酰亚胺、二氯异氰脲酸、1,3,5-三氯-1,3,5-三嗪烷-2,4,6-三酮、二溴异氰脲酸、1,3,5-三溴-1,3,5-三嗪烷-2,4,6-三酮、二碘异氰脲酸和1,3,5-三碘-1,3,5-三嗪烷-2,4,6-三酮。优选地,所述氧化剂是N-氯代琥珀酰亚胺。

[0114] 任选地,通过添加淬灭剂来淬灭氧化反应。淬灭剂选自邻二醇、1,2-氨基醇、氨基酸、谷胱甘肽、亚硫酸盐、硫酸氢盐、连二亚硫酸盐、偏亚硫酸氢盐、硫代硫酸盐、亚磷酸盐、次磷酸盐或亚磷酸(如甘油、乙二醇、丙-1,2-二醇、丁-1,2-二醇或丁-2,3-二醇、抗坏血酸)。

[0115] 在多糖的氧化步骤之后,多糖被说成是活化的并且在下文中被称为“活化的多糖”。活化的多糖和载体蛋白可以被单独(分散冻干)或一起(共冻干)冻干(冷冻干燥)。在一个实施例中,活化的多糖和载体蛋白被共冻干。在另一个实施例中,活化的多糖和载体蛋白被单独冻干。

[0116] 在一个实施例中,冻干在非还原糖存在下进行,可能的非还原糖包括蔗糖、海藻糖、棉子糖、水苏糖、松三糖、右旋糖酐、甘露醇、乳糖醇和帕拉金糖醇。

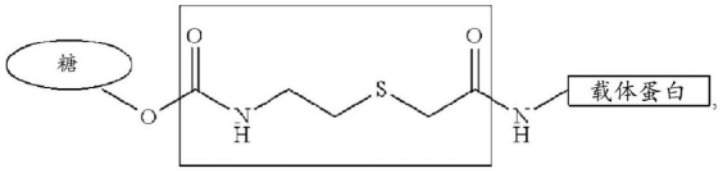
[0117] 缀合过程的第二步是使用还原剂还原活化的多糖和载体蛋白以形成缀合物(所谓的还原胺化)。合适的还原剂包括氰基硼氢化物(如在布朗斯台德酸或路易斯酸存在下的氰基硼氢化钠、三乙酰氧基硼氢化钠或硼氢化钠或硼氢化锌)、胺硼烷(如吡啶硼烷、2-甲基吡啶硼烷、2,6-二硼烷-甲醇、二甲胺-硼烷、t-BuMe^{i}PrN—BH_3、苄胺-BH_3或5-乙基-2-甲基吡啶硼烷(PEMB))或硼氢化物交换树脂。在一个实施例中,还原剂是氰基硼氢化钠。

[0118] 在一个实施例中,还原反应在水性溶剂(例如,选自PBS、MES、HEPES、Bis-tris、ADA、PIPES、MOPSO、BES、MOPS、DIPSO、MOBS、HEPPSO、POPSO、TEA、EPPS、Bicine或HEPB,pH在6.0和8.5、7.0和8.0、或7.0和7.5之间)中进行;在另一个实施例中,该反应在非质子溶剂中进行。在一个实施例中,还原反应在DMSO(二甲亚砜)或DMF(二甲基甲酰胺)溶剂中进行。DMSO或DMF溶剂可用于重构已冻干的活化的多糖和载体蛋白。

[0119] 在还原反应结束时,可能有未反应的醛基团保留在缀合物中,这些醛基团可以使用合适的封端剂进行封端。在一个实施例中,该封端剂是硼氢化钠($NaBH_4$)。

[0120] 在其他实施例中,如WO 2014/027302中所述,使用eTEC缀合来制备缀合物。所述糖缀合物包含通过一个或多个eTEC间隔子共价缀合至载体蛋白的糖,其中糖通过氨基甲酸酯键联共价缀合至eTEC间隔子,并且其中载体蛋白通过酰胺键联共价缀合至eTEC间隔子。本发明的eTEC连接的糖缀合物可由通式(I)表示:

(I)

[0121] 

[0122] 其中,构成eTEC间隔子的原子包含在中心盒中。

[0123] eTEC间隔子包括七个线性原子(即,—C(O)NH$(CH_2)_2SCH_2$C(O)—),并在糖和载体蛋白之间提供稳定的硫醚键和酰胺键。eTEC连接的糖缀合物的合成涉及糖的活化羟基基团与硫代烷基胺试剂(例如,胱胺或半胱胺或其盐)的氨基基团反应,与糖形成氨基甲酸酯键联

以提供硫醇化糖。一个或多个游离巯基基团的产生是通过与还原剂反应提供活化的硫醇化糖来实现的。活化的硫醇化糖的游离巯基基团与在含胺残基上具有一个或多个α-卤代乙酰胺基团的活化载体蛋白的反应产生硫醚键以形成缀合物,其中载体蛋白通过酰胺键附接至eTEC间隔子。

[0124] 本文所述的缀合物可以通过本领域中已知用于纯化蛋白质的任何方法进行纯化,例如,通过色谱法(例如,离子交换色谱法、阴离子交换色谱法、亲和色谱法和尺寸分级柱色谱法)、离心、差异溶解度、或通过用于纯化蛋白质的任何其他标准技术进行纯化。参见例如,Saraswat等人,2013,Biomed.Res.Int.[国际生物医学研究]ID#312709(第1-18页);还参见WO 2009/104074中所述的方法。用于纯化特定缀合物的实际条件将部分地取决于合成策略(例如,合成产生对比重组产生)以及诸如生物缀合物的净电荷、疏水性和/或亲水性等因素,并且对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0125] 宿主细胞

[0126] 本文描述的是能够产生大肠杆菌O抗原和包含此类大肠杆菌O抗原的生物缀合物的宿主细胞,例如原核宿主细胞。优选地,本文所述的宿主细胞被修饰以包含(例如,通过基因工程)一种或多种编码用于产生大肠杆菌O抗原多糖和/或其生物缀合物的宿主细胞机制(例如,糖基转移酶)的核酸。

[0127] 本领域技术人员已知的任何宿主细胞可用于产生本文所述的大肠杆菌O抗原多糖(例如,大肠杆菌O75多糖)和包含本文所述的大肠杆菌O抗原多糖的生物缀合物(例如,大肠杆菌O75抗原多糖的生物缀合物),这些宿主细胞包括古细菌、原核宿主细胞和真核宿主细胞。在一个优选的实施例中,宿主细胞是原核宿主细胞。可用于产生本文所述的大肠杆菌O抗原多糖和包含本文所述的大肠杆菌O抗原多糖的生物缀合物的示例性原核宿主细胞包括但不限于埃希氏杆菌属物种、志贺氏菌属(Shigella)物种、克雷伯菌属(Klebsiella)物种、黄单胞菌属(Xhantomonas)物种、沙门氏菌属(Salmonella)物种、耶尔森氏菌属(Yersinia)物种、乳球菌属(Lactococcus)物种、乳杆菌属(Lactobacillus)物种、假单胞菌属(Pseudomonas)物种、棒状杆菌属(Corynebacterium)物种、链霉菌属(Streptomyces)物种、链球菌属(Streptococcus)物种、葡萄球菌属(Staphylococcus)物种、芽孢杆菌属(Bacillus)物种和梭菌属(Clostridium)物种。

[0128] 在一个特定实施例中,用于产生本文所述的大肠杆菌O抗原多糖和包含本文所述的大肠杆菌O抗原多糖的生物缀合物的宿主细胞是原核宿主细胞,优选大肠杆菌。

[0129] 在某些实施例中,用于产生本文所述的大肠杆菌O抗原多糖和生物缀合物的宿主细胞被工程化以包含异源核酸,例如,包含所需O抗原血清型的rfb基因簇的异源核酸、编码一种或多种载体蛋白和/或糖基转移酶的异源核酸。在一个特定实施例中,可以将编码参与糖基化途径(例如,原核和/或真核糖基化途径)的蛋白质的异源rfb基因和/或异源核酸引入本文所述的宿主细胞。此类核酸可以编码包括但不限于寡糖基转移酶和/或糖基转移酶的蛋白质。

[0130] 本文描述了编码糖基转移酶的各种基因和基因簇的序列,这些糖基转移酶可用于制备重组宿主细胞,这些重组宿主细胞可例如用于制备大肠杆菌O抗原多糖及其生物缀合物。本领域技术人员将理解,由于遗传密码的简并性,具有特定氨基酸序列的蛋白质可以由多种不同的核酸编码。因此,本领域技术人员将理解,本文提供的核酸能以其序列不同于本

文提供的序列的方式改变,而不影响由该核酸编码的蛋白质的氨基酸序列。

[0131] 本文描述了用于产生大肠杆菌O75抗原多糖、O1A抗原多糖、O2抗原多糖、葡糖基化或非葡糖基化O4抗原多糖、O6A抗原多糖、O8抗原多糖、O15抗原多糖、O16抗原多糖、O18A抗原多糖或O25B抗原多糖的生物缀合物的宿主细胞(例如,重组宿主细胞)。本文所述的宿主细胞包含编码能够产生大肠杆菌O抗原多糖的酶(例如,糖基转移酶)的核酸。本文所述的宿主细胞可以天然表达能够产生目的O抗原的核酸,或者可以使宿主细胞表达这样的核酸。在某些实施例中,核酸对于宿主细胞而言是异源的并且使用本领域已知的遗传方法将其引入宿主细胞。例如,可以通过基因操作(例如,在一个或多个质粒上表达基因簇或将其整合到宿主细胞基因组中)将核酸引入宿主细胞(参见例如,WO 2014/037585、WO 2014/057109、WO 2015/052344)。

[0132] 本文还描述了能够产生与载体蛋白共价连接的大肠杆菌O1A、O2、葡糖基化或非葡糖基化O4、O6A、O8、O15、O16、O18A、O25B或O75抗原多糖的生物缀合物的宿主细胞(例如,重组宿主细胞)。此类宿主细胞(例如,重组宿主细胞)包含对O抗原多糖具有特异性的rfb基因簇的核苷酸序列。rfb基因簇可以从野生型大肠杆菌菌株中分离,并在一个宿主细胞内与编码寡糖基转移酶(例如,PglB)和载体蛋白(例如,EPA)的核酸结合,以获得产生目的大肠杆菌O抗原或其生物缀合物的重组宿主细胞。例如,可以使用重组方法来工程化此类宿主细胞以包含一种或多种质粒,使用例如WO 2015/124769、WO 2014/037585、WO 2009/104074和WO 2009/089396中所述的生物缀合技术,该一种或多种质粒包含rfb基因簇、寡糖基转移酶(例如,PglB)和载体蛋白(例如,EPA)。优选地,宿主细胞包含整合到其基因组中的rfb基因簇。在某些实施例中,编码寡糖基转移酶、载体蛋白的核酸,在适用的情况下是gtrS基因,也整合到宿主细胞的基因组中。在某些实施例中,异源或同源的gtrA和gtrB基因也整合到宿主细胞的基因组中。

[0133] WO 2015/124769和WO 2017/035181中详细描述了O1A、O2、O6A和O25B抗原的生物缀合物的制备。Iguchi A等人,DNA Research[DNA研究],2014,1-7以及DebRoy C等人,PLoS One.[公共科学图书馆·综合]2016,11(1):e0147434;校正:Plos One.[公共科学图书馆·综合]2016,11(4):e0154551中描述了每个大肠杆菌O抗原的示例性基因簇(rfb基因座)。rfb簇的核酸序列和其中编码的蛋白质的氨基酸序列也可以在公共数据库(如GenBank)中找到。可用于与本文披露的血清型的多糖抗原的生物缀合物的生产菌株中的rfb簇的示例性序列也在SEQ ID NO:9和11-19中提供。因此,对于上述每种所希望的生物缀合物,可将相应的rfb簇引入宿主细胞,以获得具有所希望O抗原的特定rfb簇以及含有编码寡糖基转移酶和载体蛋白的核酸的宿主细胞。出于上面所指出的原因,优选宿主细胞是重组宿主细胞,并且优选地源自具有相对熟知特征的菌株,如大肠杆菌实验室菌株或生产菌株,例如大肠杆菌K12或大肠杆菌BL21等。优选地,rfb簇对于宿主细胞而言是异源的,例如被引入宿主细胞的前体细胞中,并且优选地整合到其基因组中。优选地,如果原始rfb基因簇存在于前体细胞中,则已被宿主细胞中目的O抗原的rfb基因簇替换,以能够产生目的O抗原的生物缀合物。优选地,寡糖基转移酶对于宿主细胞而言是异源的,并且在某些实施例中,编码这种寡糖基转移酶的核酸被整合到宿主细胞的基因组中。

[0134] 本文所述的任何宿主细胞(例如,重组宿主细胞,优选重组原核宿主细胞)包含编码在蛋白质的N-糖基化中有活性的额外酶的核酸,例如,本文所述的宿主细胞可进一步包

含编码寡糖基转移酶的核酸或编码其他糖基转移酶的核酸。

[0135] 本文所述的宿主细胞典型地包含编码寡糖基转移酶的核酸。此类寡糖基转移酶将脂质连接的寡糖转移到包含N-糖基化共有基序的新生多肽链的天冬酰胺残基上。编码寡糖基转移酶的核酸对于宿主细胞而言可以是天然的,或者可以使用遗传方法引入宿主细胞。在优选的实施例中,寡糖基转移酶对于宿主细胞而言是异源的。大肠杆菌不天然地包含寡糖基转移酶,因此如果将大肠杆菌用作宿主细胞以产生生物缀合物,则异源寡糖基转移酶包含在这样的宿主细胞中,例如在通过基因工程引入后。鉴于本披露内容,寡糖基转移酶可以来自本领域已知的任何来源。

[0136] 在某些实施例中,可以与载体蛋白中自身的不同糖基化共有序列结合使用具有N-糖基转移酶活性的寡糖基转移酶的替代物,如O-糖基转移酶,例如作为非限制性实例PglL,如例如WO 2016/82597和WO 2020/120569中所述。其他糖基转移酶(如O-糖基转移酶)因此也可用作根据本发明的寡糖基转移酶。

[0137] 在某些优选的实施例中,寡糖基转移酶是来自弯曲杆菌属(Campylobacter)的寡糖基转移酶。例如,在一个实施例中,寡糖基转移酶是来自空肠弯曲杆菌的寡糖基转移酶(即,pglB;参见例如,Wacker等人,2002,Science[科学]298:1790-1793;还参见例如,NCBI基因ID:3231775,UniProt登录号O86154)。在另一个实施例中,寡糖基转移酶是来自红嘴鸥弯曲杆菌(Campylobacter lari)的寡糖基转移酶(参见例如,NCBI基因ID:7410986)。

[0138] 在特定的实施例中,寡糖基转移酶是来自空肠弯曲杆菌的PglB寡糖基转移酶,其包括天然(野生型)蛋白质或其任何变体,如WO 2016/107818和WO 2016/107819中所述的那些。PglB可以将脂质连接的寡糖转移到共有序列SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2中的天冬酰胺残基上。在特定的实施例中,PglB寡糖基转移酶包含SEQ ID NO:6或其变体。在某些实施例中,野生型PglB中的一个或多个内源糖基化共有序列已被突变以避免PglB自身糖基化,例如包含突变N534Q的SEQ ID NO:6。适用于本文提供的重组宿主细胞中的变体PglB寡糖基转移酶的实例包括具有SEQ ID NO:6的PglB寡糖基转移酶,该SEQ ID NO:6包含至少一个选自由N311V、K482R、D483H、A669V、Y77H、S80R、Q287P和K289R组成的组的突变。在一个特定实施例中,变体PglB寡糖基转移酶具有包含突变N311V的SEQ ID NO:6。在另一个特定实施例中,变体PglB寡糖基转移酶具有包含突变Y77H和N311V的SEQ ID NO:6。在另一个特定实施例中,变体PglB寡糖基转移酶具有包含突变N311V、K482R、D483H和A669V的SEQ ID NO:6。在另一个特定实施例中,变体PglB寡糖基转移酶具有包含突变Y77H、S80R、Q287P、K289R和N311V的SEQ ID NO:6。在2020年3月18日提交的PCT/US20/23415中发现并描述到,某些PglB寡糖基转移酶变体在特定血清型的大肠杆菌O抗原生物缀合物的生产中令人惊讶地提高了产量。对于给定的大肠杆菌O抗原的改进的或最佳的PglB变体是不可预测的。因此,本发明在某些方面还公开了使用特定的PglB变体作为寡糖基转移酶来产生特定大肠杆菌O抗原的生物缀合物的方法。与SEQ ID NO:6具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性并且仍具有寡糖基转移酶活性、优选在本文的组合中披露的指定位置(例如77Y、80S、287Q、289K、311N、482K、483D、669A;或311V;或311V、482R、483H、669V;或77H、80R、287P、289R、311V;或77H、311V;等)上具有一个或多个特定氨基酸的PglB的其他变体也可用于产生生物缀合物。

[0139] 在一个特定实施例中,能够产生与载体蛋白共价连接的大肠杆菌O75抗原多糖的

生物缀合物的宿主细胞(例如,重组宿主细胞)进一步包含编码来自空肠弯曲杆菌的PglB寡糖基转移酶的核苷酸序列,该PglB寡糖基转移酶具有SEQ ID NO:6或优选包含突变N311V的SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0140] 在其他特定的实施例中,能够产生与载体蛋白共价连接的大肠杆菌O1A、O6A或O15抗原多糖的生物缀合物的宿主细胞(例如,重组宿主细胞)进一步包含编码来自空肠弯曲杆菌的PglB寡糖基转移酶的核苷酸序列,该PglB寡糖基转移酶具有SEQ ID NO:6或优选包含突变N311V、K482R、D483H和A669V的SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0141] 在一个特定实施例中,能够产生与载体蛋白共价连接的大肠杆菌葡糖基化O4抗原多糖的生物缀合物的宿主细胞(例如,重组宿主细胞)进一步包含编码来自空肠弯曲杆菌的PglB寡糖基转移酶的核苷酸序列,该PglB寡糖基转移酶具有SEQ ID NO:6或优选包含突变N311V的SEQ ID NO:6或更优选包含突变Y77H和N311V的SEQ ID NO:6的氨基酸序列。优选地,用于产生与载体蛋白共价连接的大肠杆菌葡糖基化O4抗原多糖的生物缀合物的重组宿主细胞进一步包含编码葡糖基转移酶GtrS的序列、以及编码分别具有SEQ ID NO:7和8的氨基酸序列(或其含有分别与SEQ ID NO:7和8具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列的变体)的转位酶GtrA和糖基转移酶GtrB的核苷酸序列,该葡糖基转移酶GtrS具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列(或其与SEQ ID NO:4具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的变体)并且能够通过添加葡萄糖来修饰大肠杆菌O4抗原多糖以产生大肠杆菌葡糖基化O4抗原多糖,其中转位酶能够转位细菌萜醇连接的葡萄糖,并且糖基转移酶能够葡糖基化细菌萜醇。为了产生与载体蛋白共价连接的大肠杆菌非葡糖基化O4抗原多糖的生物缀合物,细胞不需要编码GtrS、GtrA和GtrB蛋白的此类序列。在2020年3月18日提交的PCT/US20/23404(将其通过引用以其全文并入本文)中描述了使用对大肠杆菌O4抗原多糖的葡糖基化具有特异性的新型GtrS来产生与载体蛋白共价连接的大肠杆菌葡糖基化O4抗原多糖的生物缀合物。

[0142] 在一个特定实施例中,能够产生与载体蛋白共价连接的大肠杆菌O16抗原多糖的生物缀合物的宿主细胞(例如,重组宿主细胞)进一步包含编码来自空肠弯曲杆菌的PglB寡糖基转移酶的核苷酸序列,该PglB寡糖基转移酶具有SEQ ID NO:6或优选包含突变Y77H、S80R、Q287P、K289R和N311V的SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0143] 在一个特定实施例中,能够产生与载体蛋白共价连接的大肠杆菌O8、O18A、O25B或O2抗原多糖的生物缀合物的宿主细胞(例如,重组宿主细胞)进一步包含编码来自空肠弯曲杆菌的PglB寡糖基转移酶的核苷酸序列,该PglB寡糖基转移酶具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列,优选地其中SEQ ID NO:6在位置77、80、287、289、311、482、483和669处不包含氨基酸突变。

[0144] 在一些实施例中,本文所述的任何宿主细胞包含编码载体蛋白(例如,由宿主细胞糖基化机制产生的一种或多种O抗原多糖可附着于其上以形成生物缀合物的蛋白质)的核酸。鉴于本披露内容,宿主细胞可包含编码本领域技术人员已知的任何载体蛋白的核酸,该载体蛋白包括但不限于铜绿假单胞菌去毒外毒素A(EPA)、大肠杆菌鞭毛蛋白(FliC)、CRM197、麦芽糖结合蛋白(MBP)、白喉类毒素、破伤风类毒素、金黄色葡萄球菌的去毒溶血素A、凝集因子A、凝集因子B、大肠杆菌不耐热肠毒素、大肠杆菌不耐热肠毒素的去毒变体、霍

乱毒素B亚基(CTB)、霍乱毒素、霍乱毒素的去毒变体、大肠杆菌Sat蛋白、大肠杆菌Sat蛋白的载客结构域、肺炎链球菌溶血素、钥孔戚血蓝蛋白(KLH)、铜绿假单胞菌PcrV、脑膜炎奈瑟菌的外膜蛋白(OMPC)、以及来自不可分型流感嗜血杆菌的蛋白D。

[0145] 在优选的实施例中,宿主细胞进一步包含编码铜绿假单胞菌去毒外毒素A(EPA)的核酸。优选地,EPA载体蛋白包含1-10个糖基化位点,优选2-4个糖基化位点,最优选4个糖基化位点,例如1-10个、优选2-4个、并且更优选4个糖基化位点,每个糖基化位点包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列、更优选具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的糖基化共有序列。在一个特定实施例中,宿主细胞进一步包含编码含有SEQ ID NO:3的EPA-4载体蛋白的核酸。

[0146] 在某些实施例中,在通过本文所述的宿主细胞产生生物缀合物中使用的载体蛋白包含“标签”,即允许分离和/或鉴定载体蛋白的氨基酸的序列。例如,将标签添加到载体蛋白中可用于纯化该蛋白,因此纯化包含该标记的载体蛋白的结合疫苗。可用于本文中的示例性标签包括但不限于组氨酸(HIS)标签(例如,六组氨酸标签或6XHis标签)、FLAG标签和HA标签。在某些实施例中,本文使用的标签是可去除的,一旦不再需要它们,例如在蛋白质已被纯化之后,例如通过化学试剂或酶促方式去除。在其他实施例中,载体蛋白不包含标签。

[0147] 在某些实施例中,本文所述的载体蛋白包含信号序列,该信号序列将该载体蛋白靶向表达该载体蛋白的宿主细胞的周质空间。在一个特定实施例中,信号序列来自大肠杆菌DsbA、大肠杆菌外膜孔蛋白A(OmpA)、大肠杆菌麦芽糖结合蛋白(MalE)、胡萝卜软腐欧文氏菌(Erwinia carotovorans)果胶裂解酶(PelB)、FlgI、NikA或芽孢杆菌属物种木聚糖内切酶(XynA)、不耐热大肠杆菌肠毒素LTIIb、芽孢杆菌属木聚糖内切酶XynA或大肠杆菌鞭毛蛋白(FlgI)。在一个实施例中,信号序列包含SEQ ID NO:10。在蛋白质易位至周质后,信号序列可以被切除,因此可能不再存在于生物缀合物的最终载体蛋白中。

[0148] 在某些实施例中,可以将额外的修饰引入(例如,使用重组技术)本文所述的宿主细胞。例如,编码形成可能竞争或干扰糖基化途径(例如,竞争或干扰一种或多种重组引入宿主细胞中的参与糖基化的异源基因)的一部分的蛋白质的宿主细胞核酸(例如,基因)可以在宿主细胞背景(基因组)中以使其失活/功能失调的方式被缺失或修饰(即,被删除/修饰的宿主细胞核酸不编码功能蛋白)。在某些实施例中,当从本文提供的宿主细胞的基因组中缺失核酸时,它们被所希望的序列(例如,可用于产生O抗原多糖或其生物缀合物的序列)替换。

[0149] 可以在宿主细胞中缺失(并且在一些情况下,被其他所希望的核酸序列替换)的示例性基因或基因簇包括宿主细胞的参与糖脂生物合成的基因或基因簇,如waaL(参见例如,Feldman等人,2005,PNAS USA[美国国家科学院院刊]102:3016-3021)、脂质A核心生物合成簇(waa)、半乳糖簇(gal)、阿拉伯糖簇(ara)、结肠酸簇(wc)、荚膜多糖簇、十一萜醇-p生物合成基因(例如,uppS、uppP)、und-P再循环基因、参与核苷酸活化糖生物合成的代谢酶、肠细菌共同抗原簇(eca)、以及原噬菌体O抗原修饰簇(如gtrABS簇或其区域)。在一个特定实施例中,本文所述的宿主细胞被修饰,使得它们不产生除所希望的O抗原多糖(例如,葡糖基化O4抗原多糖)以外的任何O抗原多糖。

[0150] 在一个特定实施例中,从本文提供的宿主细胞(例如,重组宿主细胞)的基因组中缺失waaL基因或使其功能失活。术语“waaL”和“waaL基因”是指编码膜结合酶(其活性位点

位于周质中)的O抗原连接酶基因。所编码的酶将结合十一异戊烯醇单磷酸(undecaprenylphosphate,UPP)的O抗原转移到脂质A核心,形成脂多糖。缺失或破坏内源性waaL基因(例如,ΔwaaL菌株)破坏了O抗原向脂质A的转移,并且可以替代地增强O抗原向另一生物分子(如载体蛋白)的转移。

[0151] 在另一个特定实施例中,从本文提供的原核宿主细胞的原始基因组中缺失waaL基因、gtrA基因、gtrB基因、gtrS基因和rfb基因簇中的一个或多个或使其功能失活。

[0152] 在一个实施例中,本文使用的宿主细胞是大肠杆菌,其产生葡糖基化O4抗原多糖的生物缀合物,其中从宿主细胞的基因组中缺失waaL基因或使其功能失活,并且插入对大肠杆菌O4抗原多糖具有特异性的gtrS基因。在葡糖基化O4 O抗原的生物缀合物的生产菌株的某些实施例中,将编码与SEQ ID NO:4具有至少80%序列同一性的葡糖基转移酶的gtrS基因插入到亲本菌株的gtrS基因的位置中,以用负责O4抗原的葡糖基化的基因替换该亲本菌株中的gtrS基因。这种亲本菌株的一个实例是大肠杆菌K-12菌株W3110。gtrA和gtrB基因对于亲本菌株而言可以是同源的,或可替代地这些基因中的一个或两个对于亲本菌株而言可以是异源的。典型地,与gtrS基因不同的是,这些gtrA和gtrB基因对O抗原结构没有特异性。

[0153] 本文还描述了制备重组宿主细胞的方法。通过本文所述的方法产生的重组宿主细胞可用于产生大肠杆菌O抗原的生物缀合物。这些方法包括将一种或多种重组核酸分子引入细胞以产生重组宿主细胞。典型地,重组核酸分子是异源的。鉴于本披露内容,本领域已知的任何方法均可用于将重组核酸分子引入宿主细胞。可以使用本领域普通技术人员已知的任何方法,例如电穿孔、化学转化、通过热休克、自然转化、噬菌体转导和缀合,将重组核酸引入本文所述的宿主细胞。在特定的实施例中,使用质粒将重组核酸引入本文所述的宿主细胞。例如,异源核酸可以通过质粒(例如,表达运载体)在宿主细胞中表达。在另一个特定实施例中,使用插入基因组的方法将异源核酸引入本文所述的宿主细胞,如例如WO 2014/037585、WO 2014/057109或WO 2015/052344中所述。

[0154] 在分子生物学中常规用作工具和模式生物的大肠杆菌菌株可例如在某些实施例中用作宿主细胞的亲本。非限制性实例包括大肠杆菌K12菌株(例如,如W1485、W2637、W3110、MG1655、DH1、DH5α、DH10等)、B菌株(例如,BL-21、REL606等)、C菌株或W菌株。在一个特定实施例中,宿主菌株源自亲本菌株W3110。例如,该菌株可以从耶鲁大学的大肠杆菌遗传资源保藏中心(E.coli Genetic Stock Center)获得。有关大肠杆菌的更多信息,请参见例如Ecoliwiki.net。

[0155] 在一些实施例中,本文所述的宿主细胞可用于产生包含与载体蛋白共价连接的大肠杆菌O抗原多糖的生物缀合物。使用宿主细胞产生此类生物缀合物的方法是本领域已知的。参见例如,WO 2003/074687和WO 2006/119987。这样的方法包括在产生生物缀合物的条件下培养本文所述的任何重组宿主细胞。鉴于本披露内容,可以使用本领域已知的任何方法从重组宿主细胞中分离、分开和/或纯化生物缀合物。例如,生物缀合物可以通过本领域中已知用于纯化蛋白质的任何方法进行纯化,例如,通过色谱法(例如,离子交换色谱法、阴离子交换色谱法、亲和色谱法和尺寸分级柱色谱法)、离心、差异溶解度、或通过用于纯化蛋白质的任何其他标准技术进行纯化。参见例如,WO 2009/104074中所述的方法。此外,生物缀合物可以与异源多肽序列融合以促进纯化。用于纯化特定生物缀合物的实际条件将部分

地取决于诸如生物缀合物的净电荷、疏水性和/或亲水性等因素,并且对于本领域技术人员将是显而易见的。例如,WO 2015/124769和WO 2017/035181中描述了O1A、O2、O6A和O25B的生物缀合物的制备以及包含这些生物缀合物的疫苗组合物。

[0156] 还提供了通过本文所述的方法,即使用本文所述的重组宿主细胞产生的生物缀合物。

[0157] 在一些实施例中,制备与载体蛋白共价连接的大肠杆菌O抗原多糖的生物缀合物的方法包括:(i)提供重组宿主细胞,该重组宿主细胞包含:(a)O抗原多糖的rfb基因簇的核苷酸序列;(b)编码载体蛋白、优选EPA的核苷酸序列,该载体蛋白包含至少一个糖基化位点,该至少一个糖基化位点包含具有SEQ ID NO:1、优选SEQ ID NO:2的糖基化共有序列,并且更优选地,该载体蛋白包含四个糖基化位点,每个糖基化位点包含具有SEQ ID NO:2的共有序列;和(c)编码寡糖基转移酶,例如PglB寡糖基转移酶或其变体的核苷酸序列。

[0158] 在某些实施例中,大肠杆菌O抗原多糖以按重量计特定的多糖与蛋白质比率(w/w)共价结合至载体蛋白。按重量计共价结合至载体蛋白的按重量计O抗原多糖的量的比率被称为“聚糖/蛋白质比率”或“多糖/蛋白质比率”或“PS/蛋白质比率”。在一些实施例中,O抗原多糖以约1:20至20:1、优选1:10至10:1、更优选1:3至3:1的多糖与蛋白质(w/w)比率共价结合至载体蛋白。在本文所述的生物缀合物的某些非限制性实施例中,聚糖/蛋白质比率为约0.1至0.5,如0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45或0.5。在此类实施例中,O抗原多糖:蛋白质的重量比为约1:10至1:2,如1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3或1:2,这取决于特定的O抗原血清型。在某些实施例中,聚糖/蛋白质比率为约0.15至约0.45。通常,较高的O抗原多糖与载体蛋白的聚糖/蛋白质比率是优选的,因为在一些情况下,大量的载体蛋白可能会导致免疫干扰。此外,较高的聚糖/蛋白质比率将有助于获得足够的以生物缀合物形式给予的O抗原多糖,同时保持载体蛋白的量相对较低,这对于多价组合物尤其有益,其中该组合物将覆盖多种血清型,例如,包含来自至少4种不同的O抗原、至少5种不同的O抗原、至少6种不同的O抗原、至少7种不同的O抗原、至少8种不同的O抗原、至少9种不同的O抗原、至少10种不同的O抗原等的生物缀合物的组合物。

[0159] 根据本发明的缀合物的聚糖/蛋白质比率可以通过确定蛋白质量和聚糖量来确定。蛋白质量可以通过测量280nm处的UV吸光度(A280)来确定。聚糖量可以基于重复单元中糖(例如,表1中O8的Man和表1中其他聚糖的GlcNAc)的离子色谱脉冲安培检测法(IC-PAD)确定,这之后,可使用重复单元的结构信息来计算总聚糖量(例如,O1A的重复单元的摩尔质量为845Da,一摩尔此类重复单元包含一摩尔GlcNAc,从而当GlcNAc的量已通过IC-PAD确定时,可计算总聚糖量)。

[0160] 在一些实施例中,如本文所述的与载体蛋白共价连接的大肠杆菌O25B抗原多糖的生物缀合物在L-Rh糖的位置2处具有一定程度的乙酰化。(生物)缀合物中O25B抗原多糖的O-乙酰化程度优选为至少30%,优选至少50%,如至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

[0161] 类似地,(生物)缀合物中大肠杆菌O16抗原多糖的O-乙酰化程度优选为至少30%,优选至少50%,如至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

[0162] 在特定的实施例中,制备O抗原多糖的生物缀合物的方法包括提供重组宿主细胞,该重组宿主细胞包含编码特定寡糖基转移酶、特别是PglB寡糖基转移酶或其变体的核酸序

列,这取决于要生产的O抗原多糖生物缀合物。特定的寡糖基转移酶变体可能影响宿主细胞产生的生物缀合物的产量。典型地,因为产量会影响生产特定生物缀合物的成本,所以较高的产量是优选的,这对于包含几种不同生物缀合物的多价组合物尤其重要。

[0163] 在一个特定实施例中,当O抗原为O75抗原多糖时,PglB寡糖基转移酶包含氨基酸突变N311V,其中氨基酸突变是相对于具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的野生型PglB而言的。

[0164] 在另一个特定实施例中,当O抗原是O1A、O6A或O15抗原多糖时,PglB寡糖基转移酶包含氨基酸突变N311V、K482R、D483H和A669V,其中氨基酸突变是相对于具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的野生型PglB而言的。

[0165] 在另一个特定实施例中,当O抗原为葡糖基化O4抗原多糖时,PglB寡糖基转移酶包含氨基酸突变N311V、或氨基酸突变Y77H和N311V,其中氨基酸突变是相对于具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的野生型PglB而言的。

[0166] 在另一个特定实施例中,当O抗原为O16抗原多糖时,PglB寡糖基转移酶包含氨基酸突变Y77H、S80R、Q287P、K289R和N311V,其中氨基酸突变是相对于具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的野生型PglB而言的。

[0167] 在另一个特定实施例中,当O抗原为O8、O18A、O25B或O2抗原多糖时,PglB寡糖基转移酶包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:6在位置77、80、287、289、311、482、483和669处不包含氨基酸突变。在其某些实施例中,PglB寡糖基转移酶包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0168] 在一些实施例中,根据上文指出的O抗原/PglB寡糖基转移酶配对,由编码寡糖基转移酶的重组宿主细胞产生的O抗原多糖的生物缀合物优选地具有一种或多种本文所述的优选属性,例如聚糖/蛋白质比率和/或多糖基化载体蛋白的百分比。

[0169] 组合物和组合

[0170] 本文提供了组合物和组合,这些组合物和组合包含大肠杆菌O75和O6抗原多糖,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,并且任选地进一步包含一种或多种、优选全部的大肠杆菌O1、O2、O4、O15、O16、O18、O25抗原多糖,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白。O抗原多糖或缀合物(例如生物缀合物)的组合可以包含多种组合物,但优选的是O抗原多糖或缀合物(例如生物缀合物)的组合存在于同一组合物中。

[0171] 本文所述的组合物和组合可用于治疗和预防受试者(例如,人类受试者)被大肠杆菌感染,优选地预防侵袭性ExPEC疾病。在一些实施例中,组合物是免疫原性组合物。如本文所用,“免疫原性组合物”是指可在施用组合物的宿主或受试者中引发免疫应答的组合物。组合物和免疫原性组合物可以进一步包含药学上可接受的载体。如本文所用,术语“药学上可接受的”意指被联邦政府或州政府的监管机构核准,或列出于美国药典,或用于在动物、并且更特别地在人类中使用的其他普遍认可的药典中。如本文所用,在药学上可接受的载体的背景下,术语“载体”是指与药物组合物一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂、或媒介物。盐水溶液和右旋糖水溶液以及甘油溶液也可以用作液体载体,特别是对于可注射溶液而言。合适的赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇等。合适的药物载体的实例描述于E.W.Martin的“Remington’sPharmaceutical Sciences[雷明顿药物科学]”中。

[0172] 在一个实施例中,本发明的组合物包含在Tris缓冲盐水(TBS)pH 7.4(例如,含有例如分别为25mM、137mM和2.7mM的Tris、NaCl和KCl)中的如本文所述的(生物)缀合物。在其他实施例中,本发明的组合物包含在约10mM KH_2PO_4/Na_2HPO_4缓冲液(pH为约7.0)、约5%(w/v)山梨糖醇、约10mM甲硫氨酸以及约0.02%(w/v)聚山梨醇酯80中的如本文所述的(生物)缀合物。在其他实施例中,本发明的组合物包含在约10mM KH_2PO_4/Na_2HPO_4缓冲液(pH为约7.0)、约8%(w/v)蔗糖、约1mM EDTA以及约0.02%(w/v)聚山梨醇酯80中的如本文所述的(生物)缀合物(针对与EPA载体蛋白共价结合的大肠杆菌O抗原的生物缀合物的合适缓冲液,参见例如WO 2018/077853)。在其他实施例中,本发明的组合物包含在约5mM琥珀酸盐/0.9% NaCl(pH 6.0)中的如本文所述的(生物)缀合物。

[0173] 本文提供的组合物(例如,药物组合物和/或免疫原性组合物)是多价组合物,例如二价、三价、四价等组合物。例如,多价组合物包含多于一种抗原(如大肠杆菌O抗原)、糖缀合物或其生物缀合物。在特定的实施例中,本文提供的多价组合物包含大肠杆菌O75抗原多糖的生物缀合物和大肠杆菌O6A抗原多糖的生物缀合物。在一些实施例中,本文提供的多价组合物包含至少一种额外的抗原或生物缀合物。

[0174] 典型地,本发明的组合物可以通过以下方式来制备:首先通过将O抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白(例如通过化学缀合或生物缀合)而获得如本文所述的每种大肠杆菌O抗原多糖的单独糖缀合物,然后以如本文所述的量和比率混合这些单独的糖缀合物以获得根据本发明的组合物。

[0175] 在一个实施例中,组合物(例如,药物组合物和/或免疫原性组合物)是包含与如本文所述的载体蛋白共价连接的大肠杆菌O75抗原多糖和至少一种额外抗原的多价组合物。

[0176] 在一些实施例中,额外的抗原是抗原糖或多糖,更优选大肠杆菌O抗原多糖,如O1、O2、O4、O6、O8、O15、O16、O18和O25血清型及其血清亚型中的一种或多种的大肠杆菌O抗原,优选各自单独缀合至载体蛋白,其中针对每种血清型的载体蛋白在一些或全部血清型之间可以相同或可以不同。优选地,包含大肠杆菌O75多糖的(生物)缀合物的多价组合物进一步包含O1、O2、O4、O6、O15、O16、O18和O25血清型或其血清亚型中的每一种的大肠杆菌O抗原。在一些实施例中,每种额外大肠杆菌O抗原多糖是糖缀合物,这意味着大肠杆菌O抗原多糖共价连接至另一种化学物质,例如蛋白质、肽、脂质等,最优选载体蛋白,例如通过化学方法或酶促方法。在优选的实施例中,每种额外大肠杆菌O抗原多糖是生物缀合物,其中O抗原多糖通过宿主细胞机制酶促地经由糖苷键共价连接至例如载体蛋白。在某些实施例中,多价组合物进一步包含O8血清型的大肠杆菌O抗原,优选呈糖缀合物、优选生物缀合物的形式。在某些实施例中,本文提供的组合物可以包含1-20种额外的糖缀合物,更优选大肠杆菌O抗原多糖的生物缀合物,如大肠杆菌O抗原多糖的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20种额外的糖缀合物或优选生物缀合物。其他抗原(如肽、蛋白质或脂质抗原等)可以包括在本文提供的组合物中。

[0177] 在一些实施例中,组合物(例如,药物组合物和/或免疫原性组合物)包含大肠杆菌O75抗原多糖的(生物)缀合物和大肠杆菌O6抗原多糖的(生物)缀合物、以及至少一种选自由以下组成的组的额外抗原多糖:大肠杆菌O1抗原多糖、大肠杆菌O2抗原多糖、大肠杆菌葡糖基化O4抗原多糖、大肠杆菌O8抗原多糖、大肠杆菌O15抗原多糖、大肠杆菌O16抗原多糖、大肠杆菌O18抗原多糖和大肠杆菌O25抗原多糖,优选至少大肠杆菌O1抗原多糖、大肠杆菌

02抗原多糖和大肠杆菌025抗原多糖,更优选至少大肠杆菌01抗原多糖、大肠杆菌02抗原多糖、大肠杆菌025抗原多糖、大肠杆菌04抗原多糖、大肠杆菌015抗原多糖、大肠杆菌016抗原多糖和大肠杆菌018抗原多糖。优选地,01抗原多糖是01A抗原多糖,06抗原多糖是06A抗原多糖,04抗原多糖是葡糖基化04抗原多糖,018抗原多糖是018A抗原多糖,并且025抗原多糖是025B抗原多糖。优选地,每种额外的O抗原多糖共价连接至载体蛋白,并且每种额外的O抗原多糖更优选地是生物缀合物。

[0178] 在一些实施例中,组合物包含大肠杆菌075以及大肠杆菌01、02或06抗原多糖中的至少一种,优选大肠杆菌01或06抗原多糖中的至少一种,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,并且其中075抗原多糖与01、02和/或06抗原多糖的浓度比为约1.2:1至约8:1,优选约1.5:1至约4:1,更优选约2:1,例如约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或2.5:1。在优选的实施例中,组合物进一步包含共价连接至载体蛋白的大肠杆菌025抗原多糖,优选大肠杆菌025B抗原多糖,并且其中025抗原多糖与01、02和/或06抗原多糖的浓度比为约1.5:1至约4:1,优选约2:1。在此类实施例中,优选025抗原多糖与075抗原多糖的浓度比为约2:1至约1:1,优选约1.5:1,更优选约1:1。在其某些实施例中,025抗原多糖与02抗原多糖的浓度比为约4:1至约2:1。在某些实施例中,组合物包含大肠杆菌075、01、02、06和025抗原多糖,优选地其中01、06和025抗原多糖分别是01A、06A和025B多糖,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,并且其中抗原多糖075:01:02:06:025的浓度比为约2:1:1:1:2。在某些实施例中,O抗原通过生物缀合共价连接至载体蛋白,例如经由N-连接来连接至载体蛋白中的Asn残基。在某些实施例中,组合物中075抗原多糖的浓度为约8-64μg/mL,优选约16-32μg/mL,优选约28-36μg/mL,例如约32μg/mL。在某些实施例中,组合物进一步包含一种或多种、优选全部的大肠杆菌04、015、016、018抗原多糖,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,优选地其中04是葡糖基化的,并且018抗原是018A。在某些实施例中,组合物进一步包含共价连接至载体蛋白的大肠杆菌08抗原多糖。在某些实施例中,抗原多糖075:04:015:016:018:08(在这些中的每一种均存在于组合物中的情况下)的浓度比为约2:1:1:1:1:1。在另外的实施例中,组合物可以包含一种或多种其他大肠杆菌O抗原多糖,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白。

[0179] 在一个实施例中,将01抗原多糖(例如,呈分离形式或作为糖缀合物或生物缀合物的一部分)用于本文提供的组合物中(例如,与075抗原多糖或其生物缀合物组合)。在一个特定实施例中,01抗原多糖包含如表1所示的式(01A)的结构,其中n为1-100的整数,优选3-50,例如5-40,优选5-30,例如7至25,例如10至20。优选地,01抗原多糖是生物缀合物的一部分并且共价连接至载体蛋白(例如EPA或CRM_{197})。在某些实施例中,组合物中和/或施用于受试者的075:01抗原多糖之间的权重比在约1.2:1和8:1之间,优选地在约1.5:1和4:1之间,更优选约2:1,例如约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或2.5:1。

[0180] 在一个实施例中,将02抗原多糖(例如,呈分离形式或作为糖缀合物或生物缀合物的一部分)用于本文提供的组合物中(例如,与075抗原多糖或其生物缀合物组合)。在一个特定实施例中,02抗原多糖包含如表1所示的式(02)的结构,其中n为1-100的整数,优选3-50,例如5-40,优选5-30,例如7至25,例如10至20。优选地,02抗原多糖是生物缀合物的一部分并且共价连接至载体蛋白(例如EPA或CRM_{197})。在某些实施例中,组合物中和/或施用于受

试者的075:02抗原多糖之间的权重比在约1.2:1和8:1之间,优选地在约1.5:1和4:1之间,更优选约2:1,例如约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或2.5:1。

[0181] 在一个实施例中,将04抗原多糖(例如,呈分离形式或作为糖缀合物或生物缀合物的一部分)用于本文提供的组合物中(例如,与075抗原多糖或其生物缀合物组合)。在一个特定实施例中,04抗原多糖是葡糖基化04抗原多糖,并且在一个特定实施例中,其包含如表1所示的式(04-Glc+)的结构,其中n为1-100的整数,优选3-50,例如5-40,优选5-30,例如7至25,例如10至20。优选地,04抗原多糖是生物缀合物的一部分并且共价连接至载体蛋白(例如EPA或CRM_{197})。在某些实施例中,组合物中和/或施用于受试者的075:04抗原多糖之间的权重比在约1.2:1和8:1之间,优选地在约1.5:1和4:1之间,更优选约2:1,例如约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或2.5:1。

[0182] 在一个实施例中,将06抗原多糖(例如,呈分离形式或作为糖缀合物或生物缀合物的一部分)用于本文提供的组合物中(例如,与075抗原多糖或其生物缀合物组合)。在一个特定实施例中,06抗原多糖包含如表1所示的式(06A)的结构,其中n为1-100的整数,优选3-50,例如5-40,优选5-30,例如7至25,例如10至20。优选地,06抗原多糖是生物缀合物的一部分并且共价连接至载体蛋白(例如EPA或CRM_{197})。在某些实施例中,组合物中和/或施用于受试者的075:06抗原多糖之间的权重比在约1.2:1和8:1之间,优选地在约1.5:1和4:1之间,更优选约2:1,例如约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或2.5:1。

[0183] 在一个实施例中,将08抗原多糖(例如,呈分离形式或作为糖缀合物或生物缀合物的一部分)用于本文提供的组合物中(例如,与075抗原多糖或其生物缀合物组合)。在一个特定实施例中,08抗原多糖包含如表1所示的式(08)的结构,其中n为1-100的整数,优选3-50,例如5-40,优选5-30,例如7至25,例如10至20。优选地,08抗原多糖是生物缀合物的一部分并且共价连接至载体蛋白(例如EPA或CRM_{197})。在某些实施例中,组合物中和/或施用于受试者的075:08抗原多糖之间的权重比在约1.2:1和8:1之间,优选地在约1.5:1和4:1之间,更优选约2:1,例如约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或2.5:1。

[0184] 在一个实施例中,将015抗原多糖(例如,呈分离形式或作为糖缀合物或生物缀合物的一部分)用于本文提供的组合物中(例如,与075抗原多糖或其生物缀合物组合)。在一个特定实施例中,015抗原多糖包含如表1所示的式(015)的结构,其中n为1-100的整数,优选3-50,例如5-40,优选5-30,例如7至25,例如10至20。优选地,015抗原多糖是生物缀合物的一部分并且共价连接至载体蛋白(例如EPA或CRM_{197})。在某些实施例中,组合物中和/或施用于受试者的075:015抗原多糖之间的权重比在约1.2:1和8:1之间,优选地在约1.5:1和4:1之间,更优选约2:1,例如约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或2.5:1。

[0185] 在一个实施例中,将016抗原多糖(例如,呈分离形式或作为糖缀合物或生物缀合物的一部分)用于本文提供的组合物中(例如,与075抗原多糖或其生物缀合物组合)。在一个特定实施例中,016抗原多糖包含如表1所示的式(016)的结构,其中n为1-100的整数,优选3-50,例如5-40,优选5-30,例如7至25,例如10至20。优选地,016抗原多糖是生物缀合物

的一部分并且共价连接至载体蛋白(例如EPA或CRM_{197})。在某些实施例中,组合物中和/或施用于受试者的075:016抗原多糖之间的权重比在约1.2:1和8:1之间,优选地在约1.5:1和4:1之间,更优选约2:1,例如约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或2.5:1。

[0186] 在一个实施例中,将018抗原多糖(例如,呈分离形式或作为糖缀合物或生物缀合物的一部分)用于本文提供的组合物中(例如,与075抗原多糖或其生物缀合物组合)。在一个特定实施例中,018抗原多糖包含如表1所示的式(018A)的结构,其中n为1-100的整数,优选3-50,例如5-40,优选5-30,例如7至25,例如10至20。优选地,018抗原多糖是生物缀合物的一部分并且共价连接至载体蛋白(例如EPA或CRM_{197})。在某些实施例中,组合物中和/或施用于受试者的075:018抗原多糖之间的权重比在约1.2:1和8:1之间,优选地在约1.5:1和4:1之间,更优选约2:1,例如约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或2.5:1。

[0187] 在一个实施例中,将025抗原多糖(例如,呈分离形式或作为糖缀合物或生物缀合物的一部分)用于本文提供的组合物中(例如,与075抗原多糖或其生物缀合物组合)。在一个特定实施例中,025抗原多糖包含025B抗原多糖,并且在一个特定实施例中,其包含如表1所示的式(025B)的结构,其中n为1-100的整数,优选3-50,例如5-40,优选5-30,例如7至25,例如10至20。优选地,025抗原多糖是生物缀合物的一部分并且共价连接至载体蛋白(例如EPA或CRM_{197})。在某些实施例中,组合物中和/或施用于受试者的075:025抗原多糖之间的权重比在约1:4和1:0.5之间,优选地在约1:2和1:1之间,更优选约1:1,例如约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或1:0.5。

[0188] 在另一个实施例中,组合物(例如,药物组合物和/或免疫原性组合物)至少包含与载体蛋白缀合的大肠杆菌075、01、02、04、06和025抗原多糖,优选地包含与载体蛋白(例如EPA或CRM_{197})共价连接的075、01A、02、葡糖基化04、06A和025B抗原多糖的生物缀合物(即,至少六价组合物)。在一个实施例中,组合物中和/或施用于受试者的075:01:02:04:06:025抗原多糖之间的权重比为约2:1:1:1:1:2。

[0189] 在一个优选的实施例中,组合物(例如,药物组合物和/或免疫原性组合物)至少包含与载体蛋白缀合的大肠杆菌01、02、04、06、015、016、018、025和075抗原多糖,优选地包含与载体蛋白(例如EPA或CRM_{197})共价连接的01A、02、葡糖基化04、06A、015、016、018A、025B和075抗原多糖的生物缀合物(即,至少9价组合物)。在一个实施例中,组合物中和/或施用于受试者的075:01:02:04:06:015:016:018:025抗原多糖之间的权重比为约2:1:1:1:1:1:1:1:2。

[0190] 在另一个优选的实施例中,组合物(例如,药物组合物和/或免疫原性组合物)至少包含与载体蛋白缀合的大肠杆菌01、02、04、06、08、015、016、018、025和075抗原多糖,优选地包含与载体蛋白(例如EPA或CRM_{197})共价连接的01A、02、葡糖基化04、06A、08、015、016、018A、025B和075抗原多糖的生物缀合物(即,至少10价组合物)。在一个实施例中,组合物中和/或施用于受试者的075:01:02:04:06:08:015:016:018:025抗原多糖之间的权重比为约2:1:1:1:1:1:1:1:1:2。

[0191] 本文还涵盖如下组合物,这些组合物任选地进一步包含来自其他大肠杆菌血清型的额外O抗原(例如,呈分离形式,或作为糖缀合物或生物缀合物的一部分)。在一些实施例

中,组合物(例如,药物组合物和/或免疫原性组合物)至少包含如上所述的6价、9价或10价组合物,并且进一步包含1至15种额外的大肠杆菌抗原多糖,如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15种额外的大肠杆菌抗原多糖,优选与载体蛋白(例如EPA或CRM_{197})共价连接的抗原多糖的(生物)缀合物。在某些实施例中,如上所述的6价、9价或10价组合物不包含额外的大肠杆菌抗原多糖或其缀合物,即,此类组合物包括6、9或10种但不包括更多种大肠杆菌抗原多糖,这些抗原多糖分别优选地呈缀合物、优选生物缀合物的形式。因此,一个实施例是提供组合物,该组合物包含9种缀合物,特别是大肠杆菌O1、O2、O4、O6、O15、O16、O18、O25和O75抗原多糖与载体蛋白缀合,优选与载体蛋白(例如EPA或CRM_{197})共价连接的O1A、O2、葡糖基化O4、O6A、O15、O16、O18A、O25B和O75抗原多糖的生物缀合物(即,9价组合物),并且该组合物不包含与载体蛋白共价连接的大肠杆菌O抗原多糖的额外缀合物。因此,另一个实施例是提供组合物,该组合物包含10种缀合物,特别是大肠杆菌O1、O2、O4、O6、O8、O15、O16、O18、O25和O75抗原多糖与载体蛋白缀合,优选与载体蛋白(例如EPA或CRM_{197})共价连接的O1A、O2、葡糖基化O4、O6A、O8、O15、O16、O18A、O25B和O75抗原多糖的生物缀合物(即,10价组合物),并且该组合物不包含与载体蛋白共价连接的大肠杆菌O抗原多糖的额外缀合物。

[0192] 在一些优选的实施例中,额外的大肠杆菌O1、O2、O4、O6、O15、O16、O18和/或O25抗原多糖中的每一种共价连接至载体蛋白。O抗原多糖可以通过化学或其他合成方法与载体蛋白连接,或O抗原多糖可以是生物缀合物的一部分,并且优选是生物缀合物的一部分。优选地,被组合物覆盖的每种血清型的O抗原各自单独地与载体蛋白偶联,即覆盖特定血清型的每种糖缀合物或生物缀合物可以在混合到根据本发明的组合物中之前单独产生。对于组合物中的每种糖缀合物或生物缀合物,载体蛋白可以优选地是相同的;或者可替代地对于一些或全部的大肠杆菌O抗原,载体蛋白可以不同,例如不同血清型的O抗原也可以与不同的载体蛋白缀合。鉴于本披露内容,可以使用本领域已知的任何载体蛋白。合适的载体蛋白包括但不限于铜绿假单胞菌去毒外毒素A(EPA)、大肠杆菌鞭毛蛋白(FliC)、CRM197、麦芽糖结合蛋白(MBP)、白喉类毒素、破伤风类毒素、金黄色葡萄球菌的去毒溶血素A、凝集因子A、凝集因子B、大肠杆菌不耐热肠毒素、大肠杆菌不耐热肠毒素的去毒变体、霍乱毒素B亚基(CTB)、霍乱毒素、霍乱毒素的去毒变体、大肠杆菌Sat蛋白、大肠杆菌Sat蛋白的载客结构域、肺炎链球菌溶血素、钥孔戚血蓝蛋白(KLH)、铜绿假单胞菌PcrV、脑膜炎奈瑟菌的外膜蛋白(OMPC)、以及来自不可分型流感嗜血杆菌的蛋白D。优选地,载体蛋白是EPA或CRM_{197}。

[0193] 在一些实施例中,额外的大肠杆菌O1(A)、O2、(葡糖基化的)O4、O6(A)、O15、O16、O18(A)和/或O25(B)抗原多糖中的每一种,特别是当作为生物缀合物的一部分时,共价连接至载体蛋白中的天冬酰胺(Asn)残基,其中Asn残基存在于包含糖基化共有序列Asn-X-Ser(Thr)(SEQ ID NO:1)的糖基化位点中,其中X可以是除Pro以外的任何氨基酸,优选地其中Asn残基存在于包含糖基化共有序列Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr)(SEQ ID NO:2)的糖基化位点中,其中X和Z独立地选自除Pro以外的任何氨基酸。载体蛋白可以包含1-10个糖基化位点,优选2至4个糖基化位点,最优选4个糖基化位点,每个糖基化位点均包含糖基化共有序列。在一个特定实施例中,载体蛋白是EPA-4载体蛋白,例如包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的EPA-4载体蛋白。

[0194] 在一个特定实施例中,本文提供了组合物(例如,药物组合物和/或免疫原性组合物),该组合物包含:(i)与包含SEQ ID NO:3的铜绿假单胞菌去毒外毒素A载体蛋白(EPA-4

载体蛋白)共价连接的大肠杆菌075抗原多糖的生物缀合物,其中大肠杆菌075抗原多糖包含式(075)的结构;(ii)与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌01A抗原多糖的生物缀合物,其中大肠杆菌01A抗原多糖包含式(01A)的结构;(iii)与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌02抗原多糖的生物缀合物,其中大肠杆菌02抗原多糖包含式(02)的结构;(iv)与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌06A抗原多糖的生物缀合物,其中大肠杆菌06A抗原多糖包含式(06A)的结构;(v)与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌015抗原多糖的生物缀合物,其中大肠杆菌015抗原多糖包含式(015)的结构;(vi)与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌016抗原多糖的生物缀合物,其中大肠杆菌016抗原多糖包含式(016)的结构;(vii)与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌018A抗原多糖的生物缀合物,其中大肠杆菌018A抗原多糖包含式(018A)的结构;(viii)与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌025B抗原多糖的生物缀合物,其中大肠杆菌025B抗原多糖包含式(025B)的结构;以及(ix)与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌葡糖基化04抗原多糖的生物缀合物,其中大肠杆菌葡糖基化04抗原多糖包含式(04-Glc+)的结构,其中各个式在表1中提供,并且对于每个式,n独立地为1至100的整数,例如1至50,优选3至50,例如5至40,优选5-30,例如7至25,例如10至20。

[0195] 在一个特定实施例中,所述组合物(例如,药物组合物和/或免疫原性组合物)进一步包含:(x)与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌08抗原多糖的生物缀合物,其中大肠杆菌08抗原多糖包含如表1所示的式(08)的结构,其中针对该结构,n为1至100的整数,例如1至50,优选3至50,例如5至40,优选5-30,例如7至25,例如10至20。

[0196] 在一些实施例中,本文提供的组合物包含大肠杆菌075抗原多糖的缀合物以及至少大肠杆菌06抗原多糖、优选06A抗原多糖的缀合物,其中大肠杆菌075抗原多糖的缀合物以比组合物中存在的06抗原多糖的浓度高约1.2至8倍,例如高约2至4倍,如高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或8倍的浓度存在于组合物中(所有浓度均基于O抗原多糖的重量)。优选地,组合物中存在的大肠杆菌075抗原多糖的浓度是组合物中06抗原多糖的浓度的约1.5至2.5倍,如1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4或2.5倍。

[0197] 在特定的实施例中,组合物包含大肠杆菌01A、02、葡糖基化04、06A、015、016、018、025B和075抗原多糖的生物缀合物,其中01A:02:葡糖基化04:06A:015:016:018:025B:075的生物缀合物以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、优选约1:1:1:1:1:1:1:2:2的比率(按O抗原多糖的重量计)存在。

[0198] 在特定的实施例中,组合物包含大肠杆菌01A、02、葡糖基化04、06A、08、015、016、018A、025B和075抗原多糖的生物缀合物,其中01A:02:葡糖基化04:06A:08:015:016:018A:025B:075的生物缀合物以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或2:1:1:2:1:1:1:1:4:4、优选约1:1:1:1:1:1:1:1:2:2的比率(按O抗原多糖的重量计)存在。

[0199] 在一些实施例中,本文提供的组合物包含大肠杆菌075抗原多糖的生物缀合物以及至少大肠杆菌06抗原多糖的生物缀合物,其中大肠杆菌075抗原多糖的生物缀合物以约8至约50μg/mL,优选约12至约40μg/mL,更优选约16至约32μg/mL,如16、18、20、22、24、26、28、30或32μg/mL,优选约32μg/mL的浓度存在于组合物中。大肠杆菌075抗原多糖的生物缀合物

的浓度优选地比组合物中存在的O6生物缀合物的浓度高约1.2至约8倍,例如高约2至4倍,如高1.5、2、3、4、5、6、7或8倍。

[0200] 在一个特定实施例中,提供了药物组合物,该组合物包含:

[0201] (i)与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌O1A抗原多糖的生物缀合物,多糖浓度为约12至20、优选约16μg/mL;

[0202] (ii)与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌O2抗原多糖的生物缀合物,多糖浓度为约12至20、优选约16μg/mL;

[0203] (iii)与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌O4抗原多糖的生物缀合物,多糖浓度为约12至20、优选约16μg/mL;

[0204] (iv)与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌O6A抗原多糖的生物缀合物,多糖浓度为约12至20、优选约16μg/mL;

[0205] (v)与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌O15抗原多糖的生物缀合物,多糖浓度为约12至20、优选约16μg/mL;

[0206] (vi)与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌O16抗原多糖的生物缀合物,多糖浓度为约12至20、优选约16μg/mL;

[0207] (vii)与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌O18A抗原多糖的生物缀合物,多糖浓度为约12至20、优选约16μg/mL;

[0208] (viii)与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌O25B抗原多糖的生物缀合物,多糖浓度为约28至36、优选约32μg/mL;以及

[0209] (ix)与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌O75抗原多糖的生物缀合物,多糖浓度为约28至36、优选约32μg/mL;

[0210] 其中EPA-4载体蛋白包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,并且

[0211] O1A、O2、O4、O6A、O15、O16、O18A、O25B和O75抗原多糖分别包含如表1所示的式(O1A)、(O2)、(O4-Glc+)、(O6A)、(O15)、(O16)、(O18A)、(O25B)和(O75)的结构,其中每个n独立地为1至100的整数,优选3至50,例如5至40,更优选5至30,例如7至25,例如10至20。

[0212] 在某些实施例中,这种组合物进一步包含:

[0213] (x)与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌O75抗原多糖的生物缀合物,多糖浓度为约12至20、优选约16μg/mL;

[0214] 其中O8抗原多糖包含如表1所示的式(O8)的结构,其中n为1至100的整数,优选3至50,例如5至40,更优选5至30,例如7至25,例如10至20。

[0215] 在一个实施例中,提供了组合物,该组合物包含与载体蛋白共价连接的大肠杆菌O75抗原多糖的生物缀合物,其中O75抗原多糖的浓度为至少约32μg/mL。

[0216] 在一个实施例中,提供了组合物,该组合物包含:

[0217] (i)与载体蛋白共价连接的大肠杆菌O1A抗原多糖的生物缀合物,其中大肠杆菌O1A抗原多糖包含式(O1A)的结构;

[0218] (ii)与载体蛋白共价连接的大肠杆菌O2抗原多糖的生物缀合物,其中大肠杆菌O2抗原多糖包含式(O2)的结构;

[0219] (iii)与载体蛋白共价连接的大肠杆菌葡糖基化O4抗原多糖的生物缀合物,其中大肠杆菌葡糖基化O4抗原多糖包含式(O4-Glc+)的结构;

[0220] (iv)与载体蛋白共价连接的大肠杆菌O6A抗原多糖的生物缀合物,其中大肠杆菌O6A抗原多糖包含式(O6A)的结构;

[0221] (v)与载体蛋白共价连接的大肠杆菌O15抗原多糖的生物缀合物,其中大肠杆菌O15抗原多糖包含式(O15)的结构;

[0222] (vi)与载体蛋白共价连接的大肠杆菌O16抗原多糖的生物缀合物,其中大肠杆菌O16抗原多糖包含式(O16)的结构;

[0223] (vii)与载体蛋白共价连接的大肠杆菌O18A抗原多糖的生物缀合物,其中大肠杆菌O18A抗原多糖包含式(O18A)的结构;

[0224] (viii)与载体蛋白共价连接的大肠杆菌O25B抗原多糖的生物缀合物,其中大肠杆菌O25B抗原多糖包含式(O25B)的结构;以及

[0225] (ix)与载体蛋白共价连接的大肠杆菌O75抗原多糖的生物缀合物,其中大肠杆菌O75抗原多糖包含式(O75)的结构;

[0226] 其中式(O1A)、(O2)、(O4-Glc+)、(O6A)、(O15)、(O16)、(O18A)、(O25B)和(O75)的各结构如表1所示,其中每个n独立地为1至100的整数,优选3至50,例如5至40,更优选5至30,例如7至25,例如10至20,

[0227] 其中组合物中存在的大肠杆菌抗原多糖由O1A、O2、O4-Glc+、O6A、O15、O16、O18A、O25B和O75组成。优选地,载体蛋白是铜绿假单胞菌去毒外毒素A(EPA-4),更优选地,EPA-4包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。优选地,O75抗原多糖与O1A、O2和/或O6A抗原多糖的浓度比为约1.2:1至约8:1,优选约1.5:1至约4:1,更优选约2:1。优选地,组合物中存在的大肠杆菌抗原多糖由比率为1:1:1:1:1:1:1:2:2的O1A、O2、O4-Glc+、O6A、O15、O16、O18A、O25B和O75组成。

[0228] 在一个一般方面,本文提供了包含大肠杆菌O75和O6抗原多糖的组合物,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,并且其中O75抗原多糖与O6抗原多糖的浓度比为约1.2:1至约8:1,优选约1.5:1至约4:1,优选约1.5:1至约2.5:1,更优选约2:1。

[0229] 在某些实施例中,组合物进一步包含一种或多种、优选全部的大肠杆菌O1、O2、O4、O15、O16、O18、O25抗原多糖,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,

[0230] 优选地其中O1抗原为O1A,O4为葡糖基化的,O6抗原为O6A,O18抗原为O18A,并且O25抗原为O25B。

[0231] 在某些实施例中,

[0232] 大肠杆菌O1抗原多糖包含表1所示的式(O1A)的结构,

[0233] 大肠杆菌O2抗原多糖包含表1所示的式(O2)的结构,

[0234] 大肠杆菌O4抗原多糖包含表1所示的式(O4-Glc+)的结构,

[0235] 大肠杆菌O6抗原多糖包含表1所示的式(O6A)的结构,

[0236] 大肠杆菌O15抗原多糖包含表1所示的式(O15)的结构,

[0237] 大肠杆菌O16抗原多糖包含表1所示的式(O16)的结构,

[0238] 大肠杆菌O18抗原多糖包含表1所示的式(O18A)的结构,

[0239] 大肠杆菌O25抗原多糖包含表1所示的式(O25B)的结构,并且

[0240] 大肠杆菌O75抗原多糖包含表1所示的式(O75)的结构,

[0241] 其中每个n独立地为1至100的整数,优选3至50,例如5至40,优选5至30,例如7至

25,例如10至20。

[0242] 在某些实施例中,大肠杆菌抗原多糖01:02:04:06:015:016:018:025:075的权重比为1:1:1:1:1:1:1:2:2。

[0243] 在某些实施例中,075抗原多糖的浓度为约8至约50μg/mL,优选12至40μg/mL,例如16-32μg/mL,优选约32μg/mL。

[0244] 在某些实施例中,组合物进一步包含至少一种共价连接至载体蛋白的额外大肠杆菌抗原多糖。

[0245] 在一个特定实施例中,至少一种额外的大肠杆菌抗原多糖包含具有表1所示的式(08)的08抗原多糖,其中n为1至100的整数,优选3至50,例如5至40,优选5至30,例如7至25,例如10至20。

[0246] 在某些实施例中,每种载体蛋白独立地选自由以下组成的组:铜绿假单胞菌去毒外毒素A(EPA)、大肠杆菌鞭毛蛋白(FliC)、CRM197、麦芽糖结合蛋白(MBP)、白喉类毒素、破伤风类毒素、金黄色葡萄球菌的去毒溶血素A、凝集因子A、凝集因子B、大肠杆菌不耐热肠毒素、大肠杆菌不耐热肠毒素的去毒变体、霍乱毒素B亚基(CTB)、霍乱毒素、霍乱毒素的去毒变体、大肠杆菌Sat蛋白、大肠杆菌Sat蛋白的载客结构域、肺炎链球菌溶血素、钥孔戚血蓝蛋白(KLH)、铜绿假单胞菌PcrV、脑膜炎奈瑟菌的外膜蛋白(OMPC)、以及来自不可分型流感嗜血杆菌的蛋白D。

[0247] 在一个特定实施例中,载体蛋白是铜绿假单胞菌去毒外毒素A(EPA)或CRM197。

[0248] 在某些实施例中,载体蛋白包含1至20个,如1至10个或2至4个具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的糖基化共有序列,优选具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的共有序列,最优选地,载体蛋白包含四个糖基化共有序列。

[0249] 在一个特定实施例中,每种载体蛋白均为包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的EPA。

[0250] 在某些实施例中,大肠杆菌抗原多糖通过生物缀合或通过化学缀合与载体蛋白共价连接。化学缀合可以例如包括还原胺化化学法(RAC)、单端缀合、与(2-((2-氧代乙基)硫代)乙基)氨基甲酸酯(eTEC)间隔子的缀合、使用或不使用ADH间隔子的氰化化学法(CNBr、CDAP)、硫醚化学法(基于马来酰亚胺/溴乙酰基接头)或EDC-N-羟基琥珀酰亚胺零接头化学法。

[0251] 在某些实施例中,大肠杆菌抗原多糖通过生物缀合共价连接至载体蛋白,优选多糖共价连接至载体蛋白中糖基化位点中的Asn残基。

[0252] 在另一方面,本文提供了组合物,该组合物包含:与铜绿假单胞菌去毒外毒素A(EPA-4)载体蛋白共价连接的大肠杆菌O1A抗原多糖的生物缀合物,其中该大肠杆菌O1A抗原多糖包含式(O1A)的结构;

[0253] 与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌O2抗原多糖的生物缀合物,其中该大肠杆菌O2抗原多糖包含式(O2)的结构;

[0254] 与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌葡糖基化O4抗原多糖的生物缀合物,其中该大肠杆菌葡糖基化O4抗原多糖包含式(O4-Glc+)的结构;

[0255] 与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌O6A抗原多糖的生物缀合物,其中该大肠杆菌O6A抗原多糖包含式(O6A)的结构;

[0256] 与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌O15抗原多糖的生物缀合物,其中该大肠杆

菌O15抗原多糖包含式(O15)的结构;

[0257] 与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌O16抗原多糖的生物缀合物,其中该大肠杆菌O16抗原多糖包含式(O16)的结构;

[0258] 与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌O18A抗原多糖的生物缀合物,其中该大肠杆菌O18A抗原多糖包含式(O18A)的结构;

[0259] 与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌O25B抗原多糖的生物缀合物,其中该大肠杆菌O25B抗原多糖包含式(O25B)的结构;以及

[0260] 与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌O75抗原多糖的生物缀合物,其中该大肠杆菌O75抗原多糖包含式(O75)的结构;

[0261] 其中该EPA-4包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,

[0262] 其中式(O1A)、(O2)、(O4-Glc+)、(O6A)、(O15)、(O16)、(O18A)、(O25B)和(O75)的各结构如表1所示,其中每个n独立地为1至100的整数,优选3至50,例如5至40,更优选5至30,例如7至25,例如10至20,并且

[0263] 其中O75抗原多糖与O6A抗原多糖的比率为约1.2:1至约8:1,优选约1.5:1至约4:1,更优选约2:1。

[0264] 在某些实施例中,组合物进一步包含1至15种额外的大肠杆菌抗原多糖,每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白。

[0265] 在某些实施例中,组合物包含与载体蛋白共价连接的大肠杆菌葡糖基化O4抗原多糖的生物缀合物,其中大肠杆菌葡糖基化O4抗原多糖包含表1所示的式(O4-Glc+)的结构,其中n为3至50的整数,例如5至40,优选5至30,例如7至25,例如10至20,其中与载体蛋白共价连接的大肠杆菌葡糖基化O4抗原多糖的生物缀合物已在大肠杆菌细胞中产生,该大肠杆菌细胞包含:

[0266] (i)大肠杆菌O4抗原多糖的rfb基因簇的核苷酸序列;

[0267] (ii)编码与SEQ ID NO:4具有至少80%、优选至少90%、优选至少95%序列同一性的葡糖基转移酶的核苷酸序列,其中葡糖基转移酶能够修饰大肠杆菌O4抗原多糖以产生大肠杆菌葡糖基化O4抗原多糖;

[0268] (iii)编码分别与SEQ ID NO:7和8具有至少80%、优选至少90%、优选至少95%序列同一性的转位酶和糖基转移酶的核苷酸序列,其中转位酶能够转位细菌萜醇连接的葡萄糖,并且糖基转移酶能够葡糖基化细菌萜醇;

[0269] (iv)编码载体蛋白的核苷酸序列;以及

[0270] (v)编码能够将大肠杆菌葡糖基化O4抗原多糖与载体蛋白共价连接的寡糖基转移酶的核苷酸序列,优选地其中寡糖基转移酶是来自空肠弯曲杆菌的PglB。

[0271] 在某些实施例中,本文所述的组合物另外包含防腐剂,如汞衍生物硫柳汞。在一个特定实施例中,本文所述的药物组合物包含0.001%至0.01%硫柳汞。在其他实施例中,本文所述的药物组合物不包含防腐剂。

[0272] 在某些实施例中,本文所述的组合物(例如,免疫原性组合物)包含佐剂,或与佐剂组合施用。用于与本文所述的组合物组合施用的佐剂可以在施用所述组合物之前(例如,在72小时、48小时、24小时、12小时、6小时、2小时、1小时、10分钟内)、同时、或之后(例如,在72小时、48小时、24小时、12小时、6小时、2小时、1小时、10分钟内)施用。在一些实施例中,术语

“佐剂”是指当与本文所述的组合物结合或作为其一部分施用时,增大、增强和/或促进对生物缀合物的免疫应答,但是当该佐剂化合物单独施用时并不产生对生物缀合物的免疫应答的化合物。在一些实施例中,佐剂产生对生物缀合物肽的免疫应答并且不产生过敏或其他不良反应。佐剂可以通过几种机制增强免疫应答,这些机制包括例如淋巴细胞募集、B和/或T细胞的刺激、以及巨噬细胞的刺激。在某些优选的实施例中,除生物缀合物以外,本文所述的组合物不包含佐剂,和/或除生物缀合物以外,本文所述的组合物不与佐剂组合施用(如果生物缀合物将包含一些固有佐剂特性,则这些将被忽略,并且在这些实施例中,将不添加外来佐剂)。

[0273] 合适的佐剂的实例包括但不限于铝盐(明矾)(如氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝和氧化铝,包括包含明矾的纳米颗粒或纳米明矾(nanoalum)配制品)、磷酸钙、单磷酰脂质A(MPL)或3-脱-O-酰化单磷酰脂质A(3D-MPL)(参见例如,GB 2220211、EP 0971739、EP 1194166、US 6491919)、AS01、AS02、AS03和AS04(全部来自葛兰素史克公司(GlaxoSmithKline);对于AS04,参见例如EP 1126876、US 7357936;对于AS02,参见例如EP 0671948、EP 0761231、US 5750110)、MF59(诺华公司(Novartis))、咪唑并吡啶化合物(参见WO 2007/109812)、咪唑并喹喔啉化合物(参见WO 2007/109813)、δ-菊粉、STING活化合成环状二核苷酸(例如US20150056224)、卵磷脂与卡波姆均聚物的组合(例如US 6676958)、以及皂苷(如QuilA和QS21(参见例如,Zhu D和W Tuo,2016,Nat Prod Chem Res[天然产物化学研究]3:e113)、Matrix M、Iscoms、Iscomatrix等,任选地与QS7组合(参见Kensil等人,于Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach[疫苗设计:亚基和佐剂方法](Powell和Newman编辑,Plenum Press[普莱纽姆出版社],纽约州,1995);美国专利号5,057,540))。在一些实施例中,佐剂是弗氏佐剂(完全或不完全)。其他佐剂是水包油型乳液(如角鲨烯或花生油),任选地组合免疫刺激剂,如单磷酰脂质A(参见Stoute等人,N.Engl.J.Med.[新英格兰医学杂志]336,86-91(1997))。另一种佐剂是CpG。佐剂的其他实例是含有免疫刺激剂如MPL和QS21的脂质体,如在AS01E和AS01B中(例如,US2011/0206758)。佐剂的其他实例是咪唑并喹啉(如咪喹莫特和R848)。参见例如,Reed G等人,2013,Nature Med[自然医学],19:1597-1608。在某些实施例中,佐剂含有toll样受体4(TLR4)激动剂。TLR4激动剂是本领域中熟知的,参见例如Ireton GC和SG Reed,2013,Expert Rev Vaccines[疫苗专家评论]12:793-807。在某些实施例中,佐剂包含TLR4激动剂,该TLR4激动剂包含脂质A或其类似物或衍生物,如MPL、3D-MPL、RC529(例如EP1385541)、PET-脂质A、GLA(吡喃糖基脂质佐剂,一种合成的二糖糖脂;例如US20100310602、US8722064)、SLA(例如,Carter D等人,2016,Clin Transl Immunology[临床与转化免疫学]5:e108(doi:10.1038/cti.2016.63),其描述了用于优化人疫苗的TLR4配体的结构-功能方法)、PHAD(磷酸化的六酰基二糖)、3D-PHAD(其结构与GLA的结构相同)、3D-(6-酰基)-PHAD(3D(6A)-PHAD)(PHAD、3D-PHAD和3D(6A)PHAD是合成的脂质A变体,参见例如avantilipids.com/divisions/adjuvants,其还提供了这些分子的结构)、E6020(CAS编号287180-63-6)、ONO4007、OM-174等。

[0274] 在某些实施例中,本文所述的组合物不包含佐剂,或不与佐剂组合施用。

[0275] 在某些实施例中,将本文所述的组合物配制为适合施用于受试者的计划途径。例如,本文所述的组合物可以配制成适合于皮下、胃肠外、口服、皮内、经皮、结肠直肠、腹膜内和直肠施用。在一个特定实施例中,药物组合物可以被配制用于静脉内、口服、腹膜内、鼻

内、气管内、皮下、肌内、局部、皮内、经皮或肺部施用。在某些实施例中,通过肌内注射来施用本文所述的组合物。

[0276] 在某些实施例中,本文所述的组合物额外包含一种或多种缓冲液,例如Tris缓冲盐水、磷酸盐缓冲液或蔗糖磷酸盐谷氨酸盐缓冲液。

[0277] 在某些实施例中,本文所述的组合物额外包含一种或多种盐,例如Tris-盐酸盐、氯化钠、氯化钙、氯化钾、磷酸钠、谷氨酸一钠或铝盐(例如,氢氧化铝、磷酸铝、明矾(硫酸铝钾)或此类铝盐的混合物)。

[0278] 本文所述的组合物可以与用于施用的说明书一起包括在容器、包装、或分配器中。

[0279] 可以在使用前储存本文所述的组合物,例如,组合物可以冷冻储存(例如,在约-20℃或在约-70℃);储存在冷藏条件下(例如,在约4℃);或存储在室温下。

[0280] 在一方面,本发明还提供了制备根据本发明的组合物的方法,这些方法包括提供每种所需的O抗原缀合物(例如,通过获得或制造这些,例如以原料药的形式),并将它们以所希望的比率和/量混合以获得本发明的组合物(例如,多价大肠杆菌、特别是ExPEC疫苗组合物,有时也称为药物产品)。

[0281] 诱导免疫学应答的方法

[0282] 本文提供的生物缀合物和组合物可用于在受试者中诱导针对大肠杆菌O抗原的抗体,或为受试者接种针对大肠杆菌的疫苗。本文所述的在受试者中诱导免疫应答的方法导致受试者接种疫苗以抵抗ExPEC菌株(其O抗原存在于一种或多种组合物中)的感染。当使用O抗原亚型时,本发明的方法还可以诱导对具有相似抗原性的另一种O抗原亚型的免疫应答。实例是血清亚型之间的交叉反应性,例如,用O25B抗原进行免疫诱导了识别O25B和O25A血清型的O-LPS的抗体,并且用葡糖基化O4进行免疫诱导了识别葡糖基化O4和非葡糖基化O4血清型的O-LPS的抗体,在其他实例中,也可以对具有不同O抗原但在抗原结构上仍具有某些相似性的其他血清型进行交叉免疫(例如,某些血清在血清分型研究中出现交叉反应)。

[0283] 在一些实施例中,受试者是人。在一些实施例中,受试者是患有ExPEC感染或侵袭性ExPEC疾病或有患其风险的人。

[0284] 在一些实施例中,侵袭性ExPEC疾病包括脓毒症。在一些实施例中,侵袭性ExPEC疾病包括菌血症。在一些实施例中,侵袭性ExPEC疾病包括以下一种或多种:尿路感染、手术部位感染、腹部或盆腔感染、肺炎、骨髓炎、蜂窝组织炎、脓毒症、菌血症、伤口感染、肾盂肾炎、脑膜炎、腹膜炎、胆管炎、软组织感染、脓性肌炎、脓毒性关节炎、眼内炎、化脓性甲状腺炎、鼻窦炎、心内膜炎和前列腺炎。

[0285] 在某些实施例中,在施用本文所述的组合物后在受试者中诱导的免疫应答限制了受试者中侵袭性ExPEC疾病的严重性或预防了该疾病。在一个实施例中,受试者在施用时患有大肠杆菌(例如,ExPEC)感染。在一个优选的实施例中,受试者在施用时不患有大肠杆菌(例如,ExPEC)感染。

[0286] 在某些实施例中,在施用本文所述的组合物后在受试者中诱导的免疫应答优选地在至少30%、更优选至少40%、如至少50%的施用该组合物的受试者中有效预防或减轻由ExPEC感染引起的症状。ExPEC感染的症状可以根据感染的性质而变化,并且可以包括但不限于:排尿困难、尿频或尿急增加、脓尿、血尿、背痛、骨盆痛、排尿时疼痛、发烧、寒战、和/或

恶心(例如,在患有由ExPEC引起的尿路感染的受试者中);高烧、头痛、落枕、恶心、呕吐、癫痫发作、嗜睡、和/或光敏感(例如,在患有由ExPEC引起的脑膜炎的受试者中);发烧、心率加快、呼吸频率加快、尿排出量减少、血小板计数减少、腹痛、呼吸困难、和/或心脏功能异常(例如,在患有由ExPEC引起的脓毒症的受试者中)。

[0287] 在某些实施例中,在施用本文所述的组合物后在受试者中诱导的免疫应答可有效降低患有ExPEC感染的受试者住院的可能性。在一些实施例中,在施用本文所述的组合物后在受试者中诱导的免疫应答可有效降低患有ExPEC感染的受试者住院的持续时间。

[0288] 在某些实施例中,用本发明的组合物进行疫苗接种是为了预防侵袭性ExPEC疾病(IED),例如尿脓毒症、菌血症、脓毒症等。在某些实施例中,疫苗接种是为了预防或降低尿路感染的发生或严重程度。在某些实施例中,IED可以是医院获得的,例如在经历泌尿生殖和/或腹部手术的患者中。在某些实施例中,IED可以与医疗保健相关,例如在接受针对另一种病症的医疗保健的患者中,例如经由中心管线、导管等,例如在医院、流动手术中心、终末期肾病设施、长期护理设施等。在某些实施例中,IED可以是社区获得的,例如在最近没有暴露于医疗保健风险的患者中。

[0289] 在一些实施例中,在受试者中诱导针对肠外致病性大肠杆菌(ExPEC)的免疫应答的方法包括向受试者施用本文所述的组合物。

[0290] 在一些实施例中,在受试者中诱导针对肠外致病性大肠杆菌(ExPEC)的免疫应答的方法包括向受试者施用第一有效量的大肠杆菌O75抗原多糖和第二有效量的大肠杆菌O6抗原多糖,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,并且其中第一有效量与第二有效量的比率为约1.2:1至约8:1,优选约1.5:1至约4:1,例如约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,更优选约2:1。在一些优选的实施例中,将共价连接至载体蛋白的O75抗原多糖和共价连接至载体蛋白的O6抗原多糖作为一种组合物施用。在一些替代性实施例中,将共价连接至载体蛋白的O75抗原多糖和共价连接至载体蛋白的O6抗原多糖作为单独的组合物的组合施用。

[0291] 在一些实施例中,在受试者中诱导针对肠外致病性大肠杆菌(ExPEC)的免疫应答的方法进一步包括向受试者施用一种或多种、优选全部的大肠杆菌O1、O2、O4、O15、O16、O18、O25抗原多糖,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白。优选地,O1抗原为O1A,O4抗原为葡糖基化O4抗原多糖,O6抗原为O6A,O18抗原为O18A,并且O25抗原为O25B。优选地,O1、O2、O4、O6、O15、O16、O18、O25和O75抗原分别具有如表1所示的式(O1A)、(O2)、(O4-Glc+)、(O6A)、(O15)、(O16)、(O18A)、(O25B)和(O75)的结构,其中每个n独立地为1至100的整数,优选3至50,例如5至40,优选5至30,例如7至25,例如10至20。根据本发明,O75抗原多糖与O6抗原多糖的比率为约1.2:1至约8:1,优选约1.5:1至约4:1,更优选约2:1。在一些实施例中,该方法进一步包括向受试者施用1至15种额外的大肠杆菌抗原多糖,每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白。在某些实施例中,此类额外的大肠杆菌抗原包含O8抗原多糖,其优选地具有如表1所示的式(O8)的结构,其中n为1至100的整数,优选3至50,例如5至40,优选5至30,例如7至25,例如10至20。优选地,共价连接至载体蛋白的每种大肠杆菌抗原多糖是生物缀合物。在一些实施例中,这些生物缀合物作为一种组合物施用。在一些实施例中,这些生物缀合物作为两种或更多种单独的组合物的组合施用。优选限制单独施用的次数,因此优选地使用包含大部分或全部抗原的单一组合物。

[0292] 在一个实施例中是施用用于诱导对大肠杆菌、优选肠外致病性大肠杆菌(ExPEC)的免疫应答的组合物的方法,其中组合物包含与载体蛋白共价连接的大肠杆菌075抗原多糖的生物缀合物,并且其中施用的075抗原多糖的浓度为至少16μg/剂量。

[0293] 在一些实施例中,在受试者中诱导针对肠外致病性大肠杆菌(ExPEC)的免疫应答的方法包括向受试者施用第一有效量的大肠杆菌075抗原多糖和第二有效量的大肠杆菌01抗原多糖,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,并且其中第一有效量与第二有效量的比率在约1.2:1至约8:1之间,优选在约1.5:1至约4:1之间,例如约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,更优选约2:1。在一些优选的实施例中,将共价连接至载体蛋白的075抗原多糖和共价连接至载体蛋白的01抗原多糖作为一种组合物施用。在一些替代性实施例中,将共价连接至载体蛋白的075抗原多糖和共价连接至载体蛋白的01抗原多糖作为组合物的组合施用。在一些实施例中,该方法进一步包括向受试者施用一种或多种、优选全部的大肠杆菌02、04、06、015、016、018、025抗原多糖,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白。优选地,01抗原为01A,04抗原为葡糖基化04抗原多糖,06抗原为06A,018抗原为018A,并且025抗原为025B。优选地,01、02、04、06、015、016、018、025和075抗原分别具有如表1所示的式(01A)、(02)、(04-Glc+)、(06A)、(015)、(016)、(018A)、(025B)和(075)的结构,其中每个n独立地为1至100的整数,优选3至50,例如5至40,优选5至30,例如7至25,例如10至20。根据本发明,075抗原多糖与01抗原多糖的比率为约1.2:1至约8:1,优选约1.5:1至约4:1,更优选约2:1。在一些实施例中,该方法进一步包括向受试者施用1至15种额外的大肠杆菌抗原多糖,每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白。在某些实施例中,此类额外的大肠杆菌抗原包含08抗原多糖,其优选地具有如表1所示的式(08)的结构,其中n为1至100的整数,优选3至50,例如5至40,优选5至30,例如7至25,例如10至20。优选地,共价连接至载体蛋白的每种大肠杆菌抗原多糖是生物缀合物。在一些实施例中,这些生物缀合物作为一种组合物施用。在一些实施例中,这些生物缀合物作为两种或更多种单独的组合物的组合施用。优选限制单独施用的次数,因此优选地使用包含大部分或全部抗原的单一组合物。

[0294] 在一些实施例中,在受试者中诱导针对肠外致病性大肠杆菌(ExPEC)的免疫应答的方法包括向受试者施用第一有效量的大肠杆菌075抗原多糖和第二有效量的大肠杆菌02抗原多糖,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,并且其中第一有效量与第二有效量的比率为约1.2:1至约8:1,优选约1.5:1至约4:1,例如约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,更优选约2:1。在一些优选的实施例中,将共价连接至载体蛋白的075抗原多糖和共价连接至载体蛋白的02抗原多糖作为一种组合物施用。在一些替代性实施例中,将共价连接至载体蛋白的075抗原多糖和共价连接至载体蛋白的02抗原多糖作为组合物的组合施用。在一些实施例中,该方法进一步包括向受试者施用一种或多种、优选全部的大肠杆菌01、04、06、015、016、018、025抗原多糖,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白。优选地,01抗原为01A,04抗原为葡糖基化04抗原多糖,06抗原为06A,018抗原为018A,并且025抗原为025B。优选地,01、02、04、06、015、016、018、025和075抗原分别具有如表1所示的式(01A)、(02)、(04-Glc+)、(06A)、(015)、(016)、(018A)、(025B)和(075)的结构,其中每个n独立地为1至100的整数,优选3至50,例如5至40,优选5至30,例如7至25,例如10至20。根据本发明,075抗原多糖与02抗原多糖的比率为约1.2:1至约

8:1,优选约1.5:1至约4:1,更优选约2:1。在一些实施例中,该方法进一步包括向受试者施用1至15种额外的大肠杆菌抗原多糖,每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白。优选地,共价连接至载体蛋白的每种大肠杆菌抗原多糖是生物缀合物。在一些实施例中,这些生物缀合物作为一种组合物施用。在一些实施例中,这些生物缀合物作为两种或更多种单独的组合物的组合施用。优选限制单独施用的次数,因此优选地使用包含大部分或全部抗原的单一组合物。

[0295] 在一些实施例中,在受试者中诱导针对肠外致病性大肠杆菌(ExPEC)的免疫应答的方法包括向受试者施用第一有效量的大肠杆菌075抗原多糖和第二有效量的大肠杆菌025抗原多糖,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,并且其中第一有效量与第二有效量的比率为约1:4和约1:0.5,优选约1:2和1:1,更优选约1:1,例如约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或1:0.5。在一些优选的实施例中,将共价连接至载体蛋白的075抗原多糖和共价连接至载体蛋白的025抗原多糖作为一种组合物施用。在一些替代性实施例中,将共价连接至载体蛋白的075抗原多糖和共价连接至载体蛋白的025抗原多糖作为组合物的组合施用。在一些实施例中,该方法进一步包括向受试者施用一种或多种、优选全部的大肠杆菌01、02、04、06、015、016、018抗原多糖,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白。优选地,01抗原为01A,04抗原为葡糖基化04抗原多糖,06抗原为06A,018抗原为018A,并且025抗原为025B。优选地,01、02、04、06、015、016、018、025和075抗原分别具有如表1所示的式(01A)、(02)、(04-Glc+)、(06A)、(015)、(016)、(018A)、(025B)和(075)的结构,其中每个n独立地为1至100的整数,优选3至50,例如5至40,优选5至30,例如7至25,例如10至20。根据本发明,075抗原多糖与025抗原多糖的比率为约1:4至约1:0.5,优选在约1:2至1:1之间,更优选约1:1。在一些实施例中,该方法进一步包括向受试者施用1至15种额外的大肠杆菌抗原多糖,每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白。在某些实施例中,此类额外的大肠杆菌抗原包含08抗原多糖,其优选地具有如表1所示的式(08)的结构,其中n为1至100的整数,优选3至50,例如5至40,优选5至30,例如7至25,例如10至20。优选地,共价连接至载体蛋白的每种大肠杆菌抗原多糖是生物缀合物。在一些实施例中,这些生物缀合物作为一种组合物施用。在一些实施例中,这些生物缀合物作为两种或更多种单独的组合物的组合施用。优选限制单独施用的次数,因此优选地使用包含大部分或全部抗原的单一组合物。

[0296] 在某些实施例中,可以将本文所述的组合物、组合和生物缀合物施用于受试者以诱导免疫应答,该免疫应答包括产生抗体,优选具有调理吞噬活性的抗体。可以使用本领域技术人员已知的技术(例如,免疫亲和色谱、离心、沉淀等)来分离此类抗体。

[0297] 可以使用本领域技术人员已知的或本文所述的任何方法来评估本文所述的生物缀合物和组合物在受试者中产生免疫应答的能力。在一些实施例中,生物缀合物在受试者中产生免疫应答的能力可以通过用本文所述的生物缀合物免疫受试者(例如,小鼠、大鼠、兔或猴)或受试者组并且用对照(例如,PBS)免疫另外的受试者(例如,小鼠、大鼠、兔或猴)或受试者组来评估。随后可以用ExPEC激发受试者或受试者组,并且可以确定ExPEC在受试者或受试者组中引起疾病(例如,UTI、菌血症或其他疾病)的能力。本领域技术人员将认识到,如果用对照免疫的受试者或受试者组在用ExPEC激发后患有疾病,但用本文所述的一种或多种生物缀合物或其组合物免疫的受试者或受试者组较少患病或不患病,则该生物缀合

物能够在受试者中产生免疫应答。本文所述的一种或多种生物缀合物或其组合物诱导与来自ExPEC的O抗原发生交叉反应的抗血清的能力可以通过例如免疫测定法(如ELISA)(参见例如,Van den Dobbelsteen等人,2016,Vaccine[疫苗]34:4152-4160)或基于ECL的免疫测定法来测试。

[0298] 例如,本文所述的生物缀合物在受试者中产生免疫应答的能力可以使用血清杀菌测定(SBA)或调理吞噬杀伤测定(OPK测定,或OPKA)来评估,其代表已建立和接受的方法,已用于获得基于糖缀合物的疫苗的批准。这样的测定是本领域熟知的,并且,简言之,其包括通过向受试者(例如,小鼠、大鼠、兔或猴)施用引发抗体的化合物来生成并分离针对目的靶标(例如,O抗原多糖,例如,大肠杆菌O75抗原多糖)的抗体的步骤。随后,抗体的杀细菌能力可以通过以下方式来评估:例如,在抗体和补体以及-取决于测定-嗜中性粒细胞存在下培养所讨论的细菌(例如,具有相关血清型的大肠杆菌),以及测定抗体介导杀伤和/或中和细菌的能力,例如使用标准微生物学方法。对于大肠杆菌生物缀合物疫苗的OPK测定的实例,参见例如,Abbanat等人,2017,Clin.Vaccine Immunol.[临床免疫学与疫苗免疫学]24:e00123-17。OPK测定能以单重或多重形式进行,其中多重形式(例如,同时测试多种血清型)典型地是优选的。多重OPK测定有时在本文中被称为“MOPA”。

[0299] 在特定的实施例中,其中本发明提供的组合物包含大肠杆菌O75抗原多糖的生物缀合物和至少大肠杆菌O6A抗原多糖的生物缀合物,大肠杆菌O75抗原多糖的有效量比组合物中存在的任何其他生物缀合物的浓度高约1.2至8倍,例如高约2至4倍,如高1.5、2、3、4、5、6、7或8倍。在此类实施例中,大肠杆菌O75抗原多糖的有效量为例如每次施用约5至18μg,如每次施用5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18μg。优选地,每次施用约8-16μg的O75抗原多糖。

[0300] 在某些实施例中,向受试者施用本文所述的组合物与一种或多种其他疗法(例如,抗细菌疗法或免疫调节疗法)的组合。一种或多种其他疗法可以有益于治疗或预防ExPEC感染,或者可以改善与ExPEC感染相关的症状或病症。在一些实施例中,一种或多种其他疗法是止痛药或退烧药物。在某些实施例中,相隔少于5分钟至相隔少于1周施用这些疗法。本领域技术人员已知的任何抗细菌剂(例如,抗生素)可以与本文所述的组合物组合使用。

[0301] 在某些实施例中,向受试者施用根据本发明的生物缀合物或组合物一次。在某些实施例中,向受试者不止一次施用根据本发明的生物缀合物或组合物,例如,以初免-加强方案。在某些实施例中,两次施用之间的时间为至少两周、至少一个月、至少两个月、至少三个月、至少六个月、至少一年、至少两年、至少五年、至少十年或至少十五年。在人类中,典型地可以通过单次施用根据本发明的生物缀合物或组合物来产生期望的免疫应答。在某些实施例中,例如十年后提供重复施用。

[0302] 本文提供的组合物可用于在受试者中诱导针对大肠杆菌O抗原的抗体,并为受试者接种针对大肠杆菌、特别是肠外致病性大肠杆菌(ExPEC)的疫苗。如本文所用,“受试者”意指将向其施用或已经施用本文提供的生物缀合物或组合物的任何动物,优选哺乳动物。如本文所用的术语“哺乳动物”涵盖任何哺乳动物。哺乳动物的实例包括但不限于牛、马、绵羊、猪、猫、狗、小鼠、大鼠、兔、豚鼠、非人灵长类动物(NHP)(如猴或猿)、人类等。在某些实施例中,受试者是人。人类受试者可以处于任一年龄。在某些实施例中,受试者是约两个月至约18岁的人,例如1岁至18岁。在某些实施例中,受试者是至少18岁的人。在某些实施例中,

受试者是15至50岁的人,例如18至45岁,例如20至40岁。在某些实施例中,受试者是男人。在某些实施例中,受试者是女人。在某些实施例中,受试者是免疫受损的。在某些实施例中,受试者是至少50岁、至少55岁、至少60岁、至少65岁的人。在某些实施例中,受试者是不超过100岁、不超过95岁、不超过90岁、不超过85岁、不超过80岁或不超过75岁的人。在某些实施例中,受试者是至少60岁且不超过85岁的人。在某些实施例中,受试者是健康状况稳定的人。在某些实施例中,受试者是健康状况稳定的至少60岁且不超过85岁的成年人。在某些实施例中,受试者是具有尿路感染(UTI,即尿道、膀胱、输尿管和/或肾脏中的细菌感染;在一些实施例中,这包括肾盂肾炎)病史的人,即在他或她的一生中有过至少一次UTI发作。在某些实施例中,受试者是在过去二十、十五、十二、十、九、八、七、六、五、四、三、二或一年中具有UTI病史的人。在某些实施例中,受试者是在过去两年内有UTI病史的人。在某些实施例中,受试者是具有复发性UTI病史的人类受试者,即在六个月内有过至少两次UTI或在一年内有过至少三次UTI。在某些实施例中,受试者是在过去两年内具有复发性UTI病史的人类受试者。在某些实施例中,受试者是健康状况稳定的60岁或以上的人。在某些实施例中,受试者是在过去两年内有UTI病史的60岁或以上的人。在某些实施例中,受试者是在过去两年内有UTI病史的至少60岁且小于75岁的人。在某些实施例中,受试者是在过去两年内有UTI病史的75岁或以上的人类受试者。在某些实施例中,受试者是安排进行选择性泌尿生殖器手术和/或腹部手术(例如,经直肠超声引导的前列腺穿刺活检(TRUS-PNB))的患者。在某些实施例中,受试者是具有前列腺炎(包括但不限于急性细菌性前列腺炎(ABP),即前列腺的细菌感染)病史的人,即在他的一生中(例如在最近的十、九、八、七、六、五、四、三、二或一年中)有过至少一次前列腺炎发作。

[0303] 在优选的实施例中,由组合物诱导的免疫应答或根据本发明的诱导免疫应答的方法包括具有调理吞噬活性的抗体。已经表明包含与载体蛋白共价连接的大肠杆菌O抗原多糖的组合物(即,大肠杆菌O抗原的糖缀合物)可以在人类中诱导这种类型的功能性抗体,并且已经表明此类抗体介导体内细菌杀伤,并且经由这种机制可以防止大肠杆菌感染。

[0304] 在另一方面,本文提供了在受试者中诱导针对大肠杆菌、优选肠外致病性大肠杆菌(ExPEC)的免疫应答的方法,该方法包括向该受试者施用如本文所述的组合物。

[0305] 在另一方面,本文提供了为受试者接种针对大肠杆菌、优选肠外致病性大肠杆菌(ExPEC)的疫苗的方法,该方法包括向该受试者施用如本文所述的组合物。在某些方面,本文提供了如本文所述的组合物,其用于诱导针对大肠杆菌、优选ExPEC的抗体。在某些方面,本文提供了如本文所述的组合物,其用于接种针对大肠杆菌、优选ExPEC的疫苗。在某些方面,本文提供了如本文所述的组合物用于制造用于在受试者中诱导针对大肠杆菌、优选ExPEC的抗体的药物的用途。在某些方面,本文提供了如本文所述的组合物用于制造用于为受试者接种针对大肠杆菌、优选ExPEC的疫苗的药物的用途。

[0306] 在某些方面,本文提供了如本文所述的组合物,其用于在受试者中在诱导针对大肠杆菌、优选肠外致病性大肠杆菌(ExPEC)的免疫应答的方法中使用。在某些方面,本文提供了如本文所述的组合物在制造用于在受试者中诱导针对大肠杆菌、优选肠外致病性大肠杆菌(ExPEC)的免疫应答的药物中的用途。

[0307] 在另一方面,本文提供了在受试者中诱导针对大肠杆菌、优选肠外致病性大肠杆菌(ExPEC)的免疫应答的方法,该方法包括向该受试者施用第一有效量的大肠杆菌O75抗原

多糖和第二有效量的大肠杆菌06抗原多糖,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,并且其中第一有效量与第二有效量的比率为约1.2:1至约8:1,优选约1.5:1至约4:1,更优选约2:1。

[0308] 在某些实施例中,免疫应答限制了受试者中侵袭性ExPEC疾病的严重性或预防了该疾病。

[0309] 在某些实施例中,侵袭性ExPEC疾病包括脓毒症和/或菌血症。

[0310] 在某些实施例中,该方法进一步包括向受试者施用一种或多种、优选全部的大肠杆菌01、02、04、015、016、018、025抗原多糖,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,

[0311] 优选地,01抗原为01A,04为葡糖基化的,06抗原为06A,018抗原为018A,并且025抗原为025B,

[0312] 更优选地,其中01A、02、葡糖基化04、06A、015、016、018A、025B和075抗原多糖各自分别包含如表1所示的式(01A)、(02)、(04-Glc+)、(06A)、(015)、(016)、(018A)、(025B)和(075)的结构,其中每个n独立地为1至100的整数,优选3至50,例如5至40,优选5至30,例如7至25,例如10至20,

[0313] 并且其中075抗原多糖与06抗原多糖的比率为约1.2:1至约8:1,优选约1.5:1至约4:1,更优选约2:1。

[0314] 在某些实施例中,该方法进一步包括向受试者施用1至15种额外的大肠杆菌抗原多糖,每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白。

[0315] 在一个特定实施例中,每种载体蛋白包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0316] 在某些实施例中,受试者是患有大肠杆菌(优选ExPEC)感染、优选侵袭性ExPEC疾病或有患其风险的人。

[0317] 在某些实施例中,针对每次施用,施用约8-16μg、优选约16μg的075抗原多糖。

[0318] 在某些实施例中,施用的大肠杆菌抗原多糖01:02:04:06:015:016:018:025:075的权重比为1:1:1:1:1:1:1:2:2。

[0319] 在某些实施例中,葡糖基化04是与载体蛋白共价连接的大肠杆菌葡糖基化04抗原多糖的生物缀合物,其中大肠杆菌葡糖基化04抗原多糖包含表1所示的式(04-Glc+)的结构,其中n为3至50的整数,例如5至40,优选5至30,例如7至25,例如10至20,

[0320] 其中与载体蛋白共价连接的大肠杆菌葡糖基化04抗原多糖的生物缀合物已在大肠杆菌细胞中产生,该大肠杆菌细胞包含:

[0321] (i)大肠杆菌04抗原多糖的rfb基因簇的核苷酸序列;

[0322] (ii)编码与SEQ ID NO:4具有至少80%、优选至少90%、优选至少95%序列同一性的葡糖基转移酶的核苷酸序列,其中葡糖基转移酶能够修饰大肠杆菌04抗原多糖以产生大肠杆菌葡糖基化04抗原多糖;

[0323] (iii)编码分别与SEQ ID NO:7和8具有至少80%、优选至少90%、优选至少95%序列同一性的转位酶和糖基转移酶的核苷酸序列,其中转位酶能够转位细菌萜醇连接的葡萄糖,并且糖基转移酶能够葡糖基化细菌萜醇;

[0324] (iv)编码载体蛋白的核苷酸序列;以及

[0325] (v)编码能够将大肠杆菌葡糖基化04抗原多糖与载体蛋白共价连接的寡糖基转移

酶的核苷酸序列,优选地其中寡糖基转移酶是来自空肠弯曲杆菌的PglB。

[0326] 在一方面,本发明还提供了组合物,该组合物包含大肠杆菌01、02、04、06、015、016、018、025和075抗原多糖(分别具有如上针对每种抗原所指示的结构),其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,并且该组合物不包含共价连接至载体蛋白的其他大肠杆菌O抗原多糖(即,9价组合物)。在该方面的某些实施例中,载体蛋白是EPA。在该方面的其他实施例中,载体蛋白是CRM_{197}。在该方面的某些实施例中,共价键联是化学缀合的结果。在其他实施例中,共价键联是生物缀合的结果。在该方面的某些实施例中,载体蛋白是CRM_{197}并且共价键联是化学缀合的结果。在该方面的其他实施例中,载体蛋白是EPA并且共价键联是生物缀合的结果。在该方面的优选实施例中,与01、02或06抗原多糖相比,优选地与01、02和06抗原多糖中的每一种相比,组合物包含增加量的大肠杆菌075抗原多糖,优选地增加约1.5-4倍,优选增加约两倍的量。

[0327] 实施例

[0328] 实施例1是一种组合物,该组合物包含大肠杆菌075抗原多糖以及至少一种选自由01、02、04、06、015、016和018组成的组的额外大肠杆菌O抗原多糖,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,并且其中075抗原多糖与额外的O抗原多糖的浓度比为约1.2:1至约8:1,优选约1.5:1至约4:1,优选约1.5:1至约2.5:1,更优选约2:1。

[0329] 实施例1a是如实施例1所述的组合物,其中该至少一种额外的O抗原多糖是01,优选01A。

[0330] 实施例1a1是如实施例1a所述的组合物,其中075抗原多糖与01抗原多糖的浓度比为2:1。

[0331] 实施例1b是如实施例1所述的组合物,其中该至少一种额外的O抗原多糖是02。

[0332] 实施例1b1是如实施例1b所述的组合物,其中075抗原多糖与01抗原多糖的浓度比为2:1。

[0333] 实施例1c是如实施例1所述的组合物,其中该至少一种额外的O抗原多糖是04,优选葡糖基化04。

[0334] 实施例1c1是如实施例1c所述的组合物,其中075抗原多糖与04抗原多糖的浓度比为2:1。

[0335] 实施例1d是如实施例1所述的组合物,其中该至少一种额外的O抗原多糖是06,优选06A。

[0336] 实施例1d1是如实施例1d所述的组合物,其中075抗原多糖与06抗原多糖的浓度比为2:1。

[0337] 实施例1e是如实施例1所述的组合物,其中该至少一种额外的O抗原多糖是015。

[0338] 实施例1e1是如实施例1e所述的组合物,其中075抗原多糖与015抗原多糖的浓度比为2:1。

[0339] 实施例1f是如实施例1所述的组合物,其中该至少一种额外的O抗原多糖是016。

[0340] 实施例1f1是如实施例1f所述的组合物,其中075抗原多糖与016抗原多糖的浓度比为2:1。

[0341] 实施例1g是如实施例1所述的组合物,其中该至少一种额外的O抗原多糖是018,优选018A。

[0342] 实施例1g1是如实施例1g所述的组合物,其中075抗原多糖与018抗原多糖的浓度比为2:1。

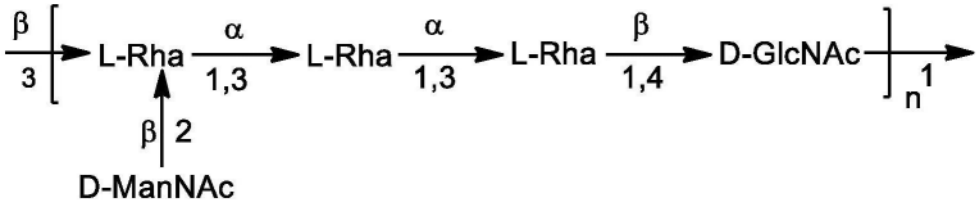
[0343] 实施例1h是如实施例1所述的组合物,该组合物进一步包含独立地共价连接至载体蛋白的025抗原多糖,优选该025抗原为025B。

[0344] 实施例1h1是如实施例1h所述的组合物,其中075抗原多糖与025抗原多糖的浓度比为1:1。

[0345] 实施例2是如实施例1所述的组合物,其中该组合物包含大肠杆菌075抗原多糖以及两种或更多种、优选全部的大肠杆菌01、02、04、06、015、016、018、025抗原多糖,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,优选01抗原为01A,04为葡糖基化的,06抗原为06A,018抗原为018A,并且025抗原为025B。

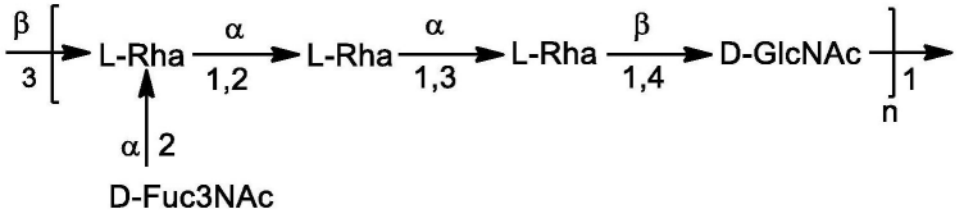
[0346] 实施例3是如实施例2所述的组合物,其中

[0347] (i)该大肠杆菌01抗原多糖包含式(01A)的结构:

[0348] 

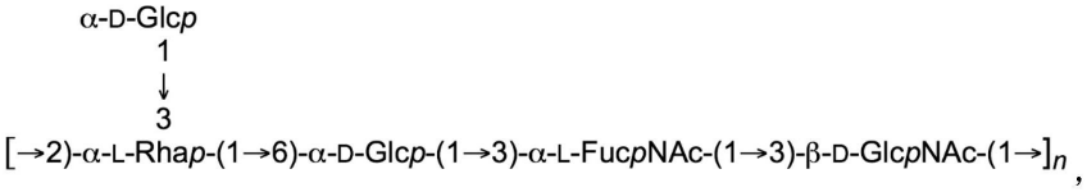
,

[0349] (ii)该大肠杆菌02抗原多糖包含式(02)的结构:

[0350] 

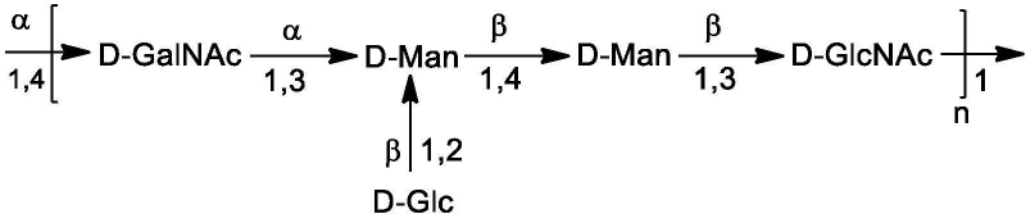
,

[0351] (iii)该大肠杆菌04抗原多糖包含式(04-Glc+)的结构:

[0352] 

,

[0353] (iv)该大肠杆菌06抗原多糖包含式(06A)的结构:

[0354] 

,

[0355] (v)该大肠杆菌015抗原多糖包含式(015)的结构:

[0356] [→2)-β-D-Galp-(1→3)-α-L-FucpNAc-(1→3)-β-D-GlcpNAc-(1→]n,

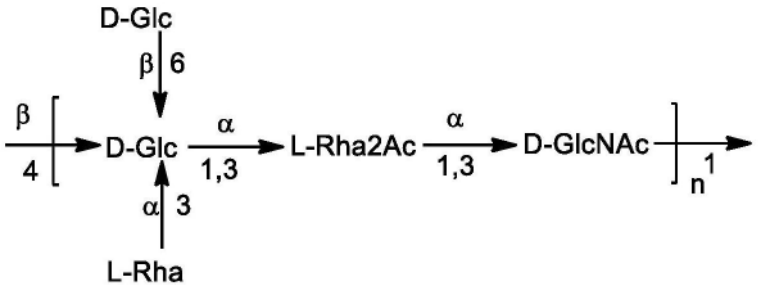
[0357] (vi)该大肠杆菌016抗原多糖包含式(016)的结构:

[0358] [→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
,

[0359] (vii)该大肠杆菌O18抗原多糖包含式(O18A)的结构：

[0360] [→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
,

[0361] (viii)该大肠杆菌O25抗原多糖包含式(O25B)的结构：

[0362] 

并且
,

[0363] (ix)该大肠杆菌O75抗原多糖包含式(O75)的结构：

[0364] 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→]$_n$,

[0365] 其中每个n独立地为1至100的整数，优选3至50，例如5至40，优选5至30，例如7至25，例如10至20。

[0366] 实施例4是如实施例2或3所述的组合物，其中这些大肠杆菌抗原多糖O1:O2:O4:O6:O15:O16:O18:O25:O75的权重比为1:1:1:1:1:1:1:2:2。

[0367] 实施例5是如实施例1-4中任一项所述的组合物，其中该O75抗原多糖的浓度为约8至约50μg/mL，优选12至40μg/mL，例如16-32μg/mL，优选约26-38μg/mL，优选约32μg/mL。

[0368] 实施例6是如实施例1-5中任一项所述的组合物，该组合物进一步包含至少另一种共价连接至载体蛋白的额外大肠杆菌抗原多糖。

[0369] 实施例7是如实施例6所述的组合物，其中该另一种额外的大肠杆菌抗原多糖包含具有式(O8)的O8抗原多糖：

[0370] α-D-Manp3Me-(1→[3)-β-D-Manp-(1→2)-α-D-Manp-(1→2)-α-D-Manp-(1→]n，

[0371] 其中n为1至100的整数，优选3至50，例如5至40，优选5至30，例如7至25，例如10至20。

[0372] 实施例8是如实施例1-7中任一项所述的组合物，其中每种载体蛋白独立地选自由以下组成的组：铜绿假单胞菌去毒外毒素A(EPA)、大肠杆菌鞭毛蛋白(FliC)、CRM_{197}、麦芽糖结合蛋白(MBP)、白喉类毒素、破伤风类毒素、金黄色葡萄球菌的去毒溶血素A、凝集因子A、

凝集因子B、大肠杆菌不耐热肠毒素、大肠杆菌不耐热肠毒素的去毒变体、霍乱毒素B亚基(CTB)、霍乱毒素、霍乱毒素的去毒变体、大肠杆菌Sat蛋白、大肠杆菌Sat蛋白的载客结构域、肺炎链球菌溶血素、钥孔戚血蓝蛋白(KLH)、铜绿假单胞菌PcrV、脑膜炎奈瑟菌的外膜蛋白(OMPC)、以及来自不可分型流感嗜血杆菌的蛋白D。

[0373] 实施例9是如实施例8所述的组合物,其中该载体蛋白是铜绿假单胞菌去毒外毒素A(EPA)或CRM_{197}。

[0374] 实施例10是如实施例1-9中任一项所述的组合物,其中该载体蛋白包含1至20个,如1至10个或2至4个具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的糖基化共有序列,如具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的共有序列,最优选地,该载体蛋白包含四个糖基化共有序列。

[0375] 实施例11是如实施例1-10中任一项所述的组合物,其中每种载体蛋白是包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的EPA。

[0376] 实施例12是如实施例1-11中任一项所述的组合物,其中这些大肠杆菌抗原多糖通过生物缀合或化学缀合,例如还原胺化化学法(RAC)、单端缀合或与(2-((2-氧代乙基)硫代)乙基)氨基甲酸酯(eTEC)间隔子缀合而共价连接至载体蛋白。

[0377] 实施例13是如实施例12所述的组合物,其中这些大肠杆菌抗原多糖通过生物缀合共价连接至载体蛋白,优选该多糖共价连接至载体蛋白中糖基化位点中的Asn残基。

[0378] 实施例14是一种组合物,该组合物包含:

[0379] (i)与铜绿假单胞菌去毒外毒素A(EPA-4)载体蛋白共价连接的大肠杆菌O1A抗原多糖的生物缀合物,其中该大肠杆菌O1A抗原多糖包含式(O1A)的结构;

[0380] (ii)与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌O2抗原多糖的生物缀合物,其中该大肠杆菌O2抗原多糖包含式(O2)的结构;

[0381] (iii)与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌葡糖基化O4抗原多糖的生物缀合物,其中该大肠杆菌葡糖基化O4抗原多糖包含式(O4-Glc+)的结构;

[0382] (iv)与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌O6A抗原多糖的生物缀合物,其中该大肠杆菌O6A抗原多糖包含式(O6A)的结构;

[0383] (v)与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌O15抗原多糖的生物缀合物,其中该大肠杆菌O15抗原多糖包含式(O15)的结构;

[0384] (vi)与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌O16抗原多糖的生物缀合物,其中该大肠杆菌O16抗原多糖包含式(O16)的结构;

[0385] (vii)与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌O18A抗原多糖的生物缀合物,其中该大肠杆菌O18A抗原多糖包含式(O18A)的结构;

[0386] (viii)与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌O25B抗原多糖的生物缀合物,其中该大肠杆菌O25B抗原多糖包含式(O25B)的结构;以及

[0387] (ix)与EPA-4载体蛋白共价连接的大肠杆菌O75抗原多糖的生物缀合物,其中该大肠杆菌O75抗原多糖包含式(O75)的结构;

[0388] 其中该EPA-4包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,

[0389] 其中式(O1A)、(O2)、(O4-Glc+)、(O6A)、(O15)、(O16)、(O18A)、(O25B)和(O75)的各结构如表1所示,其中每个n独立地为1至100的整数,优选3至50,例如5至40,更优选5至30,例如7至25,例如10至20,并且

[0390] 其中O75抗原多糖与O6A抗原多糖的比率为约1.2:1至约8:1,优选约1.5:1至约4:1,更优选约2:1。

[0391] 实施例15是如实施例14所述的组合物,该组合物进一步包含1至15种额外的大肠杆菌抗原多糖,每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白。

[0392] 实施例16是如实施例2-15中任一项所述的组合物,其中该葡糖基化O4是与载体蛋白共价连接的大肠杆菌葡糖基化O4抗原多糖的生物缀合物,其中该大肠杆菌葡糖基化O4抗原多糖包含表1所示的式(O4-Glc+)的结构,其中n为3至50的整数,例如5至40,优选5至30,例如7至25,例如10至20,

[0393] 其中与载体蛋白共价连接的大肠杆菌葡糖基化O4抗原多糖的生物缀合物已在大肠杆菌细胞中产生,该大肠杆菌细胞包含:

[0394] (i)该大肠杆菌O4抗原多糖的rfb基因簇的核苷酸序列;

[0395] (ii)编码与SEQ ID NO:4具有至少80%、优选至少90%、优选至少95%序列同一性的葡糖基转移酶的核苷酸序列,其中该葡糖基转移酶能够修饰大肠杆菌O4抗原多糖以产生大肠杆菌葡糖基化O4抗原多糖;

[0396] (iii)编码分别与SEQ ID NO:7和8具有至少80%、优选至少90%、优选至少95%序列同一性的转位酶和糖基转移酶的核苷酸序列,其中该转位酶能够转位细菌萜醇连接的葡萄糖,并且该糖基转移酶能够葡糖基化细菌萜醇;

[0397] (iv)编码该载体蛋白的核苷酸序列;以及

[0398] (v)编码能够将大肠杆菌葡糖基化O4抗原多糖与载体蛋白共价连接的寡糖基转移酶的核苷酸序列,优选地其中该寡糖基转移酶是来自空肠弯曲杆菌的PglB。

[0399] 实施例17是一种在受试者中诱导针对大肠杆菌(优选肠外致病性大肠杆菌,ExPEC)的免疫应答的方法,该方法包括向该受试者施用如实施例1-16中任一项所述的组合物。

[0400] 实施例17a是如实施例17所述的方法,其中该受试者需要所述免疫应答。

[0401] 实施例18是一种在受试者中诱导针对大肠杆菌(优选肠外致病性大肠杆菌,ExPEC)的免疫应答的方法,该方法包括向该受试者施用第一有效量的大肠杆菌O75抗原多糖和第二有效量的大肠杆菌O6抗原多糖,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,并且其中第一有效量与第二有效量的比率为约1.2:1至约8:1,优选约1.5:1至约4:1,更优选约2:1。

[0402] 实施例18a是如实施例18所述的方法,其中该受试者需要所述免疫应答。

[0403] 实施例19是如实施例17-18a中任一项所述的方法,其中该免疫应答限制了受试者中侵袭性ExPEC疾病的严重性或预防了该疾病。

[0404] 实施例20是如实施例19所述的方法,其中该侵袭性ExPEC疾病包括脓毒症和/或菌血症。

[0405] 实施例20a是如实施例20所述的方法,其中该侵袭性ExPEC疾病包括脓毒症。

[0406] 实施例20b是如实施例20所述的方法,其中该侵袭性ExPEC疾病包括菌血症。

[0407] 实施例21是如实施例18-20中任一项所述的方法,该方法进一步包括向该受试者施用一种或多种、优选全部的O1、O2、O4、O15、O16、O18、O25抗原多糖,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,

[0408] 优选地,O1抗原为O1A,O4为葡糖基化的,O6抗原为O6A,O18抗原为O18A,并且O25抗原为O25B,

[0409] 更优选地,O1A、O2、葡糖基化O4、O6A、O15、O16、O18A、O25B和O75抗原多糖中的每一种分别包含如表1所示的式(O1A)、(O2)、(O4-Glc+)、(O6A)、(O15)、(O16)、(O18A)、(O25B)和(O75)的结构,其中每个n独立地为1至100的整数,优选3至50,例如5至40,优选5至30,例如7至25,例如10至20,并且其中O75抗原多糖与O6抗原多糖的比率为约1.2:1至约8:1,优选约1.5:1至约4:1,更优选约2:1。

[0410] 实施例22是如实施例18-21中任一项所述的方法,该方法进一步包括向该受试者施用1至15种额外的大肠杆菌抗原多糖,每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白。

[0411] 实施例23是如实施例18-22中任一项所述的方法,其中每种载体蛋白包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0412] 实施例24是如实施例17-23中任一项所述的方法,其中该受试者是患有大肠杆菌(优选ExPEC)感染或侵袭性ExPEC疾病或有患其风险的人。

[0413] 实施例25是如实施例17-24中任一项所述的方法,其中针对每次施用,施用约8-16μg、优选约16μg的O75抗原多糖。

[0414] 实施例26是如实施例21-25中任一项所述的方法,其中施用的大肠杆菌抗原多糖O1:O2:O4:O6:O15:O16:O18:O25:O75的权重比为1:1:1:1:1:1:1:2:2。

[0415] 实施例27是如实施例21-26中任一项所述的方法,其中该葡糖基化O4是与载体蛋白共价连接的大肠杆菌葡糖基化O4抗原多糖的生物缀合物,其中该大肠杆菌葡糖基化O4抗原多糖包含表1所示的式(O4-Glc+)的结构,其中n为3至50的整数,例如5至40,优选5至30,例如7至25,例如10至20,

[0416] 其中与载体蛋白共价连接的大肠杆菌葡糖基化O4抗原多糖的生物缀合物已在大肠杆菌细胞中产生,该大肠杆菌细胞包含:

[0417] (i)该大肠杆菌O4抗原多糖的rfb基因簇的核苷酸序列;

[0418] (ii)编码与SEQ ID NO:4具有至少80%、优选至少90%、优选至少95%序列同一性的葡糖基转移酶的核苷酸序列,其中该葡糖基转移酶能够修饰大肠杆菌O4抗原多糖以产生大肠杆菌葡糖基化O4抗原多糖;

[0419] (iii)编码分别与SEQ ID NO:7和8具有至少80%、优选至少90%、优选至少95%序列同一性的转位酶和糖基转移酶的核苷酸序列,其中该转位酶能够转位细菌萜醇连接的葡萄糖,并且该糖基转移酶能够葡糖基化细菌萜醇;

[0420] (iv)编码该载体蛋白的核苷酸序列;以及

[0421] (v)编码能够将大肠杆菌葡糖基化O4抗原多糖与载体蛋白共价连接的寡糖基转移酶的核苷酸序列,优选地其中该寡糖基转移酶是来自空肠弯曲杆菌的PglB。

[0422] 实施例27是如实施例1-16中任一项所述的组合物,其用于在受试者中在诱导针对大肠杆菌(优选肠外致病性大肠杆菌,ExPEC)的免疫应答的方法中使用。

[0423] 实施例28是如实施例1-16中任一项所述的组合物在制造用于在受试者中诱导针对大肠杆菌(优选肠外致病性大肠杆菌,ExPEC)的免疫应答的药物中的用途。

[0424] 实施例29是第一有效量的大肠杆菌O75抗原多糖和第二有效量的大肠杆菌O6抗原多糖的组合,其用于在受试者中在诱导针对大肠杆菌、优选肠外致病性大肠杆菌(ExPEC)的

免疫应答的方法中使用,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,并且其中该第一有效量与该第二有效量的比率为约1.2:1至约8:1,优选约1.5:1至约4:1,更优选约2:1。

[0425] 实施例29a是如实施例29所述的组合,其中该第一有效量和该第二有效量在同一组合物中。

[0426] 实施例29b是如实施例29所述的组合,其中该第一有效量和该第二有效量在单独的组合物中。

[0427] 实施例29c是如实施例29-29b中任一项所述的组合,其中该受试者需要所述免疫应答。

[0428] 实施例30是如实施例29-29c中任一项所述的组合,其中该免疫应答限制了受试者中侵袭性ExPEC疾病的严重性或预防了该疾病。

[0429] 实施例31是如实施例30所述的组合,其中该侵袭性ExPEC疾病包括脓毒症和/或菌血症。

[0430] 实施例32是如实施例29-31中任一项所述的组合,该组合进一步包含一种或多种、优选全部的有效量的大肠杆菌01、02、04、015、016、018、025抗原多糖,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,优选01抗原为01A,04为葡糖基化的,06抗原为06A,018抗原为018A,并且025抗原为025B,优选01A、02、葡糖基化04、06A、015、016、018A、025B和075抗原多糖中的每一种分别包含如表1所示的式(01A)、(02)、(04-Glc+)、(06A)、(015)、(016)、(018A)、(025B)和(075)的结构,其中每个n独立地为1至100的整数,优选3至50,例如5至40,优选5至30,例如7至25,例如10至20,并且其中075抗原多糖与06抗原多糖的比率为约1.2:1至约8:1,优选约1.5:1至约4:1,更优选约2:1。

[0431] 实施例33是如实施例29-32中任一项所述的组合,该组合进一步包含有效量的1至15种额外的大肠杆菌抗原多糖,每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白。

[0432] 实施例34是如实施例29-33中任一项所述的组合,其中每种载体蛋白包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0433] 实施例35是如实施例29-34中任一项所述的组合,其中该受试者是患有大肠杆菌(优选ExPEC)感染或侵袭性ExPEC疾病或有患其风险的人。

[0434] 实施例36是如实施例29-35中任一项所述的组合,其中075抗原多糖的有效量为约8-16μg,优选约16μg。

[0435] 实施例37是第一有效量的大肠杆菌075抗原多糖和第二有效量的大肠杆菌06抗原多糖的组合,在制造用于在受试者中诱导针对大肠杆菌、优选肠外致病性大肠杆菌(ExPEC)的免疫应答的药物中,其中每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,并且其中该第一有效量与该第二有效量的比率为约1.2:1至约8:1,优选约1.5:1至约4:1,更优选约2:1。

[0436] 实施例37a是如实施例37所述的组合,其中该受试者需要所述免疫应答。

[0437] 实施例38是如实施例37或37a所述的组合,其中该免疫应答限制了受试者中侵袭性ExPEC疾病的严重性或预防了该疾病。

[0438] 实施例39是如实施例38所述的组合,其中该侵袭性ExPEC疾病包括脓毒症和/或菌血症。

[0439] 实施例40是如实施例37-39中任一项所述的组合,该组合进一步包含一种或多种、优选全部的有效量的大肠杆菌01、02、04、015、016、018、025抗原多糖,在制造药物中,其中

每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白,优选O1抗原为O1A,O4为葡糖基化的,O6抗原为O6A,O18抗原为O18A,并且O25抗原为O25B,优选O1A、O2、葡糖基化O4、O6A、O15、O16、O18A、O25B和O75抗原多糖中的每一种分别包含如表1所示的式(O1A)、(O2)、(O4-Glc+)、(O6A)、(O15)、(O16)、(O18A)、(O25B)和(O75)的结构,其中每个n独立地为1至100的整数,优选3至50,例如5至40,优选5至30,例如7至25,例如10至20,并且其中O75抗原多糖与O6抗原多糖的比率为约1.2:1至约8:1,优选约1.5:1至约4:1,更优选约2:1。

[0440] 实施例41是如实施例37-40中任一项所述的组合,在制造药物中,该组合进一步包含有效量的1至15种额外的大肠杆菌抗原多糖,每种抗原多糖独立地共价连接至载体蛋白。

[0441] 实施例42是如实施例37-41中任一项所述的组合,其中每种载体蛋白包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0442] 实施例43是如实施例37-42中任一项所述的组合,其中该受试者是患有大肠杆菌(优选ExPEC)感染或侵袭性ExPEC疾病或有患其风险的人。

[0443] 实施例44是如实施例37-43中任一项所述的组合,其中用于向受试者施用的一个剂量的O75抗原多糖的有效量为约8-16μg,优选约16μg。

[0444] 实例

[0445] 实例1:大肠杆菌感染的流行病学数据

[0446] 为了确定引起菌血症的大肠杆菌的O血清型分布,进行了全球监测研究。2011年至2017年间,从北美洲、欧洲、亚太地区和南美洲的国家住院的≥60岁患者中收集了超过3200株大肠杆菌血流分离株。使用经典凝集技术和基于序列的O基因分型来分析每个菌株的O抗原血清型。参见下表2。

[0447] 分析分离的人血液样品以确定其中病原体的身份及其抗生素抗性模式。分析后从样品中获得大肠杆菌分离株。通过MALDI-TOF MS验证大肠杆菌身份。使用基于抗血清的凝集试验对大肠杆菌分离株进行了进一步分析,以确定其O抗原血清型(DebRoy等人(2011) Animal health research reviews/Conference of Research Workers in Animal Diseases[动物健康研究评论/动物疾病研究工作者会议]12,169-185)。通过全基因组测序对无法通过凝集方法分型的分离株进行进一步分析,然后基于O血清型特异性wzy和wzx基因序列进行O基因分型。

[0448] 表2.基于通过凝集进行的O血清分型加上无法通过凝集分型的分离株的O基因分型,来自2011年至2017年间全球收集的3217株血液分离株的集合的最常见菌血症相关大肠杆菌O血清型的分布。受试者在以下国家住院:美国、加拿大、阿根廷、巴西、英国、德国、西班牙、意大利、荷兰、法国、日本、泰国、韩国和澳大利亚。

[0449]

O-血清型	流行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%)

[0450] 对菌血症相关大肠杆菌的全球集合的地理位置进行分层显示,前10种O血清型的流行与位置无关,表明这些O血清型是全球上与引起菌血症的大肠杆菌相关的主要O血清型。

[0451] 在菌血症相关的多重耐药大肠杆菌分离株(n=345)(即,对至少三类临床相关抗微生物药物具有抗性的菌株)的全球集合中,前10种O血清型的流行率为75.4%。

[0452] 将来自流行病学分析的所有信息合起来看,这10种主要O血清型可以覆盖估计60%-80%的大肠杆菌相关菌血症感染,假设覆盖了不可分型菌株的亚部分。

[0453] 覆盖大部分引起菌血症的大肠杆菌血清型的多价疫苗将非常有用。因此,表2中的O血清型将是基于O抗原的多价疫苗的良好候选者。这种疫苗可以有利地使用化学缀合或生物缀合技术来制备。

[0454] 实例2:大肠杆菌O抗原生物缀合物的生产和由此产生的生物缀合物产品。

[0455] 产生了十(10)种生物缀合物,包括大肠杆菌O1A-EPA生物缀合物、O2-EPA生物缀合物、O4-Glc+-EPA生物缀合物(下文也称为O4-EPA,即在以下实例中,O4抗原多糖的生物缀合物是其中O4被葡糖基化的变体,其具有表1所示的聚糖结构(O4-Glc+);2020年3月18日提交的PCT/US20/23404中详细提供了使用新的、迄今为止未报道的和未知的葡糖基转移酶GtrS制备该变体的描述,该葡糖基转移酶GtrS能够通过添加葡萄糖来特异性修饰大肠杆菌O4抗原多糖以产生大肠杆菌葡糖基化O4抗原,将其通过引用并入本文)、O6A-EPA生物缀合物、O8-EPA生物缀合物、O15-EPA生物缀合物、O16-EPA生物缀合物、O18A-EPA生物缀合物、O25B-EPA生物缀合物和O75-EPA生物缀合物。这些缀合物中的聚糖的结构可以在表1的各个式中见到。包含这10种生物缀合物的组合物在本文中称为'ExPEC10V'。包含O1A-EPA、O2-EPA、O6A-EPA和O25B-EPA生物缀合物的组合物称为"ExPEC4V"(并且其先前描述于例如WO 2015/124769和WO 2017/035181中)。这十种生物缀合物的生产以及这些生物缀合物的示例性生产菌株详细描述于2020年3月18日提交的PCT/US20/23404中,将其通过引用并入本文。

[0456] 大肠杆菌W3110亲本菌株

[0457] 将非致病性大肠杆菌K12菌株W3110用作构建所有十株生产菌株的亲本菌株。大肠杆菌K12菌株W3110获得自大肠杆菌菌种保藏中心(Coli Genetic Stock Center)(耶鲁大学,纽黑文(New Haven)(康涅狄格州(CT)),美国,产品编号CGSC#4474)。先前描述了其相关基因型(大肠杆菌W3110,F-、λ-、IN(rrnD-rrnE)1、rph-1),并且先前公开了其基因组序列(Hayashi K等人,2006,Mol.Syst.Biol.[分子系统生物学]2006.0007(doi:10.1038/msb4100049))。对大肠杆菌W3110菌株进行基因修饰,以使其能够生产这些大肠杆菌O抗原生物缀合物中的每一种(表3)。

[0458] 生物缀合物生产菌株

[0459] "ExPEC4V"和"ExPEC10V"组合物均包含来自相同生产菌株的O2-EPA和O25B-EPA生物缀合物。"ExPEC4V"组合物包含来自stGVXN4411或stLMTB10217生产菌株的O1A-EPA生物缀合物,而"ExPEC10V"组合物包含来自stLMTB10217生产菌株的O1A-EPA生物缀合物。"ExPEC4V"组合物包含来自stGVXN4112生产菌株的O6A-EPA生物缀合物,而"ExPEC10V"组合

物包含来自stLMTB10923生产菌株的O6A-EPA生物缀合物。此外,“ExPEC10V”组合物包含来自不用于“ExPEC4V”的生产菌株的O4-EPA(即(O4-Glc+)-EPA)、O8-EPA、O15-EPA、O16-EPA、O18A-EPA和O75-EPA生物缀合物。如下所示,不同的生产菌株在用于表达EPA载体蛋白和/或寡糖基转移酶PglB的质粒方面可能不同。下表3中给出了几个示例性生产菌株的概述。

[0460] 表3.用于ExPEC4V和ExPEC10V疫苗组合物的O抗原生物缀合物的大肠杆菌生产菌株的基因工程化概述

[0461]

血清型	菌株名称	基因组突变			质粒	
		rfb 基因簇	*waaL*	*gtrABS*	*pglB*	*epa*
O1A（ExPEC4V）	stGVXN4411	Δ*rfb*::O1A *rfb* upecGVXN_032	Δ*waaL*	-	pGVXN970	pGVXN1076
O1A（ExPEC4V；ExPEC10V）	stLMTB10217	Δ*rfb*::O1A *rfb* upecGVXN_032	Δ*waaL*	-	pGVXN1221	pGVXN1076

O2	stGVXN4906	Δ*rfb*::O2 *rfb* upecGVXN_116	Δ*waaL*	-	pGVXN971	pGVXN1076
O4	BVEC-L-00684	Δ*rfb*::O4 *rfb* CCUG11450	Δ*waaL*	Δ*gtrS::gtrS* O4	pGVXN1217	pGVXN1076
O6A（ExPEC4V）	stGVXN4112	Δ*rfb*::O6A *rfb* CCUG11309	Δ*waaL*	-	pGVXN114	pGVXN659
O6A（ExPEC10V）	stLMTB10923	Δ*rfb*::O6A *rfb* CCUG11309	Δ*waaL*	-	pGVXN1221	pGVXN1076
O8	stLMTB11734	Δ*rfb*::O8 *rfb* E2420	Δ*waaL*	Δ*gtrABS*	pGVXN970	pGVXN1076
O15	stLMTB11738	Δ*rfb*::O15 *rfb* OC24891	Δ*waaL*	Δ*gtrABS*	pGVXN1221	pGVXN1076
O16	stLMTB11739	Δ*rfb*::O16 *rfb* OC24208	Δ*waaL*	Δ*gtrABS*	pGVXN2381	pGVXN1076
O18A	BVEC-L-00559	Δ*rfb*::O18A *rfb* OC24255	Δ*waaL*	Δ*gtrABS*	pGVXN970	pGVXN1076
O25B	stGVXN4459	Δ*rfb*::O25B *rfb* upecGVXN_138	Δ*waaL*	Δ*gtrABS*	pGVXN970	pGVXN1076
O75	stLMTB11737	Δ*rfb*::O75 *rfb* CCUG31	Δ*waaL*	Δ*gtrABS*	pGVXN1217	pGVXN1076

[0462]

[0463] 还制备了替代性生产菌株并将其用于一些生物缀合物,例如以寻找具有生物缀合物的提高的产量和/或某些特征变化的克隆。

[0464] O抗原生物合成(rfb)基因簇

[0465] 在所有的大肠杆菌O抗原生产菌株中,天然存在的大肠杆菌W3110基因组O16::IS5-抗原生物合成(rfb)基因簇被来自选定血清型的大肠杆菌菌株的选定O抗原特异性生物合成簇(编码特定血清型O抗原结构(对于这些O抗原结构,参见表1))替换。在对大肠杆菌血液分离株进行全基因组分析后,选择或确认了十个供体rfb簇。已在单个同源重组事件中实现了对W3110 O16::IS5 rfb基因簇(其在O抗原生物合成中存在缺陷)的替换。在O16和O18Arfb基因簇的情况下,供体DNA经由侧翼的gnd和rmlCA基因而重组,而其他菌株的rfb基因簇经由侧翼的gnd和galF基因而重组。SEQ ID NO:9和11-19中提供了生产菌株中rfb簇的

序列。

[0466] O抗原连接酶(waaL)基因

[0467] 所有大肠杆菌O抗原生产菌株均带有由waaL基因编码的大肠杆菌W3110基因组O抗原连接酶的人工引入的缺失。在ΔwaaL菌株中,O抗原向脂质A的转移被破坏,而引导O抗原向载体蛋白转移以提高产物产量。

[0468] O抗原糖基化(gtrABS)基因

[0469] 在大肠杆菌O8、O15、O16、O18A、O25B和O75生产菌株中,负责O16 O抗原糖基化的大肠杆菌W3110基因组gtrABS基因已被缺失。虽然不同血清型中的gtrA和gtrB基因具有高度同源性和可互换性,但gtrS基因编码特定血清型O抗原糖基转移酶。在大肠杆菌W3110中,GtrS可以将葡萄糖(Glc)残基转移到大肠杆菌O16 O抗原的α-L-Rha-(1→3)--d-GlcNAc基序中的GlcNAc糖上。在大肠杆菌O1A、O2和O6A生产菌株中,没有发生gtrABS基因的缺失或替换。这些O抗原缺少α-L-Rha-(1→3)-d-GlcNAc基序,该基序是大肠杆菌O16 gtrS的天然底物。在大肠杆菌O4生产菌株中,W3110 gtrS基因已被大肠杆菌O4 gtrS基因替换,以适应大肠杆菌O4 O抗原的适当葡糖基化(大肠杆菌O4 gtrS基因的编码序列在本文中作为SEQ ID NO:5提供,并且大肠杆菌O4 GtrS蛋白的氨基酸序列在本文中作为SEQ ID NO:4提供;还参见例如2020年3月18日提交的PCT/US20/23404)。

[0470] 寡糖基转移酶PglB

[0471] 所有大肠杆菌O抗原生产菌株均表达空肠弯曲杆菌糖基转移酶PglB的变体,该糖基转移酶PglB可以通过N-糖基化将O抗原转移到载体蛋白上的氨基酸共有序列上。PglB具有广泛的底物识别,但由于产物产量低,制备了几种表达具有改变的底物特异性的PglB变体的生产菌株,这导致产物产量提高(参见例如,WO 2016/107818、WO 2016/107819)。将pglB基因置于质粒上的异丙基β-d-1-硫代半乳糖吡喃糖苷(IPTG)诱导型启动子之后。下面的表4列出了由质粒编码的PglB变体,这些质粒用于生产针对上述ExPEC4V和ExPEC10V组合物的生物缀合物的大肠杆菌O抗原生产菌株。在运载体骨架、抗生素抗性标记和/或替代性PglB变体方面具有变异的其他质粒也已成功被测试以用于生物缀合物生产。

[0472] 表4.大肠杆菌O抗原生产菌株中使用的PglB和EPA质粒

[0473]

质粒名称	基因	描述[1]
pGVXN114	*pglB*	空肠弯曲杆菌密码子使用；SpR
pGVXN970	*pglB*	优化的大肠杆菌密码子使用；SpR
pGVXN971	$pglB^{N534Q}$	优化的大肠杆菌密码子使用；PglB 的天然糖基化位点是失活的；SpR
pGVXN1217	$pglB^{N311V}$	优化的大肠杆菌密码子使用；底物优化的 PglB；SpR
pGVXN1221	$pglB^{N311V,K482R,D483H,A669V}$	优化的大肠杆菌密码子使用；底物优化的 PglB；SpR
pGVXN2381	$pglB^{Y77H,S80R,Q287P,K289R,N311V}$	优化的大肠杆菌密码子使用；底物优化的 PglB；SpR
pGVXN659	EPA-4	具有四个生物缀合位点的 EPA;AmpR
pGVXN1076	EPA-4	具有四个生物缀合位点的 EPA；KanR

[0474] [1]SpR,壮观霉素抗性;AmpR,氨苄青霉素抗性;KanR,卡那霉素抗性

[0475] 如在例如2020年3月18日提交的PCT/US20/23415中更详细描述的,确定了ExPEC10V中十种大肠杆菌O抗原的每种生物缀合物的最佳PglB变体,将其通过引用以其全文并入本文。

[0476] 载体蛋白(EPA)

[0477] 所有大肠杆菌O抗原生产菌株均表达一种遗传去毒的铜绿假单胞菌ADP-核糖基转移酶类毒素(EPA)作为O抗原的载体蛋白。EPA类毒素与野生型EPA毒素的不同之处在于两个残基:Leu552被更改为Val并且Glu553(在催化结构域中)被缺失。据报道,Glu553缺失可显著降低毒性。除了去毒突变外,还引入了四个(EPA-4)共有N-糖基化位点基序。将epa基因置于质粒上的1-阿拉伯糖(Ara)诱导型启动子之后(表4)。表4限于用于上述“ExPEC4V”和“ExPEC10V”组合物中的生物缀合物的生产菌株中的质粒。在运载体骨架、抗生素抗性标记和/或EPA变体方面具有变化,例如在共有N-糖基化位点基序(例如具有两个这样的基序,EPA-2)的数量方面不同的质粒也已成功地被测试以用于生物缀合物生产。

[0478] 实例3:优化寡糖基转移酶以产生大肠杆菌O抗原的生物缀合物。

[0479] 可以通过修饰空肠弯曲杆菌寡糖基转移酶PglB来实现生物缀合物生产的产量优化,这可以使目的O抗原与EPA载体蛋白的N-糖基化更有效或程度更高。在用于生产具有葡糖基化O4(O4-Glc+)O抗原多糖的生物缀合物的大肠杆菌菌株中,应用了这种优化策略并产生了提高生物缀合物产物产量的优化的(O4-Glc+)特异性PglB变体。

[0480] 在这种方法中,将含有EPA表达质粒的O4-Glc+O抗原多糖生产菌株用多种不同的PglB表达质粒转化,每个PglB表达质粒在PglB蛋白中含有不同的氨基酸取代,这改变了底物特异性。在渗透压休克实验中以摇瓶水平评估每个菌株的生物缀合物生产水平和概况,并使用O4-Glc+特异性单克隆抗体通过毛细管电泳免疫测定对周质提取物进行读数。

[0481] 发现含有N311V氨基酸取代的测试PglB变体之一显著提高了葡糖基化O4生物缀合物的产物产量(参见PCT/US20/23415,于2020年3月18日提交,将其通过引用以其全文并入本文)。

[0482] 在进一步改进N311V PglB变体的进一步改善中,Y77H氨基酸取代进一步提高了O4-Glc+特异性产物产量,并显示出与N311V PglB变体相比,二糖基化和三糖基化产物的水平增加,其中发现其他改进是中立的或对产物产量有负面影响(参见PCT/US20/23415,于2020年3月18日提交,将其通过引用以其全文并入本文)。质粒pLMTB4008(SpR)编码优化的大肠杆菌密码子使用、优化的(O4-Glc+)底物、具有突变Y77H和N311V的PglB变体。

[0483] 与第一轮优化的PglB-N311V变体相比,发现对O4-Glc+O抗原多糖具有优化的底物特异性、相对于野生型(wt)空肠弯曲杆菌糖基转移酶PglB含有N311V和Y77H氨基酸取代的PglB变体导致加倍的生物缀合物产量。

[0484] 类似地,使用筛选,还针对ExPEC10V组合物中其他九种血清型的大肠杆菌O抗原生物缀合物生产,确定了最佳产量PglB变体,参见例如于2020年3月18日提交的PCT/US20/23415,将其通过引用以其全文并入本文。

[0485] 对于具有O1A、O6A或O15抗原多糖的生物缀合物,发现具有氨基酸突变N311V、K482R、D483H和A669V的PglB提供最高的产量。

[0486] 对于具有O2、O8、O18A或O25B抗原多糖的生物缀合物,发现野生型PglB(即,在位置77、80、287、289、311、482、483和669处没有氨基酸突变)提供最高的产量。

[0487] 对于具有O16抗原多糖的生物缀合物,发现具有氨基酸突变Y77H、S80R、Q287P、K289R和N311V的PglB提供最高的产量。

[0488] 对于具有O75抗原多糖的生物缀合物,发现具有氨基酸突变N311V的PglB提供最高的产量。

[0489] 这些结果表明,对于不同的O抗原,最佳PglB变体是不同的,并且用于产生具有给定O抗原多糖的生物缀合物的最佳PglB变体是不可预测的。

[0490] 实例4:来自10种大肠杆菌血清型的O抗原的生物缀合物的质量属性。

[0491] 目标O抗原的O-聚糖残基在结构上是多样的,并且具有可变的重复单元。糖基转移酶PglB的特异性和亲和力与聚糖结构有关。因此,制备具有所需质量属性(例如,纯度、聚糖/蛋白质比率等)的生物缀合物是一项具有挑战性的不简单的任务。PglB和EPA载体蛋白的正确组合决定了产量并可能影响糖基化效率。通过优化PglB和载体蛋白,产生了具有所需质量属性的生物缀合物。保持总载体蛋白的较低阈值也很重要,特别是当一种或多种O抗原生物缀合物组合在一起并在单一组合物或疫苗中施用时,因为非常大量的载体蛋白可能会导致免疫干扰。为了避免这种现象,优选具有较高聚糖/蛋白质比率的缀合物。因此,对于ExPEC10V疫苗,开发了具有至少可比较的(与先前描述的已进行临床试验的ExPEC4V疫苗相比)糖基化比率的生物缀合物。

[0492] 按照先前描述的方法,通过在生物反应器(10L和/或200L体积)中培养各自的宿主细胞(实例2,表3)并表达生物缀合物来分别产生生物缀合物。通过细菌分批补料发酵分批生产每种原料药,以产生含有相应多糖血清型的经表达的生物缀合物的生物质。用IPTG和阿拉伯糖培养和诱导细胞。通过渗透压休克和色谱纯化从生物反应器培养物中细胞的周质中分离生物缀合物。对10种生物缀合物中的每一种均进行该过程。

[0493] 如此制备的大肠杆菌O抗原生物缀合物是ExPEC10V和ExPEC4V的原料药(DS),其显示出可比较的关键质量属性:(1)工艺相关纯度(通过RP-HPLC测量)高于95%,(2)多糖/蛋白质比率范围在约0.1-0.5之间,大部分在0.15和0.45之间,(3)细菌内毒素(欧洲药典2.2.3(Ph.Eur.2.2.3))小于0.5EU/μg多糖。单个多糖链的平均长度典型地在约10-20个重复单元之间(使用高分辨率SDS-PAGE测量)。

[0494] 多糖重复单元的结构被证实(通过对缀合物(完整的或胰蛋白酶消化的)进行NMR和MS/MS)为表1中相应血清型的各式所示的结构,所有十种生物缀合物均是上述ExPEC10V组合物的DS。

[0495] ExPEC10V药物产品(DP)包含上述十种单价DS的混合物。

[0496] 实例5:ExPEC10V疫苗的毒理学。

[0497] 使用ExPEC10V在雌性NZW兔中进行了单剂量试点毒性和局部耐受性研究(非GLP)。一组(n=2)接受肌内(IM)注射(在第0天)对照(生理盐水),第二组(n=4)接受IM注射105.6μg总多糖(PS)/剂量(9.6:9.6:9.6:9.6:9.6:9.6:9.6:9.6:19.2:9.6μg PS/剂量,分别对于O血清型O1A、O2、O4、O6A、O8、O15、O16、O18A、O25B和O75)的ExPEC10V,使用0.6mL(176μg PS/mL)的剂量体积。在第2天进行尸检。

[0498] 没有观察到死亡。此外,在临床观察(包括使用Draize评分的注射部位影响)、体重、食物消耗和体温方面没有记录到疫苗相关的影响。在组织病理学上,在施用部位或引流(髂)淋巴结未观察到与疫苗相关的变化。在经处理的四只动物中的一只中观察到脾中生发中心的形成小幅增加(第2天),这被认为是对注射的疫苗的正常免疫学应答。总体而言,对雌性兔进行单次IM剂量的ExPEC10V施用耐受性良好。

[0499] 实例6:ExPEC10V混合配制品在兔中的免疫原性。

[0500] ExPEC4V疫苗(包含大肠杆菌O1A、O2、O6A和O25B血清型的生物缀合物)先前已被证明对大鼠、兔和人类中的这四种血清型具有免疫原性(参见例如,WO 2015/124769;WO 2017/035181;Huttner等人,2017,Lancet Infect Dis[柳叶刀传染病],http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30108-1;RW Frenck Jr等人,2019,Lancet Infect Dis[柳叶刀传染病]19(6):631-640,http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30803-X)。大肠杆菌血清型O4-Glu+、O8、O15、O16、O18A和O75的生物缀合物(均具有作为载体蛋白的EPA-2)在单独(单价)施用于大鼠时的免疫原性证实这些生物缀合物中的每一种也具有免疫原性,因为ELISA数据表明这些生物缀合物中的每一种均可以引发高水平的大肠杆菌O抗原特异性抗体(未显示)。

[0501] 还测试了含有上述10种生物缀合物的混合物的10价疫苗的免疫原性。新西兰白(NZW)兔(雌性,12-16周龄)接受3次肌内ExPEC10V免疫或生理盐水,间隔2周施用(表5;在第0、14和27天施用)。将作为这些实验中使用的ExPEC10V疫苗中的一部分的10种多糖与含有4个糖基化位点的载体蛋白EPA(EPA-4)缀合。以3种不同剂量配制该疫苗:组1('高剂量'):8μg/剂量的O1A、O2、O6A、O4、O8、O15、O16、O18和O75,以及16μg/剂量的O25B;组2('中等剂量'):4μg/剂量的O2、O4、O8、O15、O16、O18和O75,8μg/剂量的O1A和O6A,以及16μg/剂量的O25B;组3('低剂量'):0.4μg/剂量的O2、O4、O8、O15、O16、O18和O75,0.8μg/剂量的O1A和O6A,以及1.6μg/剂量的O25B。来自对照组(组4)的动物仅接受生理盐水(0.9%(w/v)氯化钠溶液)(表5)。

[0502] 在第0天(免疫前)以及免疫后第14、27和42天评估抗体应答。由疫苗中包含的每种生物缀合物和载体蛋白EPA诱导的血清抗体水平通过ELISA(总IgG)测量,使用特定类型的LPS作为涂覆材料。抗体滴度报告为EC50值,基于4参数逻辑非线性回归模型中绘制的12步滴定曲线的副本,其对应于半数最大有效浓度。功能活性由OPK确定。

[0503] 表5.实验组的描述。

[0504]

实验组	剂量（μg/PS）	样品量
	O1A : O2 : O6A : O25B : O4 : O8 : O15 : O16 : O18A : O75	
组 1（高剂量）	8 : 8 : 8 : 16 : 8 : 8 : 8 : 8 : 8 : 8	7
组 2（中等剂量）	8 : 4 : 8 : 16 : 4 : 4 : 4 : 4 : 4 : 4	7
组 3（低剂量）	0.8 : 0.4 : 0.8 : 1.6 : 0.4 : 0.4 : 0.4 : 0.4 : 0.4 : 0.4	7
组 4（对照）	0.9%（w/v）氯化钠溶液	7

[0506] 结果显示在图1中并总结在表6中。

[0507] 表6.ExPEC10V在NZW兔中诱导的大肠杆菌O抗原特异性抗体应答的总结。

[0508]

ExPEC10V	疫苗接种后第 14 天的抗体应答									
剂量	O1A	O2	O6A	O25B	O4	O8	O15#	O16	O18A	O75
高	*	**	**	*	**	ns	**	**	*	ns
中等	*	**	**	**	**	ns	**	**	ns	ns
低	*	*	*	*	*	ns	**	**	ns	ns

[0509]

ExPEC10V	疫苗接种后第 27 天的抗体应答									
剂量	O1A	O2	O6A	O25B	O4	O8	O15#	O16	O18A	O75
高	**	**	**	**	**	*	**	**	**	**
中等	**	**	**	**	**	*	**	**	*	**
低	**	**	**	**	**	*	**	**	**	**

[0510]

ExPEC10V	疫苗接种后第 42 天的抗体应答									
剂量	O1A	O2	O6A	O25B	O4	O8	O15#	O16	O18A	O75
高	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
中等	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
低	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**

[0511] 将其中p值具有统计学显著性的特定血清型抗体应答用星号表示。将其中p值不具有统计学显著性的特定血清型抗体应答指定为ns。使用威尔科克森(Wilcoxon)秩和检验与邦费罗尼(Bonferroni)校正进行多重比较。将接种ExPEC10V的动物(组1、2和3)与生理盐水对照(组4)进行比较。*p≤0.05,**p≤0.01。#P值在从对照组中排除异常动物后具有统计学显著性(敏感性分析)。

[0512] 与O1A、O2、O4、O6A、O16、O18A和O25B的生理盐水对照相比,高剂量的ExPEC10V(组

1)在研究的所有时间点(免疫后第14、27和42天)诱导显著更高的IgG抗体水平(图2,表6)。在免疫后第27天和第42天,观察到与生理盐水对照相比,由O8和O75缀合物诱导的抗体滴度显著更高(图1,表6)。

[0513] 与O1A、O2、O4、O6A、O16和O25B的生理盐水对照相比,中等剂量的ExPEC10V(组2)和低剂量(组3)在研究的所有时间点(免疫后第14、27和42天)诱导显著更高的抗体水平(图1,表6)。在免疫后第27天和第42天,观察到与生理盐水对照相比,由O8、O18A和O75缀合物诱导的抗体滴度显著更高,这表明兔中的加强剂量增加了对这些O血清型的应答(图1,表6)。

[0514] 对于O15缀合物,从对照组中去掉异常动物的敏感性分析表明,在免疫后第14、27和42天,与生理盐水对照相比,所有三个剂量的ExPEC10V疫苗均诱导抗体应答显著增加(图1,表6)。

[0515] 在研究的所有时间点(第14、27和42天),对于所测试的三个剂量的ExPEC10V(高、中等和低),载体蛋白EPA诱导的抗体显著高于生理盐水处理(对照)组中的EPA抗体滴度(图1)。

[0516] 剂量比较(未显示)表明,在疫苗接种后第14天,与低剂量的大多数测试的缀合物(O1A、O2、O4、O6A、O15、O16、O18A和O25B)相比,高剂量的ExPEC10V诱导显著更高的抗体应答。与低剂量的O1A、O2、O4、O18A、O25B和O75相比,中等剂量的ExPEC10V也诱导了显著更高的抗体应答。对于O8缀合物,在疫苗接种后第14天,ExPEC10V的所有三种配制品均诱导相似水平的抗体。

[0517] 与O1A、O2、O4、O16、O25B和O75缀合物的高和中等剂量ExPEC10V相比,低剂量的ExPEC10V在疫苗接种后第42天(在初免剂量和两次加强剂量后)诱导抗体应答显著增加。这些发现与结合疫苗的其他经验一致,例如,在接种肺炎球菌结合疫苗的婴儿中没有观察到剂量和初免接种的抗体应答程度之间的明确关系(Poolman JT等人Expert Rev Vaccines.[疫苗专家评论]2013,12(12):1379-94)。

[0518] 对于O6A、O8和O15缀合物,在疫苗接种后第42天测试的三个剂量的ExPEC10V之间没有显著差异。对于O18A缀合物,与疫苗接种后第42天的中等剂量相比,高剂量的ExPEC10V诱导了显著更高的抗体应答。

[0519] 对于载体蛋白(EPA),与疫苗接种后第14天的低剂量相比,高和中等剂量的ExPEC10V诱导了显著更高的抗体应答。与疫苗接种后第42天的低剂量相比,高剂量的疫苗也诱导了显著更高的抗体应答。

[0520] 总之,在第0、14、27天经由肌内注射而施用的ExPEC10V的三种配制品(高、中等和低)在兔中具有免疫原性。

[0521] 迄今为止,已显示出在兔中由该疫苗诱导的能够杀死大肠杆菌菌株的功能性抗体,其血清型为O1A、O2、O4、O6A、O15、O16和O25B。

[0522] 在另一个实验中,作为毒理学研究的一部分,制备了GMP批次的ExPEC10V疫苗(对于生产,参见上文实例4)并将其注射到NZW兔中(表7)。在这项研究中,NZW兔(雄性和雌性)接受3次肌内注射(0.6mL)ExPEC10V疫苗(第1、15和29天),对照组接受0.9%(w/v)氯化钠溶液(生理盐水)。针对O1A、O2、O4、O6A、O8、O15、O16、O18A和O75血清型,每个剂量的疫苗含有9.6μg多糖(PS),并且针对O25B血清型,含有19.2μg PS,这对应于105.6μg总PS(176μg总PS/mL)和382.8μg总EPA(638μg EPA/mL)。对O抗原和载体蛋白(EPA)的IgG滴度由在预处理期

(第1天)以及免疫后第31天和第50天收集的样品确定。

[0523] 与仅接受生理盐水的对照组相比,在疫苗接种后第31天和第50天,在接受ExPEC10V的组中观察到针对所有O抗原和载体蛋白EPA的抗体应答显著增加(图2,表8)。对于O1A血清型,当将接种疫苗的动物与对照进行比较时,在第1天(基线)也观察到显著更高的抗体应答。这些结果表明,一些动物预先暴露于大肠杆菌或具有与O1A-LPS发生交叉反应的抗体。

[0524] 表7.实验组和NZW兔中使用的ExPEC10V剂量。

[0525]

组	处理	剂量	给药日	主要(第31天)(雄性/雌性)	恢复(第50天)(雄性/雌性)
1	对照	0	1, 15, 29	10	10
2	ExPEC10V	105.6 μg PS*	1, 15, 29	10	10

[0526] *对于血清型O1A、O2、O4、O6A、O8、O15、O16、O18A、O25B、O75,每个剂量(0.6mL给药体积)分别含有9.6:9.6:9.6:9.6:9.6:9.6:9.6:9.6:19.2:9.6μg多糖(PS)(176μg总PS/mL)。每个剂量含有382.8μg EPA蛋白(638μgEPA/mL)。

[0527] 表8.ExPEC10V在NZW兔中的免疫原性,作为毒理学研究的一部分。

[0528]

处理	疫苗接种后第14天的抗体应答									
ExPEC10V	O1A	O2	O6A	O25B	O4	O8	O15	O16	O18A	O75
第31天	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
第50天	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****

[0529] ExPEC10V诱导的抗体应答。将与对照相比在疫苗组中观察到抗体应答显著增加的血清型用星号表示。采用似然比检验的Tobit模型。****P≤0.0001。

[0530] 实例7:ExPEC10V疫苗在人类中的1/2a期试验。

[0531] 目前,没有可用的疫苗来预防IED。选择构成ExPEC10V疫苗的血清型(O1A、O2、O4、O6A、O8、O15、O16、O18A、O25B和O75)来解决由大多数临床相关ExPEC菌株引起的侵袭性疾病,这些菌株也代表引起抗微生物IED的大多数ExPEC分离株(包括ST131)。选定的血清型代表引起老年人群血流感染的十种流行的ExPEC O血清型,并且是大约70%的由ExPEC引起的血流感染的原因。

[0532] 由于结合疫苗在预防侵袭性疾病方面的作用机制预计不会受到抗生素抗性机制的影响,因此相信ExPEC10V疫苗可提供保护对抗由抗药性和药物敏感性O1A、O2、O4、O6A、O8、O15、O16、O18A、O25B和O75血清型引起的IED。

[0533] 先前有关于ExPEC4V的临床经验,它是一种较早的候选疫苗,包含也在ExPEC10V中发现的四种大肠杆菌O抗原缀合物(O1A、O2、O6A和O25B)的子集。基于四个已完成的临床研究(两个1期研究、两个2期研究)的结果,研究参与者对ExPEC4V耐受性良好,并且在剂量高达16μg多糖(PS)/血清型(O1A、O2、O6A和O25B)下未观察到疫苗相关的安全信号。大多数不良事件(AE)为1级和2级,很少报告3级AE。主要在较高剂量的ExPEC4V下观察到迟发诱发性局部AE(疫苗接种第5天后开始的AE)。在每项研究中,ExPEC4V疫苗均显示出免疫原性,这表明疫苗免疫应答呈剂量依赖性,并且O抗原特异性免疫球蛋白G(IgG)滴度增加,如通过酶联免疫吸附测定(ELISA)所测量的。使用ExPEC4V优化的调理吞噬杀伤测定(OPKA)证明了抗体的功能活性。ELISA和OPKA测试结果的共同分析表明,这些测定应答之间存在相关性(在2期临床试验[研究4V-BAC2001]中,第30天和第360天的皮尔森相关系数分别为≥0.61和≥

0.48),这证实可使用ELISA作为ExPEC4V抗体滴度的主要量度并预测功能性抗体的活性。免疫原性数据的分析表明,免疫应答的持久性可贯穿接种ExPEC4V后的三年内。现在还观察到,来自接种了ExPEC4V且具有高滴度的特定血清型调理吞噬性抗体的人血清,当被动转移到随后用O25B或O2血清型的大肠杆菌菌株进行腹膜内激发的小鼠中时,能够介导体内保护,这是通过血液、脾脏和肝脏中大肠杆菌菌落计数(CFU)的显著减少所证明的(数据未显示)。因此,ExPEC4V特异性调理吞噬性人抗体介导体内细菌杀伤,这与其他结合疫苗一致,在其他结合疫苗中,提出的保护机制是通过诱导介导细菌杀伤的调理吞噬性抗体而起作用的。

[0534] ExPEC10V总共包括十种血清型,并在年龄60岁及以上的成年人中使由ExPEC引起的血流感染的覆盖率从约50%(ExPEC4V)增加到大约70%。基于ExPEC4V的临床经验以及以上实例中论述的ExPEC10V的临床前数据,预计ExPEC10V在人类中的施用也将诱导对大肠杆菌血清型O1A、O2、O4、O6A、O8、O15、O16、O18A、O25B和O75的免疫应答。每种O抗原多糖(PS)均单独与载体蛋白进行生物缀合,该载体蛋白是来自铜绿假单胞菌的外毒素A(EPA)的遗传去毒形式,其生产已在上文中进行了描述。O4 PS是葡糖基化形式,具有表1中式(O4-Glc+)的结构。

[0535] 在年龄60至85岁、健康状况稳定的人类中进行了一项随机、观察者盲法、首次人体中1/2a期研究,以评估三种不同剂量的ExPEC10V疫苗的安全性、反应原性和免疫原性(研究10V-BAC1001)。该研究设计包括2个群组:总共824名参与者参加了该研究,群组1中有404名年龄≥60至≤85岁、健康状况稳定的参与者(100名参与者/ExPEC10V剂量),群组2中有另外大约420名年龄≥60岁、健康状况稳定、在过去5年内有UTI病史的参与者(ExPEC10V组中有280名并且安慰剂组中有140名)(最初计划在群组2中包括600名参与者,但在对方案做出了一些修改后,在研究期间这个数字减少到大约420)。

[0536] 目的和终点

[0537] 群组1-1/2a期观察者盲法期与开放标签长期随访期(N=404):

[0538]

目的	终点
主要	

[0539]

• 评估在≥60 至≤85 岁的参与者中不同剂量的 ExPEC10V 的安全性和反应原性	• 疫苗接种后 14 天（第 1 天到第 15 天）收集的诱发性局部和全身不良事件（AE） • 从施用研究疫苗直至疫苗接种后 29 天（第 1 天到第 30 天）收集的非诱发性 AE • 从施用研究疫苗直至第 181 天收集的严重不良事件（SAE）
• 评估在≥60 至≤85 岁的参与者中在第 15 天 ExPEC10V 的剂量依赖性免疫原性	• ExPEC10V 的抗体滴度，如通过基于多重电化学发光（ECL）的免疫测定和多重调理吞噬测定（MOPA）在第 15 天所测定的
次要	
• 评估在第 15 天在基于多重 ECL 的免疫测定（总抗体）血清滴度和 MOPA（功能性抗体）血清滴度之间的相关性	• ExPEC10V 的抗体滴度，如通过基于多重 ECL 的免疫测定和 MOPA 在第 15 天所测定的
• 评估在≥60 至≤85 岁的参与者中在第 30 天和第 181 天 ExPEC10V 的剂量依赖性免疫原性	• ExPEC10V 的抗体滴度，如通过基于多重 ECL 的免疫测定和 MOPA 在第 30 天和第 181 天所测定的

[0540]

目的	终点
• 评估在≥60 至≤85 岁的参与者中，在长期随访（LTFU）期间，基于第 30 天的初步分析而选择进行进一步临床开发的 ExPEC10V 剂量的安全性	• 从第 182 天直至研究结束收集的与研究疫苗或研究程序相关的 SAE
• 评估在 LTFU 期间，基于第 30 天的初步分析而选择进行进一步临床开发的 ExPEC10V 剂量的免疫原性	• ExPEC10V 的抗体滴度，如通过基于多重 ECL 的免疫测定和 MOPA 在第 1 年（第 366 天）、第 2 年（第 731 天）和第 3 年（第 1096 天）所测定的

[0541] 群组2-双盲期与双盲长期随访期(N＝420)：

[0542]

目的	终点
主要	

[0543]

目的	终点
• 评估选定剂量的 ExPEC10V 在≥60 岁、过去 5 年内有 UTI 病史的参与者中的安全性和反应原性	• 疫苗接种后 14 天（第 1 天到第 15 天）收集的诱发性局部和全身 AE • 从施用研究疫苗直至疫苗接种后 29 天（第 1 天到第 30 天）收集的非诱发性 AE • 从施用研究疫苗直至第 181 天收集的 SAE
• 评估选定剂量的 ExPEC10V 在≥60 岁、过去 5 年内有 UTI 病史的参与者中在第 30 天的免疫原性	• ExPEC10V 的抗体滴度，如通过基于多重 ECL 的免疫测定和 MOPA 在第 30 天所测定的
次要	
• 评估在≥60 岁、过去 5 年内有 UTI 病史的参与者中，在第 30 天在基于多重 ECL 的免疫测定（总抗体）血清滴度和 MOPA（功能性抗体）血清滴度之间的相关性	• ExPEC10V 的抗体滴度，如通过基于多重 ECL 的免疫测定和 MOPA 在第 30 天所测定的
• 评估选定剂量的 ExPEC10V 在≥60 岁、过去 5 年内有 UTI 病史的参与者中在第 15 天和第 181 天的免疫原性	• ExPEC10V 的抗体滴度，如通过基于多重 ECL 的免疫测定在第 15 天和第 181 天以及通过 MOPA 在第 181 天所测定的

[0544]

目的	终点
• 评估在 LTFU 期间，选定剂量的 ExPEC10V 在≥60 岁、过去 5 年内有 UTI 病史的参与者中的安全性	• 从第 182 天直至研究结束收集的与研究疫苗或研究程序相关的 SAE
• 评估在 LTFU 期间，选定剂量的 ExPEC10V 在≥60 岁、过去 5 年内有 UTI 病史的参与者中的免疫原性	• ExPEC10V 的抗体滴度，如通过基于多重 ECL 的免疫测定和 MOPA 在第 1 年（第 366 天）、第 2 年（第 731 天）（不适用于 MOPA）和第 3 年（第 1096 天）所测定的
探索性	
• 通过宏基因组分析来评估 ExPEC10V 对肠道（粪便）微生物组的影响	• 来自选定参与者子集的粪便样品的宏基因组学，以评估 ExPEC10V 对以下的影响： - 病原体（例如，艰难梭菌（*Clostridium difficile*））在肠道菌群中的流行 - ExPEC10V 血清型在肠道菌群中的流行

[0545] 整体设计

[0546] 这是一项随机、多中心、干预性研究，包括两个群组。

[0547] 对于群组1，该研究采用观察者盲法、阳性对照设计，总共包括404名年龄≥60至≤

85岁、健康状况稳定、有或没有UTI病史的成年参与者。群组1的研究设计包含三个时期:最长28天的筛选期,观察者盲法的181天随访期(在第1天进行疫苗接种),以及从第182天持续到疫苗接种后3年(第1096天)的开放标签LTFU期(图3A)。只有来自ExPEC10V选定剂量组的参与者(大约100名参与者)和来自Prevnar 13组的参与者进展到LTFU期。群组1的终点是最后一名参与者的第3年访视(第1096天)。

[0548] 对于群组2,该研究采用双盲、安慰剂对照设计,总共包括大约420名年龄≥60岁、健康状况稳定、过去5年内有UTI病史的成年参与者。在完成1/2a期初步分析和来自群组1的ExPEC10V剂量选择后,开始进行登记。群组2的研究设计包含三个时期:最长28天的筛选期,双盲181天随访期(在第1天进行疫苗接种),以及从第182天持续到疫苗接种后3年(第1096天)的双盲LTFU期(图3B)。群组2中的所有参与者均进展到LTFU期。研究终点是群组2中最后一名参与者的第3年访视(第1096天)。

[0549] 群组1:1期

[0550] 在群组1的1期中,共有84名参与者按照逐步剂量递增程序以交错方法进行了登记,并在从一个步骤进入下一个步骤之前适当地进行了安全性评估。该研究委托内部数据审查委员会(Data Review Committee,DRC)审查这84名1期参与者的体格检查数据(基线和目标)、基线人口统计数据和疫苗接种后14天的安全性数据(包括诱发性局部和全身AE、非诱发性AE、SAE、临床实验室数据和生命体征)。在这个研究期中,参与者被纳入并随机分到六个步骤中:

[0551] 步骤1:四名前哨参与者被纳入并随机分配;ExPEC10V低剂量组中有两名参与者(表11),ExPEC4V组和Prevnar 13组中各有一名参与者。

[0552] 步骤2:二十四名参与者被纳入并随机分配;ExPEC10V低剂量组中有18名参与者(表11),ExPEC4V组和Prevnar 13组中各有三名参与者。

[0553] 步骤3:四名前哨参与者被纳入并随机分配;ExPEC10V中等剂量组中有两名参与者(表11),ExPEC4V组和Prevnar 13组中各有一名参与者。

[0554] 步骤4:二十四名参与者被纳入并随机分配;ExPEC10V中等剂量组中有18名参与者(表11),ExPEC4V组和Prevnar 13组中各有三名参与者。

[0555] 步骤5:四名前哨参与者被纳入并随机分配;ExPEC10V高剂量组中有两名参与者(表11),ExPEC4V组和Prevnar 13组中各有一名参与者。

[0556] 步骤6:二十四名参与者被纳入并随机分配;ExPEC10V高剂量组中有18名参与者(表11),ExPEC4V组和Prevnar 13组中各有三名参与者。

[0557] 根据指定的研究疫苗接种组,所有参与者均在第1天接受ExPEC10V(3个剂量中的1个剂量)、ExPEC4V或Prevnar 13的单次肌内(IM)注射。在疫苗接种24小时后,通过电话联系步骤1、3和5中的每个步骤的四名前哨参与者,以收集安全性信息。主要研究者(PI)、研究负责医师(SRP)和主办者医疗负责人(SML)审查了每组中四名前哨参与者的盲法疫苗接种24小时后的安全性数据。在第2天前哨安全性评估完成之前,停止随机分配另外的参与者进行下一步骤。

[0558] 在没有任何临床显著发现的情况下,另外的24名参与者(对于步骤2、4和6)被纳入并随机分配到三个研究疫苗接种组之一(表11),以在第1天接受ExPEC10V(3个剂量中的1个剂量)、ExPEC4V或Prevnar 13的单次IM注射。

[0559] 在以每个剂量水平(步骤2中的低剂量、步骤4中的中等剂量和步骤6中的高剂量)对另外的24名参与者进行疫苗接种后,在进入下一个剂量水平或2a期之前,由DRC审查每个剂量水平下的所有28(4+24)名参与者的疫苗接种后14天的安全性数据。

[0560] 群组1:2a期

[0561] 基于如通过DRC在审查最初84名参与者的疫苗接种后14天的安全性数据后确定的可接受的安全性和反应原性(在没有任何安全问题或任何符合具体研究暂停规则的事件的情况下),来自群组1的其余320名参与者被随机分配并在研究的2a期给药。这些另外的320名参与者被纳入并以2:2:2:1:1的比率平行随机分配到五个研究疫苗接种组之一,以在第1天接受ExPEC10V(3个剂量中的1个剂量)、ExPEC4V或Prevnar 13的单次IM注射(表11)。除了对最初的84名参与者进行为期14天的安全性审查之外,DRC还在研究过程中评估群组1的安全性数据,并审查符合具体研究疫苗接种暂停规则的任何事件或任何其他可能发生的安全问题。

[0562] 对于群组1,初步分析发生在所有参与者完成第30天访视(访视4)或提前中止时。最终分析发生在所有参与者完成第181天访视或提前中止时。对于进入开放标签长期随访(LTFU)期(ExPEC10V选定剂量组和Prevnar 13组)的参与者,年度随访分析包括直至疫苗接种后第1年(第366天)、第2年(第731天)和第3年(第1096天)的访视时收集的安全性和免疫原性数据(基于多重ECL的免疫测定和MOPA)。

[0563] 群组2

[0564] 在群组2中,在年龄≥60岁、健康状况稳定、过去5年内有UTI病史的参与者中评估所选剂量的ExPEC10V(根据群组1的初步分析结果,选择高剂量)的安全性、反应原性和免疫原性。对于群组2,该研究采用双盲、安慰剂对照设计,总共大约420名参与者被纳入并以2:1的比率随机平行分组(ExPEC10V组有大约280名参与者,安慰剂组有大约140名参与者)。

[0565] 根据指定的研究疫苗接种组,所有参与者均在第1天接受选定剂量的ExPEC10V或安慰剂的单次IM注射(表12)。

[0566] 对于群组2,初步分析包括安全性和免疫原性数据,并发生在所有参与者完成第30天访视(访视4)或提前中止时。最终分析发生在所有参与者完成第181天访视或提前中止时。对于所有参与者,年度随访分析包括直至疫苗接种后第1年(第366天)、第2年(第731天)(不适用于MOPA)和第3年(第1096天)的访视时收集的安全性和免疫原性数据(基于多重ECL的免疫测定和MOPA)。

[0567] 在选定的参与者子集中进行粪便样品分析,以使用宏基因组学评估ExPEC10V对肠道菌群中病原体(例如,艰难梭菌)和ExPEC10V血清型的流行的影响。

[0568] 参与者数量

[0569] 共有大约824名参与者纳入了该研究;群组1中有404名参与者,群组2中有大约420名参与者。

[0570] 干预组:关于干预的描述

[0571] ExPEC10V:在磷酸盐缓冲溶液中的大肠杆菌生物缀合物疫苗,其含有分别与EPA载体蛋白生物缀合的ExPEC血清型O1A、O2、O4、O6A、O8、O15、O16、O18A、O25B和O75的O抗原PS。在第1天单次0.5mL IM(三角肌)注射三种剂量的ExPEC10V中的一种。

[0572] ExPEC4V:在生理盐水缓冲溶液中的大肠杆菌生物缀合物疫苗,其含有分别与EPA

载体蛋白生物缀合的ExPEC血清型O1A、O2、O6A、O25B的O抗原PS(4:4:4:8μg PS/ExPEC血清型)。在第1天单次0.5mL IM(三角肌)注射ExPEC4V。

[0573] Prevnar 13:分别与无毒白喉CRM197蛋白连接的肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F和23F的荚膜抗原的糖的无菌悬浮液。在第1天单次0.5mL IM(三角肌)注射,以单剂量预填充注射器提供。

[0574] 安慰剂:生理盐水。在第1天单次0.5mL IM(三角肌)注射安慰剂。

[0575] 表9中描述了ExPEC研究干预材料。

[0576] 表9.BAC1001MV ExPEC研究疫苗

[0577]

研究臂	O1A (μg)	O2 (μg)	O4 (μg)	O6A (μg)	O8 (μg)	O15 (μg)	O16 (μg)	O18A (μg)	O25B (μg)	O75 (μg)	EPA (μg)	PS(总计) (μg)
低剂量ExPEC10V	4	4	4	4	4	4	4	4	8	4	160	44
中等剂量ExPEC10V	8	4	4	8	4	4	4	4	16	4	221	60
高剂量ExPEC10V	8	8	8	8	8	8	8	8	16	8	320	88
ExPEC4V	4	4	-	4	-	-	-	-	8	-	72	20

[0578] EPA=源自铜绿假单胞菌的遗传去毒形式的外毒素A;PS=多糖

[0579] ExPEC4V由分别与EPA载体蛋白生物缀合的ExPEC血清型O1A、O2、O6A和O25B的O抗原多糖(PS)组成。

[0580] ExPEC10V由分别与EPA载体蛋白生物缀合的ExPEC血清型O1A、O2、O4、O6A、O8、O15、O16、O18A、O25B和O75的O抗原多糖(PS)组成。

[0581] 剂量仅基于PS。EPA(μg)是测量值。

[0582] ExPEC10V由10种单价原料药(DS)组成。对于该临床研究,生产了2种不同浓度(中等和高)的药物产品(DP)(表10)。第三个(低)浓度是在临床上通过用稀释缓冲液1:1稀释高浓度获得的,该稀释缓冲液与配制品缓冲液相同。每种DP均在pH 7.0的磷酸钠/钾缓冲液(0.02%[w/w]聚山梨醇酯80、5%[w/w]山梨糖醇、10mM甲硫氨酸)中配制。

[0583] 表10:用于1/2a期临床研究的ExPEC10V疫苗的组成

[0584]

成分	量（μg/mL）[a]		
活性成分[a]	低浓度[b]	中等浓度	高浓度
O-抗原多糖			
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
载体蛋白			
EPA	320	441	640

赋形剂	
KH_2PO_4	6.19 mM
Na_2HPO_4	3.81 mM
山梨糖醇	5%（w/w）
甲硫氨酸	10 mM
聚山梨醇酯 80	0.02%（w/w）

[0585] EPA＝遗传去毒的铜绿假单胞菌外毒素A,用作载体蛋白

[0586] [a]活性成分是由PS抗原和载体蛋白(EPA)组成的生物合成缀合物;剂量仅基于PS部分计算。

[0587] [b]“低浓度”是在临床上用稀释缓冲液1:1稀释“高浓度”获得的安全性评估

[0588] 关键的安全性评估包括诱发性局部和全身AE、非诱发性AE、SAE、体格检查、生命体征测量和临床实验室测试。

[0589] 免疫原性评估

[0590] 收集的血清的关键免疫原性评估包括评估疫苗引发的ExPEC10V和ExPEC4V特定血清型总IgG抗体水平(如通过基于多重ECL的免疫测定所测量的)、以及ExPEC10V和ExPEC4V特定血清型功能性抗体(如通过多重形式的调理吞噬杀伤测定(OPKA),即MOPA所测量的)。不进行Prevnar 13引发的肺炎球菌抗体滴度的免疫原性评估。

[0591] 通过基于多重电化学发光(ECL)的免疫测定来测量ExPEC10V诱导的血清抗体水平。该测定将高结合性碳电极结合在多点96孔格式微孔板中,该微孔板涂覆有不同的大肠杆菌O-LPS抗原或载体蛋白EPA。使用SULFO标签标记的第二抗体(抗人IgG)检测血清样品中存在的抗原特异性抗体的水平。SULFO标签在存在电刺激的情况下以与结合的IgG抗体的量成比例增加的强度发光。该测定符合国际协调会议(International Conference on

Harmonisation,ICH)的建议。

[0592] 通过多重调理吞噬测定(MOPA)来测量ExPEC10V诱导的功能性抗体的水平。简言之,将热灭活的血清样品连续稀释并与对不同类型的抗生素具有特异性抗性的不同大肠杆菌菌株一起孵育。这之后,将人补体和吞噬细胞(HL60)添加到反应中,并在第二个孵育期后,将反应混合物的等分试样转移到不同的PVDF亲水膜过滤板中,这些过滤板含有补充有特定抗生素、选择性地允许对该特定抗生素具有抗性的菌株的生长的培养基。过夜生长后,计算菌落形成单位(CFU)以确定存活细菌的数量。该测定符合ICH建议。

[0593] 对于如通过基于多重ECL的免疫测定和MOPA而测量的ExPEC10V血清型抗体,以及对于仅通过基于多重ECL的免疫测定而测量的EPA,研究疫苗接种组评估并列出了针对所有免疫原性时间点的以下免疫原性测量值:

[0594] -从第1天(疫苗接种前)血清抗体滴度增加≥2倍和≥4倍的参与者比例

[0595] -几何平均滴度(GMT)

[0596] -GMR:自基线的倍数变化,根据基线后/基线值计算。

[0597] 对于LTFU期,为每种血清型提供了免疫原性的描述性总结。

[0598] 晚期的剂量选择考虑了对群组1进行初步分析时(第30天的结果)可用的全部迹象。

[0599] 表11:群组1:疫苗接种时间表

[0600]

		1 期						2a 期	总计
		步骤 1	步骤 2	步骤 3	步骤 4	步骤 5	步骤 6	步骤 7	
研究疫苗接种组	在第 1 天进行疫苗接种	前哨参与者（低剂量）	另外的参与者（低剂量）	前哨参与者（中等剂量）	另外的参与者（中等剂量）	前哨参与者（高剂量）	另外的参与者（高剂量）	另外的 2a 期参与者	
G1	低剂量 ExPEC10V*	2	18					80	100
G2	中等剂量 ExPEC10V*			2	18			80	100
G3	高剂量 ExPEC10V*					2	18	80	100
G4	ExPEC4V**	1	3	1	3	1	3	40	52
G5	Prevnar 13***	1	3	1	3	1	3	40	52
总计		**4**	**24**	**4**	**24**	**4**	**24**	**320**	**404**

[0601] *ExPEC10V由分别与载体蛋白生物缀合的ExPEC血清型O1A、O2、O4、O6A、O8、O15、O16、O18A、O25B和O75的O抗原多糖(PS)组成,该载体蛋白是源自铜绿假单胞菌的遗传去毒

形式的外毒素A(EPA)。

[0602] **ExPEC4V由分别与载体蛋白生物缀合的ExPEC血清型O1A、O2、O6A和O25B的O抗原多糖(PS)组成,该载体蛋白是源自铜绿假单胞菌的遗传去毒形式的外毒素A(EPA)。

[0603] ***Prevnar 13,肺炎球菌13价结合疫苗(白喉CRM197蛋白)是分别与无毒白喉CRM197蛋白连接的肺炎链球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F和23F的荚膜抗原的糖的无菌悬浮液。

[0604] 表12:群组2:疫苗接种时间表

[0605]

研究疫苗接种组	在第 1 天进行疫苗接种	总计
G6	ExPEC10V[a]	280
G7	安慰剂	140
总计		**420**

[0606] [a] ExPEC10V由分别与载体蛋白生物缀合的ExPEC血清型O1A、O2、O4、O6A、O8、O15、O16、O18A、O25B和O75的O抗原多糖(PS)组成,该载体蛋白是源自铜绿假单胞菌的遗传去毒形式的外毒素A(EPA)。

[0607] 纳入该研究的群组2的参与者的随机化比率为2:1(ExPEC10V:安慰剂)。群组2中使用的ExPEC10V剂量基于群组1的初步分析(第30天)结果,并且其是群组1中使用的高剂量。

[0608] 状态

[0609] 上述研究的群组1的登记和疫苗接种已完成。未发现重大安全问题,并且ExPEC10V疫苗具有可接受的安全性。

[0610] 对群组1临床样品进行了免疫原性分析,结果描述如下。

[0611] 使用高剂量的ExPEC10V启动群组2疫苗接种,并且这部分研究正在进行中。

[0612] 群组1安全性和免疫原性结果

[0613] 这里呈现的这些结果适用于BAC1001临床研究(群组1)。完整分析集中有416名参与者。每名参与者被随机分配到ExPEC10V的3种单次肌内施用剂量中的1种,或随机分配到ExPEC4V或Prevnar的2种阳性对照剂量中的1种;104名接种了低剂量ExPEC10V,102名接种了中等剂量ExPEC10V,104名接种了高剂量ExPEC10V,52名接种了ExPEC4V(4:4:4:8μg O1A、O2、O6A和O25B多糖/剂量),54名接种了Prevnar。共413名参与者完成了第30天的访视。有392(94.2%)名参与者包括在第15天符合方案免疫原性分析中。

[0614] 安全性

[0615] 总体而言,所有ExPEC10V剂量均耐受性良好。高剂量有反应原性增加的趋势,除了红斑、肿胀和恶心外,ExPEC10V高剂量反应原性低于Prevnar或与其相当。与Prevnar相比,在ExPEC10V组中观察到更多的迟发性局部反应原性,在>90%的经历这些局部事件的参与者中,注射部位红斑和肿胀被报告为迟发事件。然而,与在老年人群中使用的其他许可疫苗相比,ExPEC10V的反应原性概况是可接受的。

[0616] 免疫原性

[0617] 在基线(疫苗接种前第1天)和疫苗接种后第15天,使用测量特定血清型血清抗体

(总免疫球蛋白G[IgG])水平的基于多重电化学发光(ECL)的免疫测定以及测量抗体介导的细菌调理吞噬杀伤的多重调理吞噬杀伤测定(MOPA)来评估疫苗诱导的免疫应答。

[0618] 抗原特异性血清抗体的水平(ECL)

[0619] 对于所有测试的ExPEC10V剂量和所有疫苗相关的血清型,O抗原特异性血清抗体(总IgG)的水平在疫苗接种后第15天显著增加。观察到,至少80%的接受高剂量ExPEC10V疫苗的受试者在疫苗接种后第15天显示出针对10种血清型中的8种(包括O25B、O6A、O2、O1A、O4、O15、O16和O18A)的O抗原特异性抗体滴度增加两倍或更多。对于ExPEC10V中等剂量组,至少80%的受试者在疫苗接种后第15天显示出针对10种血清型中的5种(包括O25B、O2、O1A、O4和O15)的O抗原特异性抗体滴度增加两倍或更多;并且对于ExPEC10V低剂量组,10种血清型中的4种(包括O25B、O2、O15和O16)也是这种情况(图4,表13)。在接受Prevnar或ExPEC4V(对于非ExPEC4V血清型)的受试者组中观察到从第1天到第15天GMT的微小变化(图4,表13)。

[0620] 对于ECL测定,所有受试者均被分析并包括在所有免疫原性子集中。根据方案排除标准,将严重违规的受试者排除在符合方案分析之外。将基于ECL的免疫测定中的几何平均滴度(GMT)、GMT FI(几何平均滴度增加倍数)以及自基线至少2倍和4倍增加的参与者百分比总结在下表13中。

[0621] 表13.BAC1001群组1的ECL数据

[0622] 血清型O1A

[0623]

终点(95% CI)	时间点	ExPEC10V 低剂量	ExPEC10V 中等剂量	ExPEC10V 高剂量	ExPEC4V	Prevnar
GMT	第 1 天	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	第 15 天	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)
GM FI[1]	第 15 天对比第 1 天	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 倍[2]	第 15 天对比第 1 天	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 倍[2]	第 15 天对比第 1 天	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%)

[0624]

[0625] 血清型O2

[0626]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V 低剂量	ExPEC10V 中等剂量	ExPEC10V 高剂量	ExPEC4V	Prevnar
GMT	第 1 天	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	第 15 天	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）
GM FI[1]	第 15 天对比第 1 天	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 倍[2]	第 15 天对比第 1 天	93.0%（86.11%；97.14%）	93.8%（86.89%；97.67%）	99.0%（94.45%；99.97%）	90.0%（78.19%；96.67%）	0.0%（0.00%；7.40%）
%4 倍[2]	第 15 天对比第 1 天	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%）

[0627] 血清型04

[0628]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V 低剂量	ExPEC10V 中等剂量	ExPEC10V 高剂量	ExPEC4V	Prevnar
GMT	第 1 天	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	第 15 天	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）
GM FI[1]	第 15 天对比第 1 天	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 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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%）

[0629] 血清型06A

[0630]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V 低剂量	ExPEC10V 中等剂量	ExPEC10V 高剂量	ExPEC4V	Prevnar
GMT	第 1 天	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	第 15 天	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）
GM FI[1]	第 15 天对比第 1 天	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 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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%）

[0631]

% 4 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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%）

[0632] 血清型08

[0633]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V 低剂量	ExPEC10V 中等剂量	ExPEC10V 高剂量	ExPEC4V	Prevnar
GMT	第 1 天	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	第 15 天	5052165.0（4405019.0；5794383.9）	5600945.1（4902756.3；6398561.1）	6178848.4（5511236.6；6927332.3）	1709293.2（1392733.5；2097805.0）	1374269.5（1075143.6；1756617.9）
GM FI[1]	第 15 天对比第 1 天	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 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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%）

[0634] 血清型015

[0635]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V 低剂量	ExPEC10V 中等剂量	ExPEC10V 高剂量	ExPEC4V	Prevnar
GMT	第 1 天	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	第 15 天	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）

[0636]

GM FI[1]	第 15 天对比第 1 天	5.93（4.945；7.100）	5.37（4.496；6.408）	6.24（5.276；7.391）	1.01（0.973；1.055）	1.48（1.227；1.797）
%2 倍[2]	第 15 天对比第 1 天	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 倍[2]	第 15 天对比第 1 天	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%）

[0637] 血清型016

[0638]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V 低剂量	ExPEC10V 中等剂量	ExPEC10V 高剂量	ExPEC4V	Prevnar
GMT	第 1 天	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	第 15 天	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）
GM FI[1]	第 15 天对比第 1 天	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 倍[2]	第 15 天对比第 1 天	86.0%（77.63%；92.13%）	77.1%（67.39%；85.05%）	87.8%（79.59%；93.51%）	2.0%（0.05%；10.65%）	2.1%（0.05%；11.07%）
%4 倍[2]	第 15 天对比第 1 天	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%）

[0639] 血清型018A

[0640]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V 低剂量	ExPEC10V 中等剂量	ExPEC10V 高剂量	ExPEC4V	Prevnar
GMT	第 1 天	934049.6	963410.7	923828.6	948044.5	979084.2

[0641]

		(819694.2; 1064358.5)	(838467.8; 1106971.8)	(816988.8; 1044640.1)	(795966.9; 1129178.2)	(788765.0; 1215325.0)
GMT	第 15 天	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)
GM FI[1]	第 15 天对比第 1 天	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 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	49.0% (38.86%; 59.20%)	41.7% (31.68%; 52.18%)	61.2% (50.85%; 70.90%)	0.0% (0.00%; 7.11%)	2.1% (0.05%; 11.07%)

[0642] 血清型025B

[0643]

终点 (95% CI)	时间点	ExPEC10V 低剂量	ExPEC10V 中等剂量	ExPEC10V 高剂量	ExPEC4V	Prevnar
GMT	第 1 天	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	第 15 天	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)
GM FI[1]	第 15 天对比第 1 天	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 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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%)

[0644] 血清型075

[0645]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V 低剂量	ExPEC10V 中等剂量	ExPEC10V 高剂量	ExPEC4V	Prevnar
GMT	第 1 天	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	第 15 天	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）
GM FI[1]	第 15 天对比第 1 天	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 倍[2]	第 15 天对比第 1 天	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 倍[2]	第 15 天对比第 1 天	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%）

[0646] 群组1:初步分析的输出

[0647] [1]＝自基线(第1天)FI的GM

[0648] [2]＝自基线(第1天)成倍增加的参与者的百分比

[0649] CI＝置信区间;GM＝几何平均值,GMT＝几何平均滴度;FI＝增加倍数GMT和GM FI的95% CI均基于t分布

[0650] 使用Clopper-Pearson方法获得具有2倍和4倍增加的参与者百分比的95%CI。

[0651] 从数据(图4)可以看出,与以相同量施用的其他抗原相比,针对O75多糖抗原的总IgG应答较低(例如,对比第1天,在第15天至少增加两倍的受试者百分比较低),这是一个令人惊讶的结果。数据还显示,组合物中O75多糖抗原量的增加(即,以高剂量施用8μg对比以低和中等剂量施用4μg)增加了针对O75多糖抗原的诱导的免疫应答。

[0652] 血清抗体功能性(MOPA)

[0653] 部分数据包括在群组1MOPA分析中。表14显示了第15天在MOPAGMT分析中包括的参与者数量。尽管部分数据用于评估由ExPEC10V诱导的抗体应答的功能性,但在完整数据集可用时,分析的结论并没有改变。

[0654] 表14.MOPAGMT分析中包括的参与者数量

[0655]

血清型	低剂量	中等剂量	高剂量	ExPEC4V	Prevnar
预期数量	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%）
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%）

[0656] 通过MOPA测量的调理吞噬性抗体的水平与通过基于ECL的免疫测定测量的O抗原特异性抗体(总IgG)的水平基本一致。在所有测试的剂量组中,针对十种ExPEC10V血清型中的九种在第15天观察到功能性抗体水平增加(图5)。

[0657] 与其他ExPEC10V血清型相比,对于血清型O8,合格的MOPA测定无法显示在第1天进行ExPEC10V疫苗接种后在第15天疫苗介导的功能性抗体增加(图5),尽管观察到血清型O8总IgG滴度增加(图4)。启动研究以区分该合格的测定是否无法检测功能性O8抗体。随后使用改进的MOPA测定以及第1天和第15天血清进行的实验成功地显示第15天功能性抗体增加了2倍或更多(数据未显示),这表明ExPEC10V疫苗实际上也诱导了血清型O8的功能性抗体。对于临床开发,改进后的O8 MOPA将需要重新确定该测定是否合格以及重新测试临床样品,这需要很长时间,因此决定最初进行不包含O8多糖抗原的疫苗组合物的开发。然而,从随后的实验中可以清楚地看出,10价ExPEC疫苗组合物中的O8生物缀合物确实诱导了针对大肠杆菌O8血清型的功能性抗体,因此这种生物缀合物很可能成功地添加到以下实例中所述的九价疫苗组合物中。

[0658] 对于血清型O2,观察到最高水平的调理吞噬性抗体;95%的接种高剂量该疫苗的受试者在疫苗接种后第15天显示出抗O2调理抗体滴度增加2倍或更多。排除O8血清型,对于其,如上文所论述地检测到功能性抗体水平有限;对于血清型O75,调理吞噬性抗体水平最低;36%的接种高剂量该疫苗的受试者在疫苗接种后第15天显示出抗O75调理抗体滴度增加2倍或更多。因此,O75血清型的MOPA数据与上述该血清型的ECL数据一致,这证实与组合物中相同浓度的几种其他缀合物(例如,大肠杆菌O6、O1或O2缀合物)相比,大肠杆菌O75抗原多糖的缀合物的免疫原性相对较低。此外,在接受Prevnar或ExPEC4V(对于非ExPEC4V血清型)的受试者组中观察到从第1天到第15天GMT的微小变化(图5),这符合对不存在于各个疫苗组合物中的血清型的预期。

[0659] 对于10种血清型中的每一种,将MOPA中的几何平均滴度(GMT)、几何平均增加倍数(GMR FI)以及自基线至少2倍和4倍增加的参与者百分比总结在表15中。

[0660] 表15.BAC1001群组1的MOPA数据

[0661] 血清型O1A

[0662]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V 低剂量	ExPEC10V 中等剂量	ExPEC10V 高剂量	ExPEC4V	Prevnar
GMT	第 1 天	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	第 15 天	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）
GM FI[1]	第 15 天对比第 1 天	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 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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%）

[0663]

[0664] 血清型02

[0665]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V 低剂量	ExPEC10V 中等剂量	ExPEC10V 高剂量	ExPEC4V	Prevnar
GMT	第 1 天	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	第 15 天	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）
GM FI[1]	第 15 天对比第 1 天	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 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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%）

[0666] 血清型04

[0667]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V 低剂量	ExPEC10V 中等剂量	ExPEC10V 高剂量	ExPEC4V	Prevnar
GMT	第 1 天	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	第 15 天	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）

[0668]

GM FI[1]	第 15 天对比第 1 天	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 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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%）

[0669] 血清型06A

[0670]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V 低剂量	ExPEC10V 中等剂量	ExPEC10V 高剂量	ExPEC4V	Prevnar
GMT	第 1 天	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	第 15 天	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）
GM FI[1]	第 15 天对比第 1 天	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 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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%）

[0671] 血清型08

[0672]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V 低剂量	ExPEC10V 中等剂量	ExPEC10V 高剂量	ExPEC4V	Prevnar
GMT	第 1 天	967.6（764.2；	699.2（538.5；	896.3（714.1；	710.0	891.8

[0673]

		1225.1）	907.9）	1125.1）	（535.1；941.9）	（684.4；1162.1）
GMT	第 15 天	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）
GM FI[1]	第 15 天对比第 1 天	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 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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%）

[0674] 血清型015

[0675]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V 低剂量	ExPEC10V 中等剂量	ExPEC10V 高剂量	ExPEC4V	Prevnar
GMT	第 1 天	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	第 15 天	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）
GM FI[1]	第 15 天对比第 1 天	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 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	57.3%（45.91%；68.18%）	69.3%（58.58%；78.71%）	70.3%（59.84%；79.45%）	13.0%（4.94%；26.26%）	25.6%（13.52%；41.17%）
%4 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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%）

[0676] 血清型016

[0677]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V 低剂量	ExPEC10V 中等剂量	ExPEC10V 高剂量	ExPEC4V	Prevnar
GMT	第 1 天	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	第 15 天	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）
GM FI[1]	第 15 天对比第 1 天	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 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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%）

[0678] 血清型018A

[0679]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V 低剂量	ExPEC10V 中等剂量	ExPEC10V 高剂量	ExPEC4V	Prevnar
GMT	第 1 天	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	第 15 天	251.0（180.9；348.1）	248.8（184.9；334.7）	310.0（221.7；433.4）	68.3（45.2；103.4）	62.4（40.1；97.1）
GM FI[1]	第 15 天对比第 1 天	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 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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%）

[0680]

% 4 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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%）

[0681] 血清型025B

[0682]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V 低剂量	ExPEC10V 中等剂量	ExPEC10V 高剂量	ExPEC4V	Prevnar
GMT	第 1 天	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	第 15 天	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）
GM FI[1]	第 15 天对比第 1 天	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 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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%）

[0683] 血清型075

[0684]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V 低剂量	ExPEC10V 中等剂量	ExPEC10V 高剂量	ExPEC4V	Prevnar
GMT	第 1 天	<LLOQ（<LLOQ；39.3）	<LLOQ（<LLOQ；<LLOQ）	<LLOQ（<LLOQ；<LLOQ）	<LLOQ（<LLOQ；37.2）	<LLOQ（<LLOQ；40.1）
GMT	第 15 天	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）

[0685]

GM FI[1]	第 15 天对比第 1 天	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 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	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%）

[0686] 群组1:初步分析的输出

[0687] [1]＝自基线(第1天)FI的GM

[0688] [2]＝自基线(第1天)成倍增加的参与者的百分比

[0689] CI＝置信区间;GM＝几何平均值,GMT＝几何平均滴度;FI＝增加倍数

[0690] GMT和GM FI的95% CI均基于t分布

[0691] 使用Clopper-Pearson方法获得具有2倍和4倍增加的参与者百分比的95%CI。

[0692] 剂量选择

[0693] 考虑到两个分析集(PPI和FAS)和两种测定(ECL和MOPA),基于每个剂量组从基线到第15天的log10增加倍数的平均值的免疫原性剂量选择算法确定了该试验的群组2的ExPEC10V高剂量。

[0694] 对于血清型O2、O4、O15、O16和O18A,在这两种测定中,与另外2种ExPEC10V剂量相比,高剂量组具有更高的GMT、GMR以及第15天2倍和4倍增加的参与者百分比。对于血清型O25B,在3个ExPEC10V剂量组中,中等剂量组一般具有更高的GMT、GMR以及2倍和4倍增加的参与者百分比;对于这种血清型,中等和高ExPEC10V剂量组两者的O抗原剂量是相同的(16μg)。对于血清型O1A和O6A两者,结果在高和中等剂量之间混合。在血清型O75中,存在针对ExPEC10V剂量的可测量的功能性抗体应答。如上所论述,在针对血清型O8的合格测定中未检测到可测量的功能性抗体应答。在非ExPEC4V血清型中,在2个活性物对照中观察到较低的功能性抗体应答;该抗体应答来自预先存在的抗体,而不是疫苗诱导的应答。基于这些结果,为BAC1001临床试验的群组2选择了高剂量的ExPEC10V。

[0695] 结论

[0696] ExPEC10V疫苗诱导了强烈的抗体应答,与基线滴度(第1天)相比,在疫苗接种后第15天观察到针对所有疫苗相关血清型的O抗原特异性血清抗体增加。在合格的MOPA中,针对所有疫苗相关血清型(血清型O8除外),检测到ExPEC10V诱导的介导大肠杆菌调理吞噬杀伤作用的功能性抗体。对于血清型O8,使用改进的MOPA进行的后续研究测量到了功能性抗体应答。值得注意的是,4μg和8μg剂量的O75的应答比相同剂量的其他血清型更弱,这是该研究的一个令人惊讶且不可预测的发现。为了提高针对由多价糖缀合物组合物产生的大肠杆菌O75血清型的免疫应答,在一方面,本发明增加了血清型O75抗原多糖的剂量,例如增加至一些其他血清型的剂量的约1.2至8倍,例如增加至一些其他血清型(如O6或O1)的剂量约1.5至4倍,例如约1.5至2.5倍,例如约2倍,例如增加至约16μg,该剂量高于例如三个最相关和流行的血清型O1A、O2和O6A的剂量,并且与血清型O25B抗原多糖的剂量相似。值得注意的是,在早期的实验中(参见例如该实例中的上述内容以及实例5和6,即在获得本文披露的ExPEC10V疫苗的临床数据之前),O75抗原多糖的剂量至多与O1A、O2和O6A抗原多糖的剂量一样高,或实际上在某些测试组中甚至比O1A和O6A抗原多糖低两倍,甚至比O25B抗原多糖低2至4倍。相比之下,在本发明的某些方面,与O1、O2和/或O6的剂量相比,O75的剂量实际上增加了。

[0697] 群组2安全性和免疫原性结果

[0698] 在该研究的群组2中,总共大约420名年龄≥60岁、健康状况稳定、过去5年内有UTI病史的参与者被纳入并以2:1的比率随机平行分组(对其进行完整结果分析的子集包括ExPEC10V(高剂量)组中的278名参与者和安慰剂组中的138名参与者)。

[0699] 安全性

[0700] 总体而言,ExPEC10V疫苗耐受性良好。反应原性概况通常与群组1中使用中等和高剂量ExPEC10V观察到的结果相当。最常见的局部诱发性AE是疼痛/压痛,最常报告的全身性AE是肌痛、头痛和疲劳。注射部位红斑和肿胀是最常见的迟发性事件(到首次发病的时间>疫苗接种后5天)。与在老年人群中使用的其他许可疫苗相比,ExPEC10V的反应原性概况是可接受的。

[0701] 免疫原性

[0702] 在基线(疫苗接种前第1天)和疫苗接种后第15天和第30天,使用测量特定血清型血清抗体(总IgG)水平的基于多重ECL的免疫测定来评估疫苗诱导的抗体应答。

[0703] 抗原特异性血清抗体水平(ECL,第1天、第15天和第30天)

[0704] 基于GMT、GMT FI以及从第1天到第15天滴度自基线至少2倍增加的参与者百分比的增加值,ExPEC10V疫苗对所有血清型都具有免疫原性。从第15天到第30天,所有这三个量度的变化都很小。

[0705] 观察到针对血清型O2、O4、O15和O16的抗体应答最高,至少80%的接种了ExPEC10V的参与者在疫苗接种后第15天和第30天显示抗体应答增加两倍或更多。对于血清型O1A、O6A和O25B,至少70%的参与者显示抗体应答增加两倍或更多,并且对于血清型O8和O18A,至少60%的参与者显示抗体应答增加两倍或更多。观察到针对血清型O75的抗体应答较低,然而在至少50%的参与者中观察到抗原特异性抗体应答增加了两倍或更多。在接受安慰剂的受试者组中观察到从第1天到第15天以及到第30天GMT的微小变化(表16)。

[0706] 将基于ECL的免疫测定中的几何平均滴度(GMT)、GMT FI(几何平均滴度增加倍数)以及自基线至少2倍和4倍增加的参与者百分比总结在下表16中。

[0707] 表16.BAC1001群组2的ECL数据(第1天、第15天和第30天)血清型O1A

[0708]

终点 (95% CI)	时间点	ExPEC10V	安慰剂
GMT	第 1 天	1466300.6（1309861.4; 1641423.6）	1714154.2（1463104.9; 2008280.3）
GMT	第 15 天	6474621.3（5996773.2; 6990546.4）	1696032.9（1445852.1; 1989503.3）
GMT	第 30 天	6363928.5（5918207.5; 6843218.4）	1773323.4（1515713.5; 2074716.7）

[0709]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V	安慰剂
GM FI[1]	第 15 天对比第 1 天	4.38（3.908；4.902）	0.99（0.966；1.023）
GM FI[1]	第 30 天对比第 1 天	4.35（3.915；4.843）	1.02（0.954；1.094）
% 2 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	75.9%（70.13%；81.03%）	0.0%（0.00%；2.84%）
% 2 倍 [2]	第 30 天对比第 1 天	77.6%（72.04%；82.46%）	1.5%（0.19%；5.45%）
% 4 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	54.5%（48.19%；60.79%）	0.0%（0.00%；2.84%）
% 4 倍 [2]	第 30 天对比第 1 天	54.4%（48.14%；60.50%）	0.8%（0.02%；4.21%）

[0710] 血清型02

[0711]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V	安慰剂
GMT	第 1 天	739313.9（659799.6；828410.8）	768325.6（648274.3；910608.6）
GMT	第 15 天	6001149.0（5522390.3；6521413.2）	759366.1（637561.8；904440.8）
GMT	第 30 天	5995886.9（5530975.6；6499876.9）	747487.9（627602.8；890273.4）
GM FI[1]	第 15 天对比第 1 天	8.02（7.105；9.043）	1.00（0.933；1.061）
GM FI[1]	第 30 天对比第 1 天	8.16（7.244；9.182）	0.98（0.910；1.054）
% 2 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	88.9%（84.40%；92.52%）	0.8%（0.02%；4.28%）

[0712]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V	安慰剂
%2倍[2]	第30天对比第1天	89.4%（84.98%；92.81%）	1.5%（0.19%；5.45%）
%4倍[2]	第15天对比第1天	78.7%（73.09%；83.54%）	0.8%（0.02%；4.28%）
%4倍[2]	第30天对比第1天	77.6%（72.04%；82.46%）	1.5%（0.19%；5.45%）

[0713] 血清型O4

[0714]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V	安慰剂
GMT	第1天	678578.0（616370.1；747064.4）	744119.6(646038.0;857092.0)
GMT	第15天	3746755.5（3336959.5；4206876.5）	760274.2（652833.0；885397.7）
GMT	第30天	3570627.3（3188275.4；3998832.6）	806768.3（691960.6；940624.6）
GM FI[1]	第15天对比第1天	5.60（4.965；6.309）	1.03（0.992；1.067）
GM FI[1]	第30天对比第1天	5.31（4.743；5.955）	1.09（1.014；1.166）
%2倍[2]	第15天对比第1天	82.6%（77.37%；87.07%）	1.6%（0.19%；5.53%）
%2倍[2]	第30天对比第1天	81.7%（76.54%；86.23%）	2.3%（0.48%；6.60%）
%4倍[2]	第15天对比第1天	62.1%（55.77%；68.06%）	0.8%（0.02%；4.28%）
%4倍[2]	第30天对比第1天	58.9%（52.73%；64.94%）	1.5%（0.19%；5.45%）

[0715] 血清型O6A

[0716]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V	安慰剂
GMT	第 1 天	1491643.9（1353036.8；1644450.1）	1836907.8（1582827.3；2131774.0）
GMT	第 15 天	5624986.5（5131740.4；6165641.6）	1881936.5（1613534.0；2194986.4）
GMT	第 30 天	5516879.9（5049584.3；6027419.7）	1934121.0（1657028.0；2257550.3）
GM FI[1]	第 15 天对比第 1 天	3.92（3.548；4.339）	1.03（0.991；1.073）
GM FI[1]	第 30 天对比第 1 天	3.64（3.295；4.026）	1.06（0.991；1.135）
%2 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	74.7%（68.88%；79.94%）	0.8%（0.02%；4.28%）
%2 倍 [2]	第 30 天对比第 1 天	73.0%（67.21%；78.27%）	2.3%（0.48%；6.60%）
%4 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	50.2%（43.87%；56.52%）	0.0%（0.00%；2.84%）
%4 倍 [2]	第 30 天对比第 1 天	44.5%（38.38%；50.72%）	0.8%（0.02%；4.21%）

[0717] 血清型08

[0718]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V	安慰剂
GMT	第 1 天	2145103.2（1937289.9；2375208.6）	2335274.5（2038224.0；2675617.0）
GMT	第 15 天	6281926.9（5810107.0；6792061.6）	2380959.0（2063441.9；2747334.9）
GMT	第 30 天	6286969.0（5832409.6；6776955.4）	2303456.2（2002524.6；2649610.7）

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V	安慰剂
GM FI[1]	第 15 天对比第 1 天	2.95（2.669；3.253）	1.03（0.992；1.073）
GM FI[1]	第 30 天对比第 1 天	2.94（2.676；3.239）	1.01（0.965；1.058）
[0719] % 2 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	62.8%（56.57%；68.82%）	1.6%（0.19%；5.53%）
% 2 倍 [2]	第 30 天对比第 1 天	64.6%（58.53%；70.41%）	1.5%（0.19%；5.45%）
% 4 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	37.5%（31.56%；43.83%）	1.6%（0.19%；5.53%）
% 4 倍 [2]	第 30 天对比第 1 天	38.4%（32.50%；44.58%）	1.5%（0.19%；5.45%）

[0720] 血清型015

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V	安慰剂
GMT	第 1 天	1178299.6（1056703.9；1313887.4）	1188287.9（1014882.9；1391321.1）
GMT	第 15 天	5790439.7（5353107.3；6263500.7）	1198106.9（1021376.8；1405416.7）
[0721] GMT	第 30 天	5728512.6（5308296.8；6181993.5）	1204454.0（1026963.7；1412620.0）
GM FI[1]	第 15 天对比第 1 天	4.97（4.461；5.545）	1.02（0.974；1.070）
GM FI[1]	第 30 天对比第 1 天	4.98（4.477；5.544）	1.02（0.961；1.075）

[0722]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V	安慰剂
%2倍[2]	第15天对比第1天	82.6%（77.37%；87.07%）	0.8%（0.02%；4.28%）
%2倍[2]	第30天对比第1天	84.0%（79.03%；88.24%）	1.5%（0.19%；5.45%）
%4倍[2]	第15天对比第1天	59.3%（52.96%；65.40%）	0.8%（0.02%；4.28%）
%4倍[2]	第30天对比第1天	58.6%（52.34%；64.57%）	0.8%（0.02%；4.21%）

[0723] 血清型O16

[0724]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V	安慰剂
GMT	第1天	1040760.3（957123.1；1131706.2）	1089930.0（964478.4；1231699.4）
GMT	第15天	5395867.2（4945129.5；5887688.6）	1068317.6（948255.2；1203581.7）
GMT	第30天	5148889.9（4731805.0；5602738.7）	1119689.3（994125.9；1261112.1）
GM FI[1]	第15天对比第1天	5.20（4.673；5.785）	1.03（0.987；1.083）
GM FI[1]	第30天对比第1天	5.03（4.565；5.539）	1.06（0.992；1.124）
%2倍[2]	第15天对比第1天	86.6%（81.73%；90.51%）	0.8%（0.02%；4.28%）
%2倍[2]	第30天对比第1天	86.3%（81.56%；90.23%）	1.5%（0.19%；5.45%）

[0725]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V	安慰剂
%4倍[2]	第15天对比第1天	63.2%（56.97%；69.19%）	0.8%（0.02%；4.28%）
%4倍[2]	第30天对比第1天	62.0%（55.81%；67.87%）	1.5%（0.19%；5.45%）

[0726] 血清型018A

[0727]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V	安慰剂
GMT	第1天	1190203.0（1087258.8；1302894.3）	1302260.8（1143295.8；1483328.6）
GMT	第15天	4279941.4（3862457.1；4742550.6）	1343837.5（1178013.2；1533004.1）
GMT	第30天	4072329.3（3684419.9；4501079.2）	1356020.6（1188694.1；1546900.9）
GM FI[1]	第15天对比第1天	3.65（3.282；4.058）	1.06（1.025；1.097）
GM FI[1]	第30天对比第1天	3.41（3.095；3.758）	1.07（1.014；1.128）
%2倍[2]	第15天对比第1天	69.2%（63.08%；74.80%）	0.8%（0.02%；4.28%）
%2倍[2]	第30天对比第1天	69.2%（63.24%；74.73%）	1.5%（0.19%；5.45%）
%4倍[2]	第15天对比第1天	47.8%（41.53%；54.17%）	0.0%（0.00%；2.84%）
%4倍[2]	第30天对比第1天	43.0%（36.90%；49.19%）	0.8%（0.02%；4.21%）

[0728] 血清型025B

[0729]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V	安慰剂
GMT	第 1 天	386797.7（340192.1；439788.2）	374962.9（316641.9；444025.8）
GMT	第 15 天	2214631.7（1915515.0；2560457.0）	362651.4（304024.4；432583.7）
GMT	第 30 天	2124158.2（1851850.8；2436507.4）	372616.7（314118.4；442009.2）
GM FI[1]	第 15 天对比第 1 天	5.96（5.129；6.937）	1.02（0.965；1.073）
GM FI[1]	第 30 天对比第 1 天	5.57（4.851；6.389）	1.04（0.963；1.114）
%2 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	77.9%（72.24%；82.83%）	0.8%（0.02%；4.28%）
%2 倍 [2]	第 30 天对比第 1 天	77.9%（72.44%；82.81%）	2.3%（0.48%；6.60%）
%4 倍 [2]	第 15 天对比第 1 天	58.9%（52.56%；65.02%）	0.8%（0.02%；4.28%）
%4 倍 [2]	第 30 天对比第 1 天	56.7%（50.43%；62.73%）	1.5%（0.19%；5.45%）

[0730] 血清型075

[0731]

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V	安慰剂
GMT	第 1 天	1610037.7（1463566.9；1771167.0）	1522567.0（1323219.9；1751946.3）
GMT	第 15 天	3874235.9（3529397.7；4252766.2）	1527849.3（1311522.5；1779857.8）

终点（95% CI）	时间点	ExPEC10V	安慰剂
GMT	第 30 天	3753012.6（3419195.0；4119421.0）	1572632.2（1362470.9；1815211.0）
GM FI[1]	第 15 天对比第 1 天	2.44（2.236；2.671）	1.02（0.977；1.073）
GM FI[1]	第 30 天对比第 1 天	2.32（2.136；2.526）	1.04（0.979；1.109）
%2 倍[2]	第 15 天对比第 1 天	53.0%（46.61%；59.25%）	1.6%（0.19%；5.53%）
%2 倍[2]	第 30 天对比第 1 天	51.0%（44.74%；57.14%）	2.3%（0.48%；6.60%）
%4 倍[2]	第 15 天对比第 1 天	25.3%（20.06%；31.12%）	1.6%（0.19%；5.53%）
%4 倍[2]	第 30 天对比第 1 天	23.6%（18.58%；29.18%）	2.3%（0.48%；6.60%）

[0732]

[0733] 群组2:初步分析的输出

[0734] 1＝自基线(第1天)FI的GM

[0735] 2＝自基线(第1天)成倍增加的参与者的百分比

[0736] CI＝置信区间;GM＝几何平均值,GMT＝几何平均滴度;FI＝增加倍数

[0737] GMT和GM FI的95% CI均基于t分布

[0738] 使用Clopper-Pearson方法获得具有2倍和4倍增加的参与者百分比的95% CI。

[0739] 对于所有血清型,第15天的应答幅度(GMT)在群组1和群组2之间是相似的。

[0740] 实例8:新型ExPEC组合物和兔中的免疫原性。

[0741] 设计了一项新研究,其包括ExPEC疫苗的2种适应性组合物(ExPEC9V a和b,表17)(本文中也称为适应性配制品)。这些适应性配制品去除了血清型O8多糖并增加了大肠杆菌血清型O75的多糖含量(ExPEC9V b),因为在对来自Ph1/2a临床试验的群组1进行分析期间观察到这些抗原的低免疫原性。作为验证上述较早实验的对照,还评估了ExPEC10V组合物。还包括生理盐水对照(未接种疫苗组)。

[0742] 该研究的总体目标是评估与上述ExPEC10V相比该疫苗组合物的变化(O8多糖的去除以及特别地,O75抗原多糖的剂量增加)是否对疫苗诱导的免疫应答有任何影响。特别地,目的是观察与例如多价缀合物疫苗组合物中的大肠杆菌O6抗原多糖的缀合物相比,增加大

肠杆菌O75抗原多糖的缀合物的量是否确实选择性地提高对血清型O75大肠杆菌的免疫应答,从而导致多个组成性大肠杆菌血清型的免疫应答更均匀地升高。为此,在已建立的使用新西兰白兔(NZW)的免疫原性临床前模型中评估了由ExPEC疫苗的不同配制品诱导的抗体应答。

[0743] 实验设计

[0744] 新西兰白兔(NZW,研究开始时为13周龄)接受3次肌内ExPEC疫苗的不同配制品免疫(500μL/注射)或生理盐水,间隔2周施用(表17)。该研究包含4个不同的组(表18):组1(ExPEC10V)接受8μg/剂量的O1A、O2、O6A、O4、O8、O15、O16、O18和O75以及16μg/剂量的O25B(即,0.5mL的组合物,其包含16μg/mL的O1A、O2、O6A、O4-Glc+、O8、O15、O16、O18A和O75抗原多糖中的每一种以及32μg/mL的O25B抗原多糖,每种抗原多糖分别与EPA载体蛋白生物缀合,参见以上实例);组2(ExPEC9V a)接受8μg/剂量的O1A、O2、O6A、O4、O15、O16、O18A和O75以及16μg/剂量的O25B(即,0.5mL的组合物,其包含16μg/mL的O1A、O2、O6A、O4-Glc+、O15、O16、O18A和O75抗原多糖中的每一种以及32μg/mL的O25B抗原多糖,每种抗原多糖分别与EPA载体蛋白生物缀合,参见以上实例);组3(ExPEC9V b)接受8μg/剂量的O1A、O2、O6A、O4、O15、O16和O18A以及16μg/剂量的O75和O25B(即,0.5mL的组合物,其包含16μg/mL的O1A、O2、O6A、O4-Glc+、O15、O16和O18A抗原多糖中的每一种以及32μg/mL的O25B和O75抗原多糖,每种抗原多糖分别与EPA载体蛋白生物缀合,参见以上实例)。

[0745] 用于复合的缓冲液含有6.19mM KH_2PO_4、3.81mM Na_2HPO_4、5%山梨糖醇(w/w)、10mM甲硫氨酸、0.02% PS80(w/w),pH 7.0。来自对照组(组4)的动物接受生理盐水(0.9%(w/v)氯化钠溶液)。每个实验组包含10只动物。在免疫前(第0天)和免疫后(第14、28和42天)评估通过ELISA测量的血清抗体水平(总IgG)。

[0746] 表17.不同的多价ExPEC疫苗组合物。

[0747]

血清型	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
总PS(μg)	88	80	88

[0748] 表18.实验组。

[0749]

组	处理	给药日	动物数量
1	ExPEC10V	0,14,28	10
2	ExPEC9V a(1:1比率的O75:O6)	0,14,28	10
3	ExPEC9V b(2:1比率的O75:O6)	0,14,28	10

4	生理盐水	0,14,28	10

[0750] 在每次给药前、每个给药日给药后大约6小时、以及注射后每天(持续7天)使用Draize评分系统监测可能的注射部位反应。如果观察到病例注射部位的影响,则继续每天观察,直至评分恢复为0。

[0751] 在处理前给动物单独称重(以克计)一次,每次给药后每天称重一次(持续3天),此后每周称重一次。每天至少观察一次动物的健康损害或不良临床效应。在给药日,在给药前和处理后大约6h(与注射部位检查同时)检查动物对处理的反应。在给药前、每次给药后6h和24h,使用直肠数字温度计监测体温并记录。当温度超出兔的正常范围38℃-40℃时,每天进行额外的测量,直至体温恢复到这些值以内。

[0752] 动物接受3次肌肉ExPEC10V、ExPEC9V a、ExPEC9V b免疫或生理盐水,间隔2周施用。在第0天(疫苗接种前)以及第14、28和42天(疫苗接种后)通过ELISA测量抗体水平。

[0753] 通过ELISA使用Gen 5软件分析由包含在ExPEC疫苗组合物中的每种O抗原诱导的血清抗体水平。在4参数(4PL)非线性回归模型中分析450nm处的OD。基于重复的12步滴定曲线计算每个单独样品的半数最大有效浓度(EC50)。样品结果表示为EC50滴度。

[0754] 对NZW兔中抗原特异性血清抗体应答的评估表明,与生理盐水对照相比,测试的所有ExPEC疫苗组合物(ExPEC10V、ExPEC9V a和ExPEC9V b)在疫苗接种后第14、28和42天均诱导针对所有疫苗抗原的抗体应答显著增加(图6)。测试的所有ExPEC疫苗组合物的第二剂量增强了抗体应答,如通过疫苗接种后第14天至第28天抗原特异性抗体应答显著增加所证明的。对于某些抗原和组合物,第三剂量的ExPEC疫苗的进一步加强效果是明显的。

[0755] O75抗原的几何平均抗体滴度(GMT)随着O75多糖浓度的增加而增加(图6)。与仅包含8μg O75多糖的ExPEC9V a和ExPEC10V组合物相比,包含浓度增加的多糖O75(16μg)的ExPEC9V b组合物在疫苗接种后第14、28和42天诱导更高的O75 GMT和GMT增加倍数(表19)。

[0756] 表19.评估不同的ExPEC疫苗组合物的O75抗体应答。

[0757]

处理	O75 抗体应答	疫苗接种后时间点			
		第0天	第14天	第28天	第42天
ExPEC10V	GMT	38	288	5322	15052
	95% CI	26.7-53.2	115.0-720.4	2430.2-11653.4	7569.2-29930.8
	GMT 增加倍数	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
	GMT 增加倍数	na	4.7	172.7	504.7
ExPEC9V b	GMT	42	585	20303	30269
	95% CI	26.7-65.2	264.3-1296.6	9403.1-43836.5	20294.9-45146.3
	GMT 增加倍数	na	14.0	486.9	726.0

[0758] n.a.:不适用;GMT:几何平均抗体滴度;CI:置信区间;与第0天(疫苗接种前的基线)相比,GMT增加倍数。

[0759] 对体重、体温和注射部位反应的评估表明,测试的所有ExPEC疫苗组合物都被动物很好地耐受(数据未显示)。

[0760] 总之,测试的所有ExPEC疫苗组合物均在NZW兔中具有免疫原性,与生理盐水对照相比,在疫苗接种后第14、28和42天观察到抗原特异性血清抗体应答显著增加。测试的所有ExPEC疫苗组合物均能增强多糖特异性抗体应答。此外,测试的所有ExPEC疫苗组合物都被

动物很好地耐受,没有观察到疫苗相关的不良事件。重要的是,与含有较低浓度的O75多糖的组合物(ExPEC9Va和ExPEC10V)相比,含有浓度增加的O75多糖的ExPEC9V b组合物诱导更高的O75抗体应答(GMT和GMT增加倍数)。因此,ExPEC9V b组合物中O75的增加的剂量提高了针对O75血清型的免疫应答,因此这种组合物导致ExPEC9V b组合物中各血清型的免疫应答更均匀地升高。

[0761] 实例9.使用新型ExPEC9V组合物进行的人体3期功效试验。

[0762] 使用具有浓度增加的O75抗原多糖的9价ExPEC疫苗组合物进行人体功效研究。该研究的标题是:“用于评估接种ExPEC9V在预防60岁及以上、过去2年内有尿路感染病史的成人的侵袭性肠外致病性大肠杆菌疾病中的有效性、安全性和免疫原性的随机、双盲、安慰剂对照、多中心3期研究”,并且本文将其称为‘BAC3001’研究。

[0763] ExPEC9V是一种正在开发中的9价候选疫苗,用于预防60岁及以上的成人的侵袭性肠外致病性大肠杆菌(ExPEC)疾病(IED)。ExPEC9V由分别与载体蛋白生物缀合的ExPEC血清型O1A、O2、O4、O6A、O15、O16、O18A、O25B和O75的O抗原多糖(PS)组成,该载体蛋白是源自铜绿假单胞菌的遗传去毒形式的外毒素A(EPA),如前面实例中详细描述的。ExPEC9V疫苗涵盖9种指定的大肠杆菌血清型,这些血清型是ExPEC的最流行O血清型,导致所有IED的约65%。

[0764] 目的和终点

[0765]

目的	终点
主要	

[0766]

目的	终点
• 证明与安慰剂相比，ExPEC9V 在预防首次 IED 事件中的功效，从血液、其他无菌部位或尿液进行微生物学确认，该事件由 ExPEC9V O 血清型 O1A、O2、O4、O6A、O15、O16、O18A、O25B 和 O75 引起	• 首次 IED 事件，从血液、其他无菌部位或尿液进行微生物学确认，该事件由 ExPEC9V O 血清型 O1A、O2、O4、O6A、O15、O16、O18A、O25B 和 O75 引起
• 证明与安慰剂相比，ExPEC9V 在预防首次 IED 事件中的功效，从血液或其他无菌部位进行微生物学确认，该事件由 ExPEC9V O 血清型引起	• 首次 IED 事件，从血液或其他无菌部位进行微生物学确认，该事件由 ExPEC9V O 血清型引起
次要	
• 证明与安慰剂相比，ExPEC9V 在预防由 ExPEC9V O 血清型引起的所有 IED（包括每名参与者中的多种 IED）中的功效	• 由 ExPEC9V O 血清型引起的所有 IED（包括每名参与者中的多种 IED）
• 证明与安慰剂相比，ExPEC9V 在预防由 ExPEC9V O 血清型引起的首次住院 IED 事件中的功效	• 由 ExPEC9V O 血清型引起的首次住院 IED 事件
• 证明与安慰剂相比，ExPEC9V 在预防符合由 ExPEC9V O 血清型引起的脓毒症标准的首次 IED 事件中的功效	• 符合由 ExPEC9V O 血清型引起的脓毒症标准的首次 IED 事件
• 证明与安慰剂相比，ExPEC9V 在预防由 ExPEC9V O 血清型引起的首次菌血性（即，从血液进行微生物学确认）IED 事件中的功效	• 由 ExPEC9V O 血清型引起的首次菌血性 IED 事件
• 证明与安慰剂相比，ExPEC9V 在预防由 ExPEC9V O 血清型引起的首次肾盂肾炎事件中的功效	• 由 ExPEC9V O 血清型引起的首次肾盂肾炎事件
• 证明与安慰剂相比，ExPEC9V 在预防由 ExPEC9V O 血清型引起的首次 UTI 事件中的功效	• 由 ExPEC9V O 血清型引起的首次 UTI 事件
• 证明与安慰剂相比，ExPEC9V 在预防由 ExPEC9V O 血清型引起的所有 UTI（包括每名参与者的多种 UTI）中的功效	• 由 ExPEC9V O 血清型引起的所有 UTI（包括每名参与者的多种 UTI）
• 证明与安慰剂相比，ExPEC9V 在预防由任何 ExPEC O 血清型引起的首次 IED 事件中的功效	• 由任何 ExPEC O 血清型引起的首次 IED 事件

[0767]

目的	终点
• 证明与安慰剂相比，ExPEC9V 在预防由任何 ExPEC O 血清型引起的首次肾盂肾炎事件中的功效	• 由任何 ExPEC O 血清型引起的首次肾盂肾炎事件
• 证明与安慰剂相比，ExPEC9V 在预防由任何 ExPEC O 血清型引起的首次 UTI 事件中的功效	• 由任何 ExPEC O 血清型引起的首次 UTI 事件
• 评估 ExPEC9V 在免疫原性子集中的免疫原性	• 免疫原性子集中针对疫苗 O 血清型抗原的抗体滴度，如通过基于多重电化学发光（ECL）的免疫测定和多重调理吞噬杀伤测定（MOPA）在第 30 天、第 181 天、第 1 年、第 2 年和第 3 年所测定的
• 评估 ExPEC9V 的安全性和反应原性	• 诱发性局部和全身 AE（在安全性子集中直至疫苗接种后 14 天[从第 1 天到第 15 天]收集的） • 非诱发性 AE（在所有参与者中直至疫苗接种后 29 天[从第 1 天到第 30 天]收集的） • 所有参与者中的严重不良事件（SAE）
• 评估与安慰剂相比，ExPEC9V 对健康状况和健康相关生活质量（HRQoL）的保持情况，如通过 Short Form-36（SF-36）调查和 5 级 EuroQol 5 维问卷（EQ-5D-5L）描述系统所测量的 • 评估由 ExPEC9V O 血清型引起的 IED 对身心健康和整体 HRQoL 的影响，如通过 SF-36 所测量的 • 评估由 ExPEC9V O 血清型引起的 UTI 对身心健康和整体 HRQoL 的影响，如通过 SF-36 所测量的	• SF-36 和 EQ-5D-5L 在预定时间点有响应
• 评估接受 ExPEC9V 对比安慰剂的参与者在基线、第 1 年、第 2 年、第 3 年和 IED 时的虚弱程度	• 将虚弱指数作为基线、第 1 年、第 2 年、第 3 年和 IED 时虚弱的量度

[0768]

目的	终点
• 确定由任何 ExPEC O 血清型引起的 IED 和 UTI 事件的医疗资源利用	• IED 事件的医疗资源利用 • UTI 事件（仅免疫原性子集）和急性细菌性前列腺炎（ABP）事件（仅免疫原性子集）的医疗资源利用 • IED、UTI 或 ABP 事件的住院和住院时间
• 确定与 IED 相关的死亡率	• IED 相关和全因死亡率
探索性	
• 评估与安慰剂相比，ExPEC9V 在预防由对≥1、≥2 和≥3 种抗生素具有抗性的 ExPEC9V O 血清型引起的首次 IED 事件中的功效	• 由 ExPEC9V O 血清型引起的首次 IED 事件显示对微生物谱中的≥1、≥2 和≥3 种抗生素具有抗性
• 评估与安慰剂相比，ExPEC9V 在预防由 ExPEC9V O 血清型引起的首次无并发症、复杂性和复发性 UTI 事件中的功效	• 由 ExPEC9V O 血清型引起的首次无并发症的 UTI 事件 • 由 ExPEC9V O 血清型引起的首次复杂性 UTI 事件 • 由 ExPEC9V O 血清型引起的首次复发性 UTI（rUTI）事件 • 由 ExPEC9V O 血清型引起的首次复发性无并发症 UTI 事件
• 评估与安慰剂相比，ExPEC9V 在预防由 ExPEC9V O 血清型引起的首次 ABP 事件中的功效	• 由 ExPEC9V O 血清型引起的首次 ABP 事件
• 评估患有 IED 的参与者中针对疫苗 O 血清型抗原的抗体滴度	• ExPEC9V 的抗体滴度，在患有 IED 的参与者中通过基于多重 ECL 的免疫测定和 MOPA 测定所测定的，其中血清在诊断出疑似 IED 时获得
• 评估 IED 的严重程度	• 在患有 IED 的参与者中 IED（存在脓毒症或脓毒症休克）的严重程度

[0769]

目的	终点
• 确定疫苗介导的与疫苗功效相关的免疫应答的保护相关性	• ExPEC9V 的抗体滴度，其与疫苗功效相关，通过基于多重 ECL 的免疫测定和 MOPA 测定在第 1 天接种前、第 30 天以及诊断出疑似 IED（所有参与者）时或 UTI 或 ABP 事件（仅免疫原性子集）时所测定的
• 评估与安慰剂相比，ExPEC9V 在预防由铜绿假单胞菌引起的首次侵袭性疾病事件和首次铜绿假单胞菌 UTI 中的功效	• 由铜绿假单胞菌引起的首次侵袭性疾病事件 • 首次铜绿假单胞菌 UTI 事件

[0770] 整体设计

[0771] 这是一项随机、双盲、安慰剂对照、平行组、多中心、干预性3期研究，将在大约18,556名年龄≥60岁且在过去2年内有UTI病史的病情稳定的成年人中进行。

[0772] 所有参与者均被纳入并以1:1的比率随机平行分配至ExPEC9V或安慰剂，并在第1天接受该研究疫苗(0.5mL肌内注射(三角肌))。当在研究中观察到72次疫苗血清型IED事件时，或最迟在最后一名参与者已随访疫苗接种后36个月时，进行第一个主要终点(从血液、其他无菌部位或尿液进行微生物学确认)的最终分析。当第一个主要终点显示统计学显著性时，以分层方式测试第二个主要终点(从血液或其他无菌部位进行微生物学确认)。对于第二个主要终点(从血液或其他无菌部位进行微生物学确认)的最终分析，必须观察根据第二个主要终点的53次疫苗血清型IED事件。ExPEC9V疫苗组合物包含16μg/mL的O1A、O2、O6A、O4-Glc+、O15、O16和O18A抗原多糖中的每一种以及32μg/mL的O25B和O75抗原多糖，每种抗原多糖分别与EPA载体蛋白生物缀合，参见以上实例(例如，这与以上实例8的兔免疫组3中使用的组合物相同；赋形剂与实例7的BAC1001研究中使用的ExPEC10V疫苗所描述的相同)。安慰剂是0.9%w/v氯化钠。

[0773] 安全性评估

[0774] 关键的安全性评估包括SAE、体格检查和生命体征。此外，为“安全性子集”(即，来自选定研究基地的大约4,000名参与者，他们在随机分组进行额外评估之前已给予知情同意书)中的参与者记录了诱发性局部和全身AE以及非诱发性AE。

[0775] 免疫原性评估

[0776] 为了评估免疫原性，通过基于多重ECL的免疫测定测量由针对9种疫苗O血清型中的每一种和载体蛋白EPA的疫苗引发的IgG抗体水平，并通过MOPA测量特定血清型功能性抗体。对“免疫原性子集”(即，来自选定研究基地的大约1,200名参与者，他们在随机分组进行额外免疫原性评估之前已给予知情同意书)中的参与者，对具有确诊IED事件的所有参与者，以及对免疫原性子集中具有UTI或急性细菌性前列腺炎(ABP)事件的参与者进行免疫原性分析。

[0777] 功效评估

[0778] 主要目的是证明与安慰剂相比，ExPEC9V在预防由ExPEC血清型O1A、O2、O4、O6A、O15、O16、O18A、O25B和O75引起的首次IED事件中的功效。在整个研究期间(1,096天；3年)，

收集所有参与者的定义为IED、UTI或ABP的事件。在研究随访期间,如果参与者出现UTI或ABP的任何体征或症状,或者如果他们出现可能由全身感染引起的任何新发或恶化的症状,则希望参与者尽快通知研究基地。此外,所有参与者都将被询问过去的住院或医疗事件,这些事件可能是UTI、ABP或潜在的IED,并且基地没有及时捕获这些事件。收集与IED(所有参与者)和UTI或ABP(仅免疫原性子集)相关的医疗遭遇相关性医疗资源利用数据。使用两种患者报告结局(PRO)工具来衡量健康相关生活质量:SF-36版本2和EQ-5D-5L。此外,使用SPPB和虚弱指数评分来评估虚弱。

[0779] 免疫原性评估

[0780] 为了评估免疫原性,通过基于多重ECL的免疫测定测量由针对9种疫苗O血清型中的每一种和载体蛋白EPA的疫苗引发的IgG抗体水平,并通过MOPA测量特定血清型功能性抗体。对“免疫原性子集”(即,来自选定研究基地的大约1,200名参与者,他们在随机分组进行额外免疫原性评估之前已给予知情同意书)中的参与者,对患有确诊IED的所有参与者,以及对免疫原性子集中具有UTI或ABP事件的参与者进行免疫原性分析。从所有参与者收集第1天和第30天的免疫原性血液样品。

[0781] 安全性评估

[0782] 关键的安全性评估包括SAE、体格检查和生命体征。此外,为“安全性子集”(即,来自选定研究基地的大约4,000名参与者,他们在随机分组进行额外评估之前已给予知情同意书)中的参与者记录了诱发性局部和全身AE以及非诱发性AE。

[0783] 功效分析

[0784] 对第一个主要终点的初步分析评估了在符合方案功效(per protocol efficacy, PPE)人群中,与安慰剂组相比,在活性疫苗(ExPEC9V)组中具有在疫苗接种后至少29天发作的由ExPEC血清型O1A、O2、O4、O6A、O15、O16、O18A、O25B和O75引起的至少1次IED事件的参与者数量。对第二个主要终点的初步分析评估了在PPE人群中,与安慰剂组相比,在活性疫苗(ExPEC9V)组中具有在疫苗接种后至少29天(从第30天起)发作的由ExPEC血清型O1A、O2、O4、O6A、O15、O16、O18A、O25B和O75引起的至少1次IED事件(在血液或其他无菌部位进行微生物学确认)的参与者数量。随访时间也被考虑在内。对于具有IED事件的参与者,随访时间被定义为疫苗接种与首次事件发生之间的时间。对于没有IED事件的参与者,它是疫苗接种与最后一次访视(或最后一次联系中止该研究的参与者)之间的时间。对比VE>20%的替代假设,测试VE≤20%的零假设。

[0785] 将分段分层测试策略应用于以下终点:

[0786] 主要:

[0787] -首次IED,从血液、其他无菌部位或尿液进行微生物学确认,由ExPEC9VO血清型引起

[0788] -首次IED,从血液或其他无菌部位进行微生物学确认,由ExPEC9V O血清型引起

[0789] 次要:

[0790] -由ExPEC9V O血清型引起的所有IED(包括每名参与者中的多种IED)

[0791] -由ExPEC9V O血清型引起的首次住院IED事件

[0792] -符合由ExPEC O血清型引起的脓毒症标准的首次IED事件

[0793] -由ExPEC9V O血清型引起的首次菌血性IED事件

[0794] -由ExPEC9V O血清型引起的首次肾盂肾炎事件

[0795] -由ExPEC9V O血清型引起的首次UTI

[0796] -由ExPEC9V O血清型引起的所有UTI(包括每名参与者的多种UTI)

[0797] -由任何ExPEC O血清型引起的首次IED事件

[0798] -由任何ExPEC O血清型引起的首次肾盂肾炎事件

[0799] -由任何ExPEC O血清型引起的首次UTI

[0800] 在此测试策略中,仅当第一个主要终点显示统计学显著性时才测试第二个主要终点。当第一个主要终点显示72个事件的统计学显著性时,则对第二个主要终点(从血液或其他无菌部位进行微生物学确认)进行期中分析,只要当时观察到的事件少于53个。如果第二个主要终点不显著,当根据第二个主要终点的定义观察到53个疫苗血清型IED事件时,进行第二个主要终点的最终分析。此外,仅当这两个主要终点都显示出统计学显著性时才测试第一个关键次要终点。第一个关键次要终点包括在疫苗接种(PPE)后至少29天直至随访期结束时发作的所有ExPEC9V IED事件。

[0801] 如果满足以下标准并由独立终点评审委员会(independent endpoint adjudication committee,IEAC)确认,则参与者被视为患有IED。

[0802] 被诊断患有IED的成年参与者是任何具有以下特征的参与者:

[0803] •全身性细菌感染的体征和症状,表现为存在以下任何一种情况:

[0804] -温度<36.0℃(96.8°F)或>38.0℃(100.4°F),

[0805] -心动过速(HR)>90bpm,

[0806] -呼吸急促(RR)>20次呼吸/分钟,或

[0807] -WBC计数<4或>12x10^9/L或10%的不成熟(条带)形式,

[0808] 以及

[0809] •通过培养以下材料进行微生物确认:

[0810] -血液或任何其他无菌部位(例如,脑脊液[CSF]、胸膜)中的大肠杆菌

[0811] 和/或

[0812] -尿液中的大肠杆菌(菌落形成单位/mL≥10^5),有UTI体征/症状,没有其他可识别的感染部位,并且序贯器官衰竭估计(SOFA)总评分有自基线≥2分的剧烈变化。

[0813] 对于主要和次要终点,对于由任何ExPEC9V O血清型(即O1A、O2、O4、O6A、O15、O16、O18A、O25B或O75)引起的IED,O血清分型必须可用,并且必须确认IED为O1A、O2、O4、O6A、O15、O16、O18A、O25B或O75阳性的。对于与任何ExPEC O血清型相关的次要终点,不必提供O血清分型。根据IEAC的判断,如果全身性感染不能仅归因于大肠杆菌,则培养结果中具有多种病原体的病例不考虑用于主要或次要终点。具有混合病原体且存在大肠杆菌的病例包括在敏感性分析中。

[0814] 如果参与者因UTI的体征和症状联系了他们的医师和/或研究基地,则在满足以下标准并被IEAC确认为肾盂肾炎病例的情况下,该参与者被定义为患有症状性UTI。

[0815] 有文件记录的脓尿(白细胞(WBC)计数≥10个细胞/mm^3)并通过培养尿液中的大肠杆菌进行了微生物学确认(菌落形成单位≥10^5/mL)且具有以下体征和症状的定义之一的成年人:

[0816] •对于无并发症的UTI,有以下体征或症状中的至少2种:

[0817] -排尿困难,

[0818] -尿频,

[0819] -尿急,或

[0820] -耻骨上痛。

[0821] •对于复杂性UTI(cUTI):

[0822] -有以下体征或症状中的至少2种:

[0823] o与发烧相关的寒战(chills)、寒颤(rigors)或温暖(warmth)(例如,体温≥38.0℃),

[0824] o排尿困难、尿频或尿急,

[0825] o小腹痛或骨盆痛,或

[0826] o恶心或呕吐,

[0827] 以及

[0828] -有以下并发因子中的至少1种:

[0829] o尿潴留病史(男性参与者),

[0830] o目前留置导尿管,

[0831] o阻塞性尿路病,或

[0832] o任何相关的功能异常或解剖异常。

[0833] •对于肾盂肾炎(无论尿道是否存在潜在异常),有以下症状中的至少2种:

[0834] -与发烧相关的寒战、寒颤或温暖(例如,体温≥38.0℃),或

[0835] -体格检查时肋椎角有肋腹疼痛或压痛,或

[0836] -恶心或呕吐。

[0837] •对于复发性UTI(rUTI):

[0838] -以过去六个月内两次UTI的频率复发无并发症的和/或复杂性UTI,或

[0839] -以每年至少三次UTI的频率复发无并发症的和/或复杂性UTI。

[0840] 对于次要终点,对于由任何ExPEC9V O血清型(即O1A、O2、O4、O6A、O15、O16、O18A、O25B或O75)引起的UTI,O血清分型必须可用,并且必须确认UTI为O1A、O2、O4、O6A、O15、O16、O18A、O25B或O75阳性的。对于与任何ExPEC O血清型相关的次要终点,不必提供O血清分型。培养结果中具有多种病原体且存在大肠杆菌的病例不考虑用于次要终点。这些病例包括在敏感性分析中。

[0841] 作为探索性终点,据报道,满足上述IED(大肠杆菌的微生物学确认除外)或UTI定义但(在UTI的情况下,为尿液)样品对铜绿假单胞菌(在UTI的情况下,菌落形成单位≥10^5/mL)呈阳性的参与者患有分别由铜绿假单胞菌或铜绿假单胞菌UTI引起的侵袭性疾病。没有对铜绿假单胞菌进行血清分型。具有混合病原体且存在铜绿假单胞菌的样品不考虑用于该探索性终点。

[0842] 作为ABP的探索性功效终点,报告了由ExPEC血清型O1A、O2、O4、O6A、O15、O16、O18A、O25B和O75引起的事件。

[0843] 如果参与者因ABP的体征和症状联系他们的医师和/或研究基地,则在满足以下标准的情况下,该参与者被定义为患有症状性ABP。

[0844] 有文件记录的脓尿(WBC计数≥10个细胞/mm^3)并通过培养尿液中的大肠杆菌进行

了微生物学确认(菌落形成单位≥10^5/mL)且伴有发烧和以下急性发作的成年人：

[0845] •刺激性排尿症状：

[0846] o排尿困难，

[0847] o尿频，

[0848] o尿急，或

[0849] •阻塞性排尿症状：

[0850] -排尿犹豫，

[0851] -不完全排尿，

[0852] -用力排尿，

[0853] -尿流细，以及

[0854] •耻骨上、直肠或会阴疼痛。

[0855] 本领域技术人员将理解，在不偏离本发明的广泛发明构思的情况下，可以对上述实施例进行改变。因此，应当理解，本发明不限于所披露的特定实施例，而是旨在涵盖由本说明书限定的本发明的精神和范围内的修改。

[0856] 序列

[0857] SEQ ID NO:1(糖基化共有序列)

[0858] Asn-X-Ser(Thr)，其中X可以是除Pro以外的任何氨基酸

[0859] SEQ ID NO:2(优化的糖基化共有序列)

[0860] Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr)，其中X和Z独立地选自除Pro以外的任何氨基酸

[0861] SEQ ID NO:3(包含4个糖基化共有序列的EPA载体蛋白(EPA-4))

[0862] G SGGGDQNATG SGGGKLAEEA FDLWNECAKA CVLDLKDGVR SSRMSVDPAI ADTNGQGVLH

[0863] YSMVLEGGND ALKLAIDNAL SITSDGLTIR LEGGVEPNKP VRYSYTRQAR GSWSLNWLVP IGHEKPSNIK

[0864] VFIHELNAGN QLSHMSPIYT IEMGDELLAK LARDATFFVR AHESNEMQPT LAISHAGVSV VMAQAQPRRE

[0865] KRWSEWASGK VLCLLDPLDG VYNYLAQQRC NLDDTWEGKI YRVLAGNPAK HDLDIKDNNN STPTVISHRL

[0866] HFPEGGSLAA LTAHQACHLP LEAFTRHRQP RGWEQLEQCG YPVQRLVALY LAARLSWNQV DQVIRNALAS

[0867] PGSGGDLGEA IREQPEQARL ALTLAAAESE RFVRQGTGND EAGAASADVV SLTCPVAKDQ NRTKGECAGP

[0868] ADSGDALLER NYPTGAEFLG DGGDVSFSTR GTQNWTVERL LQAHRQLEER GYVFVGYHGT FLEAAQSIVF

[0869] GGVRARSQDL DAIWRGFYIA GDPALAYGYA QDQEPDARGR IRNGALLRVY VPRWSLPGFY RTGLTLAAPE

[0870] AAGEVERLIG HPLPLRLDAI TGPEEEGGRV TILGWPLAER TVVIPSAIPT DPRNVGGDLD PSSIPDKEQA

[0871] ISALPDYASQ PGKPPREDLK LGSGGGDQNA T

[0872] SEQ ID NO:4(O4 GtrS氨基酸序列)

[0873] MNNLIMNNWCKLSIFIIAFILLWLRRPDILTNAQFWAEDSVFWYKDAYENGFLSSLTTPRNGYFQTVST
FIVGLTALLNPDYAPFVSNFFGIMIRSVIIWFLFTERFNFLTLTTRIFLSIYFLCMPGLDEVHANITNAHWYLSLYV
SMILIARNPSSKSWRFHDIFFILLSGLSGPFIIFILAASCFKFINNCKDHISVRSFINFYLRQPYALMIVCALIQGT
SIILTFNGTRSSAPLGFSFDVISSIISSNIFLFTFVPWDIAKAGWDNLLLSYFLSVSILSCAAFVFVKGTWRMKVFA
TLPLLIIIFSMAKPQLTDSAPQLPTLINGQGSRYFVNIHIAIFSLLCVYLLECVRGKVATLFSKIYLTILLFVMGCL
NFVITPLPNMNWREGATLINNAKTGDVISIQVLPPGLTLELRKK

[0874] SEQ ID NO:5(O4 gtrS核酸序列实例)

[0875] ATGAATAATTTAATTATGAATAACTGGTGTAAATTATCTATATTTATTATTGCATTTATTTTGCTATGG
CTTAGAAGGCCGGATATACTCACAAACGCACAATTTTGGGCAGAAGATTCCGTTTTCTGGTATAAGGACGCCTATGA
GAACGGATTCTTAAGTTCACTAACAACGCCTAGGAATGGGTATTTCCAGACTGTTTCTACATTTATAGTTGGTCTGA
CTGCTTTATTAAATCCAGATTATGCACCTTTTGTTTCTAATTTTTTTGGCATAATGATTCGCTCAGTAATTATATGG
TTTTTATTTACAGAAAGATTCAACTTCCTCACATTGACTACTAGGATTTTCTTATCTATTTATTTTCTATGCATGCC
TGGATTGGATGAAGTTCATGCAAATATAACAAATGCACATTGGTATTTGTCATTATATGTATCAATGATCCTGATAG
CTCGCAATCCAAGTTCAAAATCATGGAGGTTTCATGATATATTCTTTATCTTGCTATCCGGGCTCAGTGGCCCATTT
ATAATTTTCATTTTAGCAGCTTCATGCTTTAAATTTATAAATAATTGTAAAGATCATATTAGTGTAAGATCTTTCAT
AAATTTCTACTTGCGTCAGCCATACGCATTAATGATTGTTTGCGCTTTAATTCAAGGAACTTCTATAATTCTAACTT
TCAATGGCACACGTTCCTCAGCACCGCTAGGATTCAGTTTTGATGTGATTTCGTCTATTATATCATCGAATATTTTT
TTATTTACATTTGTCCCATGGGATATTGCAAAGGCTGGGTGGGATAATTTACTGTTATCTTATTTTTTGTCTGTTTC
GATTTTGTCGTGTGCGGCCTTTGTTTTTGTTAAAGGTACGTGGCGAATGAAAGTATTTGCAACTTTACCATTGCTAA
TTATAATATTTTCAATGGCAAAACCACAATTGACAGACTCGGCACCTCAATTGCCAACACTTATTAATGGGCAAGGT
TCAAGATACTTCGTAAATATACATATTGCGATATTCTCTTTGCTATGTGTTTACTTACTTGAGTGCGTCAGGGGGAA
AGTGGCAACTTTATTTTCCAAAATATACTTAACAATTTTGCTATTCGTGATGGGATGTTTGAATTTTGTTATCACCC
CACTCCCAAACATGAACTGGAGGGAAGGTGCTACTTTGATTAATAATGCAAAAACTGGTGATGTCATTTCGATTCAA
GTGCTACCACCTGGCCTAACACTTGAACTAAGGAAAAAATAA

[0876] SEQ ID NO:6(PglB序列实例(‘野生型’))

[0877] MLKKEYLKNPYLVLFAMIILAYVFSVFCRFYWVWWASEFNEYFFNNQLMIISNDGYAFAEGARDMIAGF
HQPNDLSYYGSSLSALTYWLYKITPFSFESIILYMSTFLSSLVVIPTILLANEYKRPLMGFVAALLASIANSYYNRT
MSGYYDTDMLVIVLPMFILFFMVRMILKKDFFSLIALPLFIGIYLWWYPSSYTLNVALIGLFLIYTLIFHRKEKIFY
IAVILSSLTLSNIAWFYQSAIIVILFALFALEQKRLNFMIIGILGSATLIFLILSGGVDPILYQLKFYIFRSDESAN
LTQGFMYFNVNQTIQEVENVDLSEFMRRISGSEIVFLFSLFGFVWLLRKHKSMIMALPILVLGFLALKGGLRFTIYS
VPVMALGFGFLLSEFKAIMVKKYSQLTSNVCIVFATILTLAPVFIHIYNYKAPTVFSQNEASLLNQLKNIANREDYV
VTWWDYGYPVRYYSDVKTLVDGGKHLGKDNFFPSFALSKDEQAAANMARLSVEYTEKSFYAPQNDILKTDILQAMMK
DYNQSNVDLFLASLSKPDFKIDTPKTRDIYLYMPARMSLIFSTVASFSFINLDTGVLDKPFTFSTAYPLDVKNGEIY
LSNGVVLSDDFRSFKIGDNVVSVNSIVEINSIKQGEYKITPIDDKAQFYIFYLKDSAIPYAQFILMDKTMFNSAYVQ
MFFLGNYDKNLFDLVINSRDAKVFKLKI

[0878] SEQ ID NO:7(gtrA氨基酸序列实例;大肠杆菌W3110yfdG,GenBank:BAA16209.1)

[0879] MLKLFAKYTSIGVLNTLIHWVVFGVCIYVAHTNQALANFAGFVVAVSFSFFANAKFTFKASTTTMRYML
YVGFMGTLSATVGWAADRCALPPMITLVTFSAISLVCGFVYSKFIVFRDAK

[0880] SEQ ID NO:8(gtrB氨基酸序列实例-大肠杆菌W3110yfdH,GenBank:BAA16210.1)

[0881] MKISLVVPVFNEEEAIPIFYKTVREFEELKSYEVEIVFINDGSKDATESIINALAVSDPLVVPLSFTRN FGKEPALFAGLDHATGDAIIPIDVDLQDPIEVIPHLIEKWQAGADMVLAKRSDRSTDGRLKRKTAEWFYKLHNKISN PKIEENVGDFRLMSRDVVENIKLMPERNLFMKGILSWVGGKTDIVEYVRAERIAGDTKFNGWKLWNLALEGITSFST FPLRIWTYIGLVVASVAFIYGAWMILDTIIFGNAVRGYPSLLVSILFLGGIQMIGIGVLGEYIGRTYIETKKRPKYI IKRVKK

[0882] SEQ ID NO:9(O4rfb基因座核苷酸序列实例-O4-EPA生产菌株BVEC-L-00684f)

[0883] ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCG ATACCCAAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGAT CAAAGAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAAT CACTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCATT TGTCGTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATGATTG CACGTTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCCGTCATC CAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGATCAGCCGCA GACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTCGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAACTGGAACGTACTC AGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCCGTTGATGCAATG CTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAGTATGGCCTACGCAA CCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAATCTGACCGGATGTAAC GGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAATCTTCCTGCCGTTGTTTT ATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCAGGATTTTCCTTGTTTCCAGA GCGGATTGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTAACGCTCGTCACATCATAGGCAT GCATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATACCTCTATTAATCAAACTGAGAGCCG CTTATTTCACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGTGAAAATACTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTAT TGGTTCAGCTGTAGTTCGTCACATTATAAATAATACGCAGGATAGTGTTGTTAATGTCGATAAATTAACGTACGCCG GAAACCGGGAATCACTTGCTGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATGTTTTTGAACATGCGGATATTTGCGATGCACCT GCAATGGCACGGATTTTTGCTCAGCATCAGCCGGATGCAGTGATGCACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTC AATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTTGGTACTTATGTCCTTTTGGAAGCCGCTCGCAATTACT GGTCTGCTCTTGATAGCGACAAGAAAAATAGCTTCCGTTTTCATCATATTTCTACTGACGAAGTATATGGTGATTTG CCTCATCCTGACGAGGTAAATAATACAGAAGAATTACCCTTATTTACTGAGACAACAGCTTACGCGCCAAGCAGCCC TTATTCCGCATCCAAAGCATCCAGCGATCATTTAGTCCGCGCGTGGAAACGTACCTATGGTTTACCGACCATTGTGA CTAATTGCTCTAACAATTATGGTCCTTATCATTTCCCGGAAAAATTGATTCCATTGGTTATTCTCAATGCTCTGGAA GGTAAAGCATTACCTATTTATGGTAAAGGGGATCAAATTCGCGACTGGCTGTATGTTGAAGATCATGCGCGTGCGTT ATATACCGTCGTAACCGAAGGTAAAGCGGGTGAAACTTATAACATTGGTGGGCACAACGAAAAGAAAAACATAGATG TAGTGCTCACTATTTGTGATTTGCTGGATGAGATTGTACCGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAAATCACTTATGTT GCCGATCGTCCGGGACACGATCGCCGTTATGCGATTGATGCTGAGAATATTGGTCGCGAATTGGGATGGAAACCACA GGAAACGTTTGAGAGCGGGATTCGGAAGACAGTGGAATGGTATCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAATGTGAAAA GTGGTGCCTATCAATCGTGGATTGAAGAGAACTATGAGGGCCGCCAGTAATGAATATCCTCCTTTTTGGCAAAACAG GGCAGGTAGGTTGGGAACTACAGCGTGCTCTGGCACCTCTGGGTAACTTGATTGCTCTTGATGTTCATTCCACTGAT TATTGTGGCGATTTCAGTAACCCCGAAGGTGTGGCTGAAACCGTCAAAAAAATTCGCCCAGATGTTATTGTTAATGC

TGCTGCTCATACCGCGGTAGATAAGGCTGAGTCAGAACCAGAATTTGCACAATTACTCAATGCGACCAGCGTTGAAG
CAATTGCAAAAGCGGCTAATGAAGTTGGGGCTTGGGTAATTCATTACTCAACTGACTACGTCTTCCCTGGAAATGGC
GACATGCCATGGCTCGAGACTGATGTAACCGCTCCGCTCAATGTTTATGGCAAAACCAAATTGGCTGGAGAAAGAGC
ATTACAAGAACATTGCGCAAAGCATCTTATTTTCCGTACCAGCTGGGTATATGCAGGTAAAGGAAATAACTTTGCCA
AAACAATGTTACGTCTGGCAAAAGAGCGCGAAGAACTGGCTGTGATAAACGATCAGTTTGGCGCACCAACAGGTGCT
GAATTGCTGGCTGATTGCACCGCTCATGCCATTCGCGTGGCATTAAAAAAACCAGAAGTTGCTGGCTTGTACCATCT
GGTAGCAAATGGCACAACAACCTGGCACGATTACGCCGCGCTAGTATTCGAAGAAGCCCGTAAAGCAGGGATTGACC
TTGCACTTAACAAACTCAACGCCGTACCAACAACGGCTTATCCTACTCCAGCCCGCCGTCCTCATAATTCTCGCCTC
AATACCGAAAAGTTTCAGCAGAACTTTGCGCTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTGGGCGTGAAACGTATGCTCAACGA
ATTATTTACGACTACGGCAATTTAACAAATTTTTGCATCTCGCTCATGATGCCAGAGCGGGATGAATTAAAAGGAAT
GGTGAAATGAAAACGCGTAAAGGTATTATTCTGGCTGGTGGTTCCGGCACTCGTCTTTATCCTGTGACGATGGCAGT
GAGTAAACAACTGCTGCCGATTTATGATAAGCCGATGATTTATTATCCGCTTTCAACGCTTATGTTAGCGGGTATTC
GCGATATTCTTATTATCAGTACGCCACAGGATACACCGCGTTTCCAACAATTGTTGGGGGACGGGAGTCAGTGGGGG
CTTAATCTACAGTATAAAGTACAACCGAGTCCGGATGGCCTGGCGCAAGCGTTTATTATTGGTGAAGACTTTATTGG
TGGTGATGATTGTGCACTCGTACTTGGCGATAATATCTTCTATGGACACGACTTGCCGAAATTAATGGAAGCTGCTG
TTAACAAAGAAATCGGTGCAACGGTATTTGCTTATCACGTCAATGATCCTGAACGTTATGGTGTCGTGGAGTTTGAT
AATAACGGTACTGCAATTAGCCTGGAAGAAAAACCGCTGGAACCAAAAAGTAACTATGCGGTTACTGGGCTTTATTT
CTATGACAATGATGTTGTAGAAATGGCGAAAAACCTTAAGCCTTCTGCCCGTGGCGAACTGGAAATTACCGATATTA
ACCGTATTTATATGGAGCAGGGACGTTTGTCTGTCGCTATGATGGGGCGTGGTTATGCCTGGTTGGATACTGGTACA
CATCAAAGTCTTATTGAAGCAAGTAACTTCATTGCCACCATTGAAGAGCGTCAGGGATTAAAGGTATCTTGCCCGGA
AGAGATTGCTTACCGTAAAGGGTTTATTGATGCTGAGCAGGTGAAAGTATTAGCCGAACCGCTGAAGAAAAATGATT
ATGGTCAGTATCTGCTAAAAATGATTAAAGGTTATTAATAAAATGAACGTAATTAAAACTGAAATTCCTGATGTGCT
GATTTTTGAACCAAAAGTTTTTGGTGATGAACGTGGCTTCTTTTTTGAGAGTTTTAACCAGAAAGTATTTGAAGAAG
CTGTAGGACGGAAGGTTGAATTTGTTCAGGATAACCATTCTAAGTCTAAAATAAATGTATTGCGTGGGATGCATTAT
CAAACACAAAATACTCAAGGAAAACTGGTTCGGGTAATTTCTGGTTCAGTATATGATGTTGCCGTAGATTTAAGAGA
AAAATCAAAGACATTTGGCAAATGGGTGGGTGTAGAATTATCTGGGAATAATAAAAGACAATTGTGGATCCCCGAAG
GTTTTGCCCATGGTTTTTATGTGTTGGAGGAGAATACCGAATTTGTTTATAAATGTACCGATACTTATAACCCTGCT
CATGAACACACATTGCTATGGAATGATCCAACTATCAATATAAGTTGGCCAATCATACAAAACTGCAAGCCAATTAT
TTCTGAAAAAGATGCTAATGGACATCTTTTTTCACATAAAACCTATTTCTGAAATGCAATATTATGAGTTTAATTAG
AAACAGTTTCTATAATATTGCTGGTTTTGCTGTGCCGACATTAGTTGCAGTCCCTGCTTTGGGGATTCTTGCCAGGC
TGCTTGGACCGGAGAATTTTGGACTTTTCACACTAGCATTCGCTTTGATAGGATATGCAAGTATTTTCGACGCCGGG
ATTAGTCGAGCTGTAATCAGAGAAATCGCTCTTTATCGAGAAAGTGAAAAAGAGCAAATACAAATTATTTCGACAGC
AAGTGTAATCGTACTATTCTTAGGGGTGGTTGCAGCTTTGTTACTTTATTTTAGTAGTAATAAAGTTGTTGAGTTAT
TGAATGTTAGTTCCGTTTATATTGAAACAGCAGTGCGTGCATTCTCTGTTATTTCATTTATAATACCTGTGTATCTG
ATTAACCAGATTTGGCTTGGTTATCTGGAAGGGCTAGAAAAATTTGCAAATATAAATGTTCAGAGAATGATTTCTAG
CACAAGCTTGGCTATATTACCAGTGATATTTTGTTATTACAATCCCTCGTTGCTTTATGCTATGTATGGGTTGGTGG
TTGGGCGTGTGATTTCATTTTTGATTAGCGCAATAATTTGTCGAGATATTATTCTTAAAAGTAAACTTTACTTTAAT
GTGGCAACTTGCAATCGTCTTATCTCTTTTGGTGGATGGATAACAGTTAGTAATATCATAAGCCCAATCATGGCATA
TTTCGACCGCTTTATCATCTCTCATATTATGGGGGCTTCGAGAATTGCATTTTATACAGCGCCCTCAGAGGGTGTAT

CAAGGTTAATTAATATCCCATATGCTTTGGCAAGAGCTCTATTTCCTAAATTGGCATATAGCAATAATGATGATGAA
CGAAAAAAATTACAACTACAGAGCTACGCAATTATAAGCATTGTATGTCTACCCATAGTTGTTATTGGTGTCATTTT
TGCCTCATTCATAATGACAACATGGATGGGACCTGATTATGCCTTAGAAGCAGCAACTATCATGAAAATACTTCTTG
CTGGTTTTTTCTTTAACTCTTTAGCGCAAATACCTTATGCATACTTGCAATCTATCGGAAAGTCAAAAATTACCGCA
TTTGTGCATCTCATAGAACTTGCGCCATACTTATTATTATTGTATTACTTCACAATGCATTTCGGCATAATTGGCAC
GGCAATCGCTTGGTCACTTAGAACATTTTGTGATTTTGTTATACTACTTTCGATATCGAGAAGAAAATGATTGCGGT
TGATATTGCGCTTGCAACCTACAATGGTGCTAATTTTATTCGGCAACAGATTGAATCTATCCAGAAACAAACTTATA
GAAATTGGCGTCTTATAATAAGTGATGATAACTCGAGTGATGATACTGTTGATATTATTAAGGATATGATGTCTAAC
GACAGTCGTATCTATTTGGTAGGAAATAAAAGACAAGGAGGGGTTATTCAGAACTTTAATTATGCTCTTTCACAAAC
TACATCTGAAATTGTGTTACTATGTGACCAGGATGACATTTGGCCGGAGGAGCGTCTGGAAATTCTTATAGATAAAT
TTAAGGCCTTGCAGCGTAATGATTTTGTTCCGGCAATGATGTTTACTGATTTGAAATTAGTAGACGAAAATAATTGT
TTGATTGCAGAAAGTTTTTATCGAACGAATAATATTAATCCACAAGATAATCTGAAAAATAATAATCTTCTCTGGCG
TTCAACGGTATATGGCTGTACTTGCATCATGAATAAGAAACTTGTTGATATTGCATTGCCTATACCTACATATGCAC
ATATGCATGATCAATGGTTGGCATTATTAGCGAAGCAATATGGTAACATTTTTTATTTCGACTATGCGTCTGTTCGT
TATAGGCAACATTCTACAAATGTTGTTGGTGGTAGAAATAAAACGCCATTTCAAAAATTTAATTCCATACAAAAAAA
CCTAAAAAGGATTAATTTGCTAGTGGATAGAACTGTTGCTTTAATTAAATCAAATAACGATTTCTATCCAGGGAATA
AAATGGAAAATAAAATTGATTACTTAAAATTTGGAGTGAATGAAGTATTACCTTATCTTTTTAAAGGAAACAAGAAA
GTTTTTTCACTTTGTGTATTAATTAGTTTGGCATTACAAAAATGATATATTTATTATTTTTTTTTGCACTGTTTATG
ATCTGTACGTTTTTAACACACAGGCGACAGGCATTATATGTTGTATCTGCGTTAGTATTTCTTTTTTTGGCTTTAAC
CTATCCATCAGGAGGGGACTGGATAGGTTATTTTCTCCATTATGACTGCATGGTTAATGAGCAGTGTAATAATGGTT
TTATAATGTTTGAACCTGGATATGAATTAATTGTTTCCTTATTTGGATATTTGGGATTTCAGACAATTATTATTTTT
ATAGCCGCTGTAAATGTAATTCTAATATTAAATTTTGCAAAGCATTTTGAAAACGGAAGTTTTGTTATTGTTGCGAT
AATGTGCATGTTCCTTTGGAGTGTTTATGTTGAGGCGATTAGACAGGCTCTGGCCTTATCTATAGTTATATTTGGGA
TTCATTCTCTTTTTTTGGGTAGAAAAAGGAAATTTATAACATTAGTATTATTTGCGTCAACTTTCCATATAACTGCT
TTGATTTGTTTTCTTCTAATGACTCCTCTATTTTCAAAGAAATTAAGCAAGATAATAAGTTATAGCCTATTAATTTT
CAGTAGCTTCTTTTTCGCTTTTTCTGAAACCATATTAAGTGCACTCCTTGCAATTTTGCCAGAAGGATCCATTGCCA
GTGAAAAATTAAGTTTTTACTTAGCAACCGAGCAATACAGGCCACAGTTATCTATTGGGAGTGGCACTATTCTTGAC
ATTATACTTATTTTTCTGATATGTGTAAGTTTTAAACGAATAAAGAAATATATGCTCGCTAATTATAATGCTGCAAA
TGAGATATTGCTTATTGGTTGCTGTCTTTATATTTCTTTCGGTATTTTTATCGGGAAAATGATGCCAGTTATGACTC
GCATTGGTTGGTATGGTTTTCCATTTGTTATAGTACTTCTTTATATTAACTTGGGTTATTCAGAATATTTTAAGAGG
TATATAAATAAAAGAGGGTGTGGGTATAGCAAATTATTAATTGCTTTTTATTTTTTGCTACAAATTTTGCGACCATT
AACATATGATTATAGCTATTATAATATAATGCACCAGGATACTTTGCTGAATAGGTTTGATGCATTAGATGATGCAT
CATTAAGACAATCAGCGAAGAGAAAATGTTTCGATTTGGGAAAGATAGGATATGGTTTCTTATGTAGTATATAATAT
CCTGCATTCATTCGGATAATTTCCTATGGAAGTGTCCTTTGCTCTGTCTGTCCTCATTTGTTGAAATTTTATGTTAA
TAAGAAGCTTTAGATAACCACTTAGGAACTGTATGTTTGATCTGTCCAAAAATTATATTATTGTAAGTGCGACGGCG
CTGGCTTCCGGAGGTGCATTAACTATATTAAAGCAATTTATAAAACATGCATCACAAAATTCAAATGACTATATTAT
GTTTGTATCTGCGGGATTGGAGTTGCCGGTCTGTGATAACATCATTTACATAGAAAACACACCAAAAGGATGGTTGA
AAAGAATATATTGGGATTGGTTCGGTTGTCGGAAGTTTATCTCGGAACATAAGATTAACGTTAAGAAAGTAATTTCT
CTACAAAATTCCAGTTTGAATGTTCCTTACGAACAGATTATTTACTTGCACCAGCCAATTCCTTTTAGTAAAGTTGA

TTCTTTTTTAAAAAATATCACATCCGATAACGTAAAGCTTTTTTTATATAAAAAGTTTTATTCCTATTTTATATTTA
AATATGTGAATGCCAATACAACCATCGTAGTGCAAACGAATTGGATGAAAAAAGGAGTGCTGGAGCAATGTGATAAA
ATTAGTACCGAAAGGGTCCTTGTTATAAAACCTGATATCAAAGCATTTAATAATACTAATTTTGATGTAGATATGGA
TGTATCTGCAAAAACACTCTTATATCCAGCGACACCACTTACCTATAAAAATCATTTGGTCATTCTGAAGGCGTTGG
TTATTTTAAAGAAAAAGTATTTTATAGATGATCTGAAATTCCAAGTGACTTTTGAAAAGAATAGGTACAAAAATTTT
GATAAGTTTGTGCAATTAAATAACTTAAGCAAAAACGTTGATTATCTCGGCGTTCTTTCATACTCGAACTTGCAAAA
AAAATATATGGCGGCATCTTTAATCGTTTTTCCTAGCTATATCGAATCATATGGGTTACCACTCATCGAAGCTGCTA
GTTTAGGAAAAAAAATCATTAGTAGTGATCTTCCTTATGCCCGGGATGTTTTAAAGGATTATAGCGGCGTAGATTTT
GTAATTTACAATAATGAAGATGGCTGGGCTAAGGCGTTGTTTAATGTTTTAAATGGCAATTCGAAGCTCAATTTTAG
GCCTTATGAAAAAGATAGTCGTTCATCTTGGCCACAGTTCTTCTCTATTTTGAAATAAGGTGTATTATGTTTAATGG
TAAAATATTGTTAATTACTGGTGGTACGGGGTCTTTCGGTAATGCTGTTCTAAGACGTTTTCTTGACACTGATATCA
AAGAAATACGTATTTTTTCCCGGGATGAAAAAAAACAAGATGACATGAGGAAAAAATATAATAATCCGAAACTTAAG
TTCTATATAGGTGATGTTCGCGACTATTCGAGTATCCTCAATGCTTCTCGAGGTGTTGATTTTATTTATCATGCTGC
AGCTCTGAAGCAAGTACCTTCCTGCGAATTCCACCCAATGGAAGCTGTAAAAACGAATGTTTTAGGTACGGAAAACG
TACTGGAAGCGGCAATAGCTAATGGAGTTAGGCGAATTGTATGTTTGAGTACAGATAAAGCTGTATATCCTATCAAT
GCAATGGGTATTTCCAAAGCGATGATGGAAAAAGTAATGGTAGCAAAATCGCGCAATGTTGACTGCTCTAAAACGGT
TATTTGCGGTACACGTTATGGCAATGTAATGGCATCTCGTGGTTCAGTTATCCCATTATTTGTCGATCTGATTAAAT
CAGGTAGACCAATGACGATAACAGACCCTAATATGACTCGTTTCATGATGACTCTCGAAGACGCTGTTGATTTGGTT
CTTTACGCATTTGAACATGGCAATAATGGTGATATTTTTGTCCAAAAGGCACCTGCGGCTACCATCGAAACGTTGGC
TATTGCACTCAAAGAATTACTTAATGTAAACCAACACCCTGTAAATATAATCGGCACCCGACACGGGGAAAAACTGT
ACGAAGCGTTATTGAGCCGAGAGGAAATGATTGCAGCGGAGGATATGGGTGATTATTATCGTGTTCCACCAGATCTC
CGCGATTTGAACTATGGAAAATATGTGGAACATGGTGACCGTCGTATCTCGGAAGTGGAAGATTATAACTCTCATAA
TACTGATAGGTTAGATGTTGAGGGAATGAAAAAATTACTGCTAAAACTTCCTTTTATCCGGGCACTTCGGTCTGGTG
AAGATTATGAGTTGGATTCATAATATGAAAATTTTAGTTACTGGCGCTGCAGGGTTTATCGGTCGAAATTTGGTATT
CCGGCTTAAGGAAGCTGGATATAACGAACTCATTACGATAGATCGTAACTCTTCTTTGGCGGATTTAGAGCAGGGAC
TTAAGCAGGCAGATTTTATTTTTCACCTTGCTGGGGTAAATCGTCCCGTGAAGGAGTGTGAATTTGAAGAGGGAAAT
AGTAATCTAACTCAACAGATTGTTGATATCCTGAAAAAAAACAATAAAAATACTCCTATCATGCTGAGTTCTTCCAT
CCAGGCTGAATGTGATAACGCTTATGGAAAGAGTAAAGCAGCTGCGGAAAAAATCATTCAGCAGTATGGGGAAACGA
CAAACGCTAAATATTATATTTATCGCTTGCCGAATGTATTCGGTAAGTGGTGTCGACCAAATTATAACTCCTTTATA
GCAACTTTCTGCCATCGCATTGCAAATGATGAAGCTATTACAATTAATGATCCTTCAGCAGTTGTAAATCTGGTGTA
TATAGATGACTTTTGTTCTGACATATTAAAGCTATTAGAAGGAGCGAACGAAACTGGTTACAGGACATTTGGTCCAA
TTTATTCTGTTACTGTTGGTGAAGTGGCACAATTAATTTACCGGTTTAAAGAAAGTCGCCAAACATTAATCACCGAA
GATGTAGGTAATGGATTTACACGTGCATTGTACTCAACATGGTTAAGTTACCTGTCTCCTGAACAGTTTGCGTATAC
GGTTCCTTCTTATAGTGATGACAGAGGGGTATTCTGTGAAGTATTGAAAACGAAAAACGCGGGCCAGTTTTCGTTCT
TTACTGCGCATCCAGGAATTACTCGGGGTGGTCATTATCATCATTCCAAAAATGAGAAATTTATTGTCATCCGAGGA
AGTGCTTGTTTCAAATTTGAAAATATTGTCACGAGTGAACGATATGAACTTAATGTTTCCTCTGATGATTTTAAAAT
TGTTGAAACAGTTCCGGGATGGACGCATAACATTACTAATAATGGCTCGGATGAGCTAGTTGTTATGCTTTGGGCAA
ATGAAATATTTAATCGTTCTGAACCAGATACTATAGCGAGAGTTTTATCGTGAAAAAATTGAAAGTCATGTCGGTTG
TTGGGACTCGTCCAGAAATTATTCGACTCTCGCGTGTCCTTGCAAAATTAGATGAATATTGTGACCACCTTATTGTT

CATACCGGGCAAAACTACGATTATGAACTGAATGAAGTTTTTTTCAAAGATTTGGGTGTTCGCAAACCTGATTATTT
TCTTAATGCCGCAGGTAAAAATGCAGCAGAGACTATTGGACAAGTTATCATTAAAGTTGATGAGGTCCTTGAACAGG
AAAAACCAGAAGCCATGTTAGTACTTGGCGATACTAACTCCTGTATTTCAGCAATACCAGCAAAGCGTCGAAGAATT
CCGATCTTCCATATGGAGGCTGGGAATCGTTGTTTTGACCAACGCGTACCGGAAGAAACTAACAGAAAAATAGTTGA
TCATACCGCTGATATCAATATGACATATAGTGATATCGCGCGTGAATATCTTCTGGCTGAAGGTGTACCAGCCGATA
GAATTATTAAAACCGGTAGCCCAATGTTTGAAGTACTCACTCATTATATGCCGCAGATTGATGGTTCCGATGTACTT
TCTCGCCTGAATTTAACACCTGGGAATTTCTTTGTGGTAAGTGCCCACAGAGAAGAAAATGTTGATACCCCTAAACA
ACTTGTGAAACTGGCGAATATACTTAATACCGTGGCTGAAAAATATGATGTCCCGGTAGTTGTTTCTACTCATCCTC
GCACTCGTAACCGCATCAACGAAAACGGTATTCAATTCCATAAAAATATCTTGCTTCTTAAGCCATTAGGATTTCAC
GATTACAACCATCTGCAAAAAAATGCACGTGCTGTTTTATCGGATAGTGGGACTATTACAGAAGAGTCCTCCATTAT
GAACTTCCCTGCACTCAATATACGAGAAGCGCACGAACGCCCGGAAGGCTTCGAAGAAGGGGCAGTAATGATGGTCG
GTCTTGAATCTGATCGCGTTTTACAGGCATTAGAAATTATTGCAACACAGCCTCGTGGAGAAGTACGCTTACTTCGT
CAGGTTAGTGACTATAGCATGCCAAATGTTTCAGATAAAGTTCTGCGTATTATCCATTCATATACTGACTACGTTAA
ACGGGTTGTCTGGAAGCAATACTAATGAAACTTGCATTAATCATTGATGATTATTTGCCCCATAGCACACGCGTTGG
GGCTAAAATGTTTCATGAGTTAGGCCTTGAATTACTGAGCAGAGGCCATGATGTAACTGTAATTACGCCTGACATCT
CATTACAAGCAATTTATTCTATTAGTATGATTGATGGTATAAAGGTTTGGCGTTTCAAAAGTGGACCTTTAAAGGAT
GTAGGTAAGGCTAAACGTGCCATAAATGAAACTCTTTTATCTTTTCGCGCATGGCGCGCATTTAAGCACCTCATTCA
ACATGATACATTTGATGGTATCGTTTATTATTCCCCCTCTATTTTTTGGGGCGACTTGGTTAAAAAAATAAAACAAC
GATGCCAGTGCCCAAGCTATCTGATCCTAAGGGATATGTTTCCACAGTGGGTCATTGATGCAGGTATGTTGAAAGCC
GGTTCACCAATTGAAAAATATTTTAGGTATTTTGAAAAAAAGTCATATCAGCAGGCTGGCCGGATAGGGGTAATGTC
TGATAAGAATCTTGAGATATTTCGCCAGACCAATAAAGGTTATCCGTGTGAAGTTTTACGTAATTGGGCCTCAATGA
CTCCTGTGTCTGCCAGCGATGATTATCATTCACTTCGTCAAAAATACGATCTAAAAGATAAAGTCATTTTTTTCTAT
GGCGGTAATATTGGGCATGCTCAGGATATGGCAAACTTAATGCGCCTTGCGCGTAATATGATGCGTTATCATGATGC
TCATTTCCTGTTTATAGGGCAGGGTGATGAAGTTGAGCTGATAAAATCTCTTGCTGCAGAATGGAATTTAACTAATT
TCACTCATCTACCTTCAGTGAACCAGGAAGAGTTTAAATTAATTTTATCTGAAGTTGATGTCGGCCTGTTCTCCCTT
TCATCTCGCCATTCTTCACATAATTTCCCCGGAAAATTACTAGGGTATATGGTTCAATCAATCCCGATCCTTGGGAG
TGTGAATGGCGGCAATGATTTAATGGATGTAATTAATAAGCACAGAGCCGGTTTCATTCATGTTAATGGTGAAGATG
ATAAACTGTTTGAATCTGCACAATTGCTTCTTAGTGATTCAGTTTTAAGAAAACAGCTAGGTCAGAACGCTAATGTG
TTGTTAAAGTCTCAATTTTCGGTTGAATCGGCGGCACATACTATCGAAGTCCGACTGGAGGCTGGAGAATGCGTTTA
GTTGATGACAATATTCTGGATGAACTTTTTCGCACTGCAGCAAATTCTGAACGTTTGCGCGCTCATTATTTATTGCA
CGCATCTCATCAGGAGAAGGTTCAACGTTTACTTATTGCATTTGTACGCGACAGCTATGTTGAACCCCATTGGCATG
AGTTACCGCATCAGTGGGAAATGTTTGTCGTCATGCAAGGGCAATTAGAAGTTTGTTTGTATGAGCAAAATGGTGAG
ATCCAAAAACAGTTTGTTGTTGGAGACGGTACGGGAATAAGCGTCGTGGAATTTTCCCCAGGAGATATACATAGTGT
CAAATGCCTGTCACCAAAAGCCCTTATGTTGGAGATAAAGGAGGGGCCATTTGACCCACTCAAAGCTAAGGCTTTTT
CTAAGTGGTTATAGGGCGATACACCACCGTTTATTCTTCTATCTTATTCTATACATGCTGGGTTACCATCTTAGCTT
CTTCAAGCCGCGCAACCCCGCGGTGACCACCCCTGACAGGAGTAGCTAGCATTTGACCACCCCTGACAGGATTAGCT
AGCATATGAGCTCGAGGATATCTACTGTGGGTACCCGGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACT
TTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATAT

[0884] SEQ ID NO:10(EPA载体蛋白的信号序列实例)

[0885] MKKIWLALAG LVLAFSASA

[0886] SEQ ID NO:11(O1A rfb基因座核苷酸序列实例-O1A-EPA生产菌株stGVXN4411和stLMTB10217)

[0887] ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCG
ATACCCAAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGAT
CAAAGAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAAT
CACTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG
AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCATT
TGTCGTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATGATTG
CACGTTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCCGTCATC
CAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGATCAGCCGCA
GACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTCGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAACTGGAACGTACTC
AGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCCGTTGATGCAATG
CTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAGTATGGCCTACGCAA
CCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAATCTGACCGGATGTAAC
GGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAATCTTCCTGCCGTTGTTTT
ATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCAGGATTTTCCTTGTTTCCAGA
GCGGATTGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTAACGCTCGTCACATCATAGGCAT
GCATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATACCTCTATTAATCAAACTGAGAGCCG
CTTATTTCACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGCTAGCGTGAAGATACTTGTTACTAGGGGCGCAGG
ATTTATTGGTTCTGCTGTAGTTCGTCACATTATAAATAATACGCAGGATAGTGTTGTTAATGTCGATAAATTAACGT
ACGCCGGAAACCTGGAATCACTTGCTGATGTTTCTGACTCTGAACGCTATGTTTTTGAACATGCGGATATTTGCGAT
GCTGCTGCAATGGCGCGGATTTTTGCTCAGCATCAGCCGGATGCAGTGATGCACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTGGA
TCGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTTGGTACTTATGTCCTTTTGGAAGCGGCTCGCA
ATTACTGGTCTGCTCTTGATGGCGACAAGAAAAATAGCTTCCGTTTTCATCATATTTCTACTGACGAAGTCTATGGT
GATTTGCCTCATCCTGACGAAGTAAATAATAAAGAACAATTACCCCTCTTTACTGAGACGACAGCTTACGCGCCTAG
TAGTCCTTATTCCGCATCAAAAGCATCCAGCGATCATTTAGTCCGCGCGTGGAAACGTACCTATGGTTTACCGACTA
TTGTGACTAACTGTTCGAATAACTACGGTCCTTATCACTTTCCGGAAAAATTGATTCCACTAGTAATTCTTAATGCT
CTGGAAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAAAGGGGATCAAATTCGTGACTGGCTGTATGTTGAAGATCATGCGCG
TGCGTTATATACCGTAGTTACTGAAGGTCAAGCGGGTGAAACCTATAACATTGGCGGACACAACGAAAAGAAAAACA
TCGATGTTGTGCTGACTATTTGTGATTTGTTGGACGAGATAGTCCCGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAAATTACT
TATGTTGCTGATCGCCCAGGGCATGATCGCCGTTATGCGATTGATGCTGAGAAGATTGGTCGCGAATTGGGATGGAA
ACCACAGGAAACGTTTGAGAGTGGGATTCGTAAAACGGTGGAATGGTATTTGGCTAATGCAAAATGGGTTGATAATG
TGAAAAGTGGTGCCTATCAATCGTGGATTGAACAGAACTATGAGGGCCGCCAGTAATGAATATCCTCCTTTTTGGCA
AAACAGGGCAGGTAGGTTGGGAACTACAGCGTGCTCTGGCACCTCTGGGTAATTTGATTGCTCTTGATGTTCACTCC
ACTGATTACTGTGGTGATTTTAGTAACCCTGAAGGTGTGGCTGAAACAGTCAAAAGAATTCGACCTGATGTTATTGT
TAATGCTGCGGCTCACACCGCAGTAGATAAGGCTGAGTCAGAACCCGAATTTGCACAATTACTCAATGCGACTAGCG
TTGAATCAATTGCAAAAGCGGCAAATGAAGTTGGGGCTTGGGTAATTCATTACTCAACTGACTACGTATTCCCTGGA
AATGGCGACACGCCATGGCTGGAGATGGATGCAACCGCACCGCTAAATGTTTACGGTGAAACCAAGTTAGCTGGAGA

AAAAGCATTACAAGAGCATTGTGCGAAGCACCTAATTTTCCGTACCAGCTGGGTCTATGCAGGTAAAGGAAATAATT
TCGCCAAAACGATGTTGCGTCTGGCAAAAGAGCGTGAAGAACTAGCCGTTATTAATGATCAGTTTGGTGCGCCAACA
GGTGCTGAACTGCTGGCTGATTGTACGGCACATGCCATTCGTGTCGCACTGAATAAACCGGATGTCGCAGGCTTGTA
CCATTTGGTAGCCAGTGGTACCACAACCTGGTACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAATGCAGGCA
TTCCTCTTGCACTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAACAACTGCCTATCCTACACCAGCTCGTCGTCCACATAACTCT
CGCCTTAATACAGAAAAATTTCAGCAGAATTTTGCGCTTGTATTGCCTGACTGGCAGGTTGGTGTGAAACGCATGCT
CAACGAATTATTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTGATGGTGGAGCAAGATGAATTAAAA
GGAATGATGAAATGAAAACGCGTAAAGGTATTATTTTAGCGGGTGGTTCTGGTACTCGTCTTTATCCTGTGACTATG
GTCGTCAGTAAACAGCTATTACCTATATATGATAAACCGATGATCTATTATCCGCTTTCTACACTGATGTTAGCGGG
TATTCGCGATATTCTGATTATTAGTACGCCACAGGATACTCCTCGTTTTCAACAACTGCTGGGTGACGGTAGCCAGT
GGGGCCTGAATCTTCAGTACAAAGTGCAACCGAGTCCGGATGGTCTTGCGCAGGCATTTATTATCGGTGAAGAGTTT
ATTGGTGGTGATGATTGTGCTTTGGTACTTGGTGATAATATCTTCTACGGTCACGACCTGCCTAAGTTAATGGATGC
CGCTGTTAACAAAGAAAGTGGTGCAACGGTATTTGCCTATCACGTTAATGATCCTGAACGCTATGGTGTCGTTGAGT
TTGATAAAAACGGTACGGCGATCAGCCTGGAAGAAAAACCGCTACAACCAAAAAGTAATTATGCGGTAACCGGGCTT
TATTTTTATGATAACGACGTTGTCGAAATGGCGAAAAATCTTAAGCCTTCTGCCCGCGGTGAACTGGAAATTACCGA
TATTAACCGTATCTATATGGAACAAGGGCGTTTATCTGTTGCCATGATGGGGCGTGGTTATGCGTGGTTAGACACGG
GGACACATCAGAGCCTGATTGAGGCAAGCAACTTTATTGCAACAATTGAAGAGCGTCAGGGGCTGAAAGTTTCCTGC
CCGGAAGAAATTGCTTACCGTAAAGGGTTTGTTGATGCTGAGCAGGTGAAAGTATTAGCTGAACCTCTGAAAAAAAA
TGCTTATGGTCAGTATCTGCTGAAAATGATTAAAGGTTATTAATAAAATGAACGTAATTAAAACAGAAATTCCTGAT
GTACTGATTTTTGAACCGAAAGTTTTTGGTGATGAGCGTGGTTTCTTTTTTGAGAGCTTTAACCAGAAGGTTTTTGA
GGAAGCTGTAGGCCGCAAAGTTGAATTTGTTCAGGATAACCATTCGAAGTCTAGTAAAGGTGTTTTACGCGGGCTGC
ATTATCAGTTGGAACCTTATGCACAAGGAAAATTGGTGCGTTGCGTTGTCGGTGAAGTTTTTGACGTAGCTGTTGAT
ATTCGTAAATCGTCATCGACTTTTGGCAAATGGGTTGGGGTGAATTTATCTGCTGAGAATAAGCGGCAATTGTGGAT
TCCTGAGGGATTTGCACATGGTTTTTTAGTGCTGAGTGAGACGGCGGAGTTTTTGTATAAGACGACAAATTATTATC
ATCCTCAGAGTGATAGAGGAATAAAATGGGATGATCCAAGCATCAATATTTCATGGCCAGTCGATTCACAAGTGCTG
CTATCAGCTAAAGATAATAAGCATCCTCCATTAACAAAGATTGAAATGTATAGTTAAGATCACGATAAATCTTGGAA
GGGTTGCAAAATTGAATAAAATAGTGAGCAAAAGTGAAATAAGGAACGTAATCCACAATGCTGGCTATATGATGATT
ACTCAGATAGCTTTATATGTTGCACCATTATTTATACTGAGTTATCTGTTAAAAACACTGGGGGTTGCACAGTTTGG
TAATTATGCCTTAATACTATCAATCGTTGCATATTTACAGATTATAACGGATTATGGTTTTTCTTTTAGTGCAAGTC
GTGCGATCTCACAGAATAGAGAGGACAAAGAATATATATCAAAAATTTATCTGTCAACTATGACTATCAAGTTGGCG
ATATGCGCTTTCTTATTCTTATTGCTCATGCTATTTTTAAATCTTTTGCCTGTGCAAGCTGAATTAAAACAAGGAAT
ATTATATGGATATCTTCTTGTAATAGGAAATACTTTCCAACCACAATGGTTTTTCCAAGGTATCGAAAAATTAAAAA
TCATAGCCCTTTCTAATGTTATATCAAGATGCGCCGCGTGTTTACTTGTATTTATCTATGTGAGGAATAGCGAGGAT
TTACAAAAAGCACTTTTAGTACAGTCACTTCCATTAGTAATTTCTGCGATTGGATTAAATATATTTATATTGAAATA
TATCAATATTATTTTTCCGGAAAAAAAATTATTTAAGGTAATTTTAAAAGAAGGTAAGGATTTTTTTCTTGCATCAC
TTTATTCTGTTATTCTCAATAATAGTGGCATTTTTCTATTAGGGATTTTTACTAATCCTGTTATTGTTGGTGTATAT
GCCGCCGCTGAAAAGATAGTCAAGGCCGTATTGTCGCTATTTACACCACTGACGCAAGCTATATATCCTTATAATTG
TCGTAAGTTTTCACTATCCGTATTTGACGGCATTGAGGCAGCAAAAAAAACTGGTATACCAATTATAATTTTAGCAT
TTATAGCTGCTGTTATCGTTGCAATTACCTTACCTGTTGCAATCGACTATCTTAATTTTCCAAAAGAAACAATTTTT

GTAGGTCAAATATTAAGTGCATGGATCTTTTTTGGTGTTCTTAATAATGTATTCGGCATTCAGATATTGAGTGCATC
AGGAAGAAGTAAAATATATAGTAGGATGGTATTCGTATCAGCGCTTATAACATTACTTTTGATTACTCTATTATTGC
AGTTTTGTAACGCCACTGGAGTGGCATGTGCAATATTATTGGGTGAAATGTTCTTATCAATATTGTTACTTAAGCGA
TATAAAAAAATAATTTAAGGAATAGTTATGAAGAAGTTATTATTAGTGTTCGGTACTAGGCCTGAAGCAATAAAGAT
GGCCTCTATCATTGAATTATTAAAAAAAGATTGTAGATTCGAATATAAAATATGTGTGACAGGCCAACATAAAGAGA
TGCTTGATCAAGTTATGCAAGTATTTGATGTTAAACCTGATTATAATTTACGGATTATGCAGCCTGGGCAAACATTA
GTATCTATAGCAACAAATATACTCTCACGGTTAAGTGAAGTTTTAATTATAGAAAAGCCAGATATTATACTTGTGCA
TGGGGATACAACGACTACCCTTGCTGCTACTTTAGCTGGGTATTACCACCAAATAAAAGTTTGTCATGTGGAAGCAG
GATTAAGAACAGGGGATATTTACTCTCCTTGGCCTGAAGAGGGCAATCGTAAAGTTACAGGGGCATTAGCATGTATT
CATTTCGCCCCAACAGAGAGATCAAAAGATAATCTCCTGAGGGAGGGGGTCAAAGTAAATAATATATTTGTAACGGG
TAATACCGTCATCGACTCTTTATTTATTGCAAAAGATATCATAGATAATGACCCTAATATAAAGAACGCTTTACATA
ATAAATTTAATTTTCTTGATAAAAGCCGACGAGTAGTACTTATAACAGGTCATCGAAGAGAAAATTTCGGGAAAGGT
TTTGAAGATATATGCTTTGCAATAAAGGAATTAGCTTTCATTTATCCTAATGTAGATTTTATTTATCCGGTGCATCT
TAATCCCAATGTAATGGAACCAGTACATCGTATATTAGATAATATATGTAATATTTACCTTATTGAGCCCTTGGATT
ATTTGCCTTTTGTTTATTTAATGAATGAGTCATATTTAATATTGACTGATTCAGGGGGGATACAAGAAGAAGCGCCT
TCGTTAGGTAAACCGGTTTTGGTTATGCGTGATACTACTGAACGCCCTGAGGCGGTTGAGGCTGGTACTGTTGTATT
AGTGGGGACTTCTAAGATAAAAATAGTAAATAAAGTAACGGAGCTATTAAACAATGCTGATATCTACAATGCTATGT
CTCTGTTACATAATCCATATGGCGATGGAACAGCTGCTCAAAAAATTCTTAATGTGCTCGCCCAAGAGCTAATTTAA
TTTAAGCTAAAAATATGTTATTAATTATTGCTGATTATCCAAACGAAATGAATATGCGCGAGGGAGCTATGCAACGA
ATAGATGCGATAGACTCTCTCATTCGAGATCGCAAGCGAGTGTATTTGAATATTTCATTCAAAAAGCATCTAGTTCG
CTCAAATAGTTCCTTTAATAATGTTATAGTTGAAAATCTAAATGCAATTATTCACAGAAACATCATAAAACAGTACA
TGCAAAAATCAACAACTATATATGTTCATTCTGTTTATAATTTATTAAAGGTTATAACGCTCATTGATCTAAAAAAA
ACAATTCTTGATATACATGGTGTTGTACCGGAAGAACTTTTGGCAGATAATAAAAAATTACTTAGTAAAGTATATAA
CATGGTGGAAAAAAAAGGTGTCCTTGGATGCAAAAAATTAATACACGTCAGTACAGAAATGCAAAAACACTATGAAG
CAAAATATGGAGTAAACTTGGCTGAAAGGTCAATAGTGCTCCCGATTTTTGAATATAAAAATATAACCCAATCGCAA
AACAAATGGACAGAAAATAAAATACGAAGTATCTATCTTGGAGGATTACAAACATGGCAAAATATTGATAAAATGAT
TCAAGTTTGTGATGACACAGTGATAAACAATGAAGCAGGTAAGTATGAATTCAACTTTTTCATCCCACAGAGTAACT
TGGAAGGGTTTATAGATAAATATTCGTTAAAATTACATAATATCAATGCTAATGCATCTACGCTATCACGTGATGAA
GTAATTCCCTTTCTAAAAGAATGTCATATTGGTTTTGTATTGCGCGATGATATAATAGTAAACAGAGTTGCGTGCCC
TACAAAATTGGTTGAATATTTAGAGTGTGGTGTCGTTCCAGTTGTGCTCTCCCCACTTATAGGTGATTTTTATTCGA
TGGGATATCAATACATTACTACAGAGGAAATGGCTAACAGAAGTATAAGTTTGTTGGATCTTGAAAAAATGGCTGCA
CATAATTTACAAATTTTGACTTCTTATCAGAAGAGAACCTACAAGGCACAGAAAGAACTTATTGCTCAACTGTGCTG
AATTTTTTACATATATAAAATTATGTAAGCATATCGCGGGTCAGGTAATTGTATGCGTATCAAATATAAAGATAACG
GTTATATATTATGTTTTCTATTATGTTTCATTTTGAGCTACTTAGTTTTACTCAAATCTGACTACTTTCCTGCTGAT
TTTCTGCCATATACAGAAATATACGATGGGACATACGGAGAAATCAATAATATTGAGCCTGCCTTTTTATATTTAAC
ACGGTTGTTTCATTATTTAAATTTCCCCTATATATTTTTTGCAATGTTAGTTTGTGCCTTATGTTTAAGTTGGAAAA
TAAAATATGCAAGAAAAATAATTAAAGATAGTTATATATATTTGTTCTTGTATGTATATGTATCATTTTATGTGTTT
TTGCATGAAATGACTCAATTGCGCATAGCAATTGCAGTCACTATGTGCTATGTGTCGGTTTATTATTACTTTTATAA
AAATTGTATTAAACATGCACTGCCATGGATGGTGTTGGCTATTTTGTTTCATTACAGCGCCTTGCTTTTATTTATGT

CATTATTTATATACAGTTATAGGAGGTTATTAATAGTAATTATAGGGTTTGTAATATGTATGAGCTTTTTAAACGTG
TATGCAGATACAATTGCACTATATTTGCCAAATGAAAAAATAGTAAATTATTTATATAGTATTTCATCATCATTAGA
CAATAGAAATGATTTGGCAATATTCAACCTGAATAATATAATATTTTTATCAATATTTATTTTGATCTTTTATCTTA
GCCGATATATAAAATTAAATGATAATGAGGCGAAGTTTATTAAGTATGTGCAATGTTCAGGAATATTAGCCTTTTGT
ATTTTCTTTCTGGCTAGTGGAGTCCCGGTCATTGCTTATCGAACTGCAGAGTTGCTGCGAATATTTTATCCGATGGC
TTTAGTATTAATCCTTTCGCATATAAAAAATAATAATATGCGTTATTTTATTGCAGTCATTATAGTTATCCTTTCAG
GCTTAATGTTGTTTATAACACTAAGGGCTGTATCAATAGTTGGTCAAGGATTATAAAATGAATGTTGCTATTTTGTT
GTCTACGTATAATGGCGAAAAATATTTAGAGGAACAACTGGATTCATTGCTGCTTCAAAGTTATCAGGATTTTGTAG
TGTATATCCGTGATGACGGATCATCTGATAGAACTGTAAATATAATAAACCAATACGTAATGAAAGATAACAGATTT
ATTAACGTGGGTAATTCAGAAAATCTTGGTTGTGCTGCTTCGTTTATTAATTTATTAAGAAATGCTTCAGCCGATAT
TTATATGTTTTGTGACCAAGATGATTATTGGCTTCCGAATAAATTACAGCGTGCTGTGGATTATTTTTCGGCTATTG
ATCCTTTACAACCTACCTTGTATCATTGCGATCTAAGCGTTGTTGATGAAAAACTTAATATTATACAAAATTCATTT
TTGCAGCATCAGAAAATGTCAGCGTATGATTCAATGAGAAAAAATAATCTTTTCATACAAAATTTTGTTGTTGGTTG
TTCATGTGCTGTTAATGCTTCACTTGCGGAATTTGTTCTTTCGCGAATTGGAGAGCAGCATGTAAAAATGATAGCTA
TGCATGACTGGTGGTTAGCCGTGACTGCAAAACTTTTTGGTCGAATCCATTTTGATAATACTCAAACGATTCTTTAT
CGACAACATCAGGGCAATGTATTAGGTGCAAAATCATCAGGTATGATGCGTTTTATTCGATTAGGATTAAATGGGCA
AGGGATTTCGCGAGTAGTATCTTTTAGAAAAAAAGTTTGTGCGCAAAATAAGCTTCTTTTAGATGTCTATGATAAAG
ATTTAAATCTTGAGCAAAAAAAATCTATCAGGCTTGTAATTGAGGGCCTTAAAGAGAACTCTTCAATTGCTGACCTT
TTAAAATGTTTCTATCATGGTAGCTATATGCAAGGTTTTAAACGTAATCTTGCCTTAATATATTCAGTTCTTTACAC
AAAAAAAAGAAGATAGTGTATCCTTATGAAAAAAATTGCTATTATCGGTACTGTTGGCATACCAGCATCATATGGCG
GATTTGAAACATTAGTTGAAAATTTAACAAGATACAATTCCTCGGGAGTTGAATATAATGTTTTTTGTTCATCGTTT
CACTACAAATCCCACCAAAAAAAACATAATGGGGCCCGTTTAATTTATATTCCGCTTAAAGCCAATGGATGGCAGAG
CATTGCGTATGACATAATTTCGTTAGCATATTCTATTTTTTTGAAGCCTGATGTGATTCTGATTTTAGGGGTTTCTG
GTTGTTCATTTTTGCCTTTCTTCAAACTCTTAACACGCGCTAAGTTTATTACTAATATTGATGGCCTGGAATGGCGA
AGAGATAAATGGAATTCAAAAGTGAAACGTTTCTTAAAATTTTCAGAAAAAATCGCAGTTCAATATTCGGATGTCGT
TATTACGGATAATGAGGCAATTTCTGAGTACGTTTTTAACGAGTATAATAAAGATAGCCGAGTTATTGCCTATGGAG
GGGATCATGCATGGTTAAATACTGAGGATGTATTTACAACAAGAAATTATAAAAGCGATTACTACCTTTCTGTATGT
CGTATCGAACCCGAAAACAATGTAGAATTAATTTTAAAAACATTTTCAAAGCTAAAATATAAAATAAAATTTATTGG
AAATTGGAATGGCAGCGAGTTTGGAAAGAAACTTAGGCTGCATTATTCTAACTATCCAAATATTGAAATGATTGATC
CGATTTATGATCTTCAACAATTATTTCACTTACGAAATAATTGCATAGGATATATACATGGTCATTCGGCTGGAGGA
ACAAACCCTTCTTTAGTCGAGGCAATGCATTTTAGTAAACCTATATTTGCATATGATTGTAAGTTTAATAGGTACAC
TACTGAAAATGAAGCATGTTATTTTTCTAATGAATCTGACCTCGCAGAGAAAATCATAATGCATTGTGAGCTATCAT
TAGGTGTCTCTGGCACGAAAATGAAAGAAATTGCTAACCAGAAATACACTTGGAGACGAATAGCAGAAATGTATGAG
GATTGCTATTAACTCTGTTAAACTTCAAATCTTTTACAATATATGGCATGACTATAAGCGCATTAATTGTTTTTCAA
GCCGCTCTCGCGGTGACCACCCCCTGACAGGGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAG
AGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGC
TATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTCCAGGCCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACA
CCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCGCTC
AACATCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGAAGTGATTGCCGAAAA

TCCAGGCAAGAAACTGGTTCCTTACTATACGGTGAAAGAGTTTGTCGAATCTCTGGAAACGCCTCGTCGCATCCTGT
TAATGGTGAAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATC
ATTGATGGTGGTAACACCTTCTTCCAGGACACTATTCGTCGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTTAACTTCAT
CGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCT
ATGAATTGGTAGCACCGATCCTGACCAAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTGGT
GCCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGC
CTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGAATAACGGTG
AACTGAGCAGTTACCTGATCGACATCACCAAAGATATCTTCACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGAT
GTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACCGGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGCT
GTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTTTGCACGTTATATCTCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTTGCCGCATCTAAAGTTC
TCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTCGTGCGCTGTATCTGGGC
AAAATCGTTTCTTACGCCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGCTGCGTCTGAAGAGTACAACTGGGATCTGAACTACGG
CGAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCTGCAGAAAATCACCGATGCTTATGCCG
AAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAATTGCCGATGACTACCAGCAGGCGCTGCGT
GATGTCGTTGCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCCGGTTCCGACCTTCTCCGCAGCGGTTGCCTATTACGACAGCTA
CCGTGCTGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTGACTATTTTGGTGCGCATACTTATAAGCGTATCG
ATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

[0888] SEQ ID NO:12(O2rfb基因座核苷酸序列实例-O2-EPA生产菌株stGVXN4906)

[0889] ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCG
ATACCCAAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGAT
CAAAGAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAAT
CACTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG
AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCATT
TGTCGTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATGATTG
CACGTTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCCGTCATC
CAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGATCAGCCGCA
GACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTCGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAACTGGAACGTACTC
AGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCCGTTGATGCAATG
CTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAGTATGGCCTACGCAA
CCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAATCTGACCGGATGTAAC
GGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAATCTTCCTGCCGTTGTTTT
ATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCAGGATTTTCCTTGTTTCCAGA
GCGGATTGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTAACGCTCGTCACATCATAGGCAT
GCATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATACCTCTATTAATCAAACTGAGAGCCG
CTTATTTCACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGTGAAAATACTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTAT
TGGTTCAGCTGTAGTTCGTCACATTATAAATAATACGCAGGATAGTGTTGTTAATGTCGATAAATTAACGTACGCCG
GAAACCGGGAATCACTTGCTGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATGTTTTTGAACATGCGGATATTTGCGATGCACCT
GCAATGGCACGGATTTTTGCTCAGCATCAGCCGGATGCAGTGATGCACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTC
AATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTTGGTACTTATGTCCTTTTGGAAGCCGCTCGCAATTACT

GGTCTGCTCTTGATAGCGACAAGAAAAATAGCTTCCGTTTTCATCATATTTCTACTGACGAAGTCTATGGTGATTTG
CCTCATCCAGATGAAGTAAATAATACAGAAGAATTACCCTTATTTACTGAGACGACAGCTTACGCGCCAAGCAGCCC
TTATTCCGCATCCAAAGCATCCAGCGATCATTTAGTCCGCGCATGGAAACGTACGTATGGTTTACCGACCATTGTGA
CTAATTGCTCGAACAACTATGGTCCGTATCACTTCCCGGAAAAGCTTATTCCATTGGTTATTCTTAATGCACTGGAA
GGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAAAGGGGATCAAATTCGCGACTGGTTGTATGTAGAGGATCATGCTCGTGCGTT
ATATACCGTCGTAACCGAAGGTAAAGCGGGTGAAACTTATAACATTGGCGGACACAACGAAAAGAAAAACATCGATG
TTGTGCTGACTATTTGTGATTTGTTGGATGAGATTGTACCGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAAATTACTTATGTT
GCTGATCGCCCAGGGCATGATCGCCGTTATGCAATTGATGCCGATAAAATTAGCCGCGAATTGGGCTGGAAACCACA
GGAAACGTTTGAGAGCGGGATTCGCAAAACGGTGGAATGGTATCTGGCTAATACAAATTGGGTTGAGAATGTGAAAA
GCGGTGCTTATCAGTCATGGATCGAACAAAACTATGAGGGCCGTCAGTAATGAATATCCTGCTTTTCGGCAAAACAG
GGCAGGTGGGTTGGGAACTGCAGCGTGCTCTGGCGCCGCTGGGTAATCTGATCGCTCTTGATGTTCACTCCACTAAT
TATTGTGGAGATTTCAGCAACCCCGAAGGTGTGGCAGAAACCGTCAAAAAAATTCGTCCTGACGTTATTGTTAATGC
TGCTGCTCACACTGCAGTAGATAAAGCAGAATCAGAACCGGATTTCGCACAATTACTTAACGCGACAAGCGTCGAAG
CGATTGCAAAAGCTGCTAATGAAGTCGGGGCCTGGGTTATACACTACTCTACTGATTATGTTTTCCCAGGCAGTGGT
GACGCGCCATGGCTGGAAACGGATGCAACAGCACCGCTAAATGTTTACGGTGAAACAAAATTAGCTGGGGAAAAGGC
ATTACAAGAACATTGCGCAAAGCATCTTATTTTCCGTACCAGCTGGGTATACGCTGGTAAAGGAAATAACTTTGCTA
AAACGATGTTGCGTTTGGCAAAAGAACGCGAAGAACTGGCTGTGATAAACGATCAGTTTGGCGCACCAACAGGTGCT
GAATTGCTGGCTGATTGCACCGCTCATGCCATTCGCGTGGCATTAAAAAAACCAGAAGTCGCTGGCTTGTACCATCT
GGTAGCAAGTGGCACAACAACCTGGCACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGGATTAATC
TTGCACTTAACAAACTTAACGCCGTGCCAACAACGGCCTATCCCACACCAGCCCGTCGACCCCATAACTCTCGCCTC
AATACAGAAAAGTTTCAGCAGAACTTTGCGCTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTGGGCGTGAAACGTATGCTCAACGA
ATTATTTACGACTACGGCAATTTAACAAATTTTTGCATCTCGCTCATGATGCCAGAGCGGGATGAATTAAAAGGAAT
GGTGAAATGAAAACGCGTAAAGGTATTATTCTGGCTGGTGGTTCCGGCACTCGTCTTTATCCTGTGACGATGGCAGT
GAGTAAACAATTGCTGCCGATTTATGATAAGCCGATGATTTATTATCCGCTTTCAACGCTTATGTTAGCGGGTATTC
GCGATATTCTTATTATTAGTACGCCACAGGATACACCGCGTTTCCAACAATTATTGGGGGACGGGAGCCAGTGGGGT
CTTAATCTACAGTATAAAGTACAACCGAGTCCGGATGGCCTGGCGCAAGCGTTTATTATTGGCGAAGACTTTATTGG
TGGTGATGATTGTGCACTCGTACTTGGCGATAATATCTTCTATGGACACGACTTGCCGAAATTGATGGAAGCTGCTG
TTAACAAAGAAAGCGGTGCAACGGTATTTGCTTATCACGTTAATGATCCTGAACGCTATGGTGTCGTGGAGTTTGAT
AATAACGGTACGGCAATTAGCCTGGAAGAAAAACCGCTGGAGCCAAAAAGCAACTATGCGGTTACTGGGCTTTATTT
CTATGACAATGACGTTGTGGAAATGGCTAAAAACCTTAAGCCTTCTGCCCGTGGCGAACTGGAAATTACCGATATTA
ACCGTATTTATATGGAACAAGGACGTTTGTCTGTAGCCATGATGGGGCGTGGCTATGCATGGTTGGATACAGGGACG
CATCAAAGCCTTATTGAAGCAAGTAACTTCATTGCAACAATTGAAGAGCGTCAGGGATTAAAGGTATCTTGCCCGGA
AGAGATTGCTTACCGTAAAGGGTTTATTGATGCCGAGCAGGTGAAAGTATTAGCCGAACCGCTTATCAAGAATCAAT
ATGGTCAATATTTGCTGAAAATGATCAGCGAATAGTATATGGGAACTCAATGATGGATATTAAATTAATCTCTTTGC
AAAAACATGGGGATGAGCGCGGTGCATTAATTGCTCTTGAAGAGCAACGAAATATACCTTTCGAAGTCAAAAGAATA
TATTACATACTTGAGACTCTTAATGGAGTAAGACGCGGATTTCATGCGCACAAGGTTACTCGTCAGTTAGCTATTGT
AGTCAAGGGAGCTTGTAAATTTCATCTGGATAATGGTAAAGAAACAAAGCAGGTGGAACTTAATGATCCAACAATTG
CGTTGCTGATAGAACCCTATATATGGCATGAAATGTATGATTTTAGTGATGATTGTGTGCTGCTTGTAATTGCGGAT
GATTTCTATAAAGAGTCTGATTATATCCGCAATTATGATGATTTTATTAGAAGAGTAAATTCAATTGAGAATTCATA

AGCTAAGTGACGTCCAGACAACATCAATTGGTGATGGAACAACTATCTGGCAGTTTGTTGTGATACTAAAAGGTGCT
GTAATTGGTAATAATTGCAACATCTGTGCAAATACCTTAATTGAAAATAACGTTGTAATTGGTAACAATGTCACAGT
CAAAAGCGGTGTGTATATTTGGGATGGCGTTAAAATAGAGGATAATGTTTTTATTGGTCCTTGTGTAGCATTTACAA
ATGATAAGTATCCTCGCTCTAAAGTCTATCCTGATGAATTTTTGCAAACAATAATACGCAAAGGAGCATCAATAGGT
GCTAACGCAACCATCCTGCCAGGAATTGAAATTGGTGAAAAAGCAATCGTTGGTGCGGGGAGTGTTGTAACCAAAAA
TGTACCGCCATGCGCAATAGTAGTAGGTAATCCAGCTCGATTTATTAAATGGGTAGAGGATAATGAATAAAATTGAT
TTTTTAGATCTTTTTGCAATTAACCAGCGACAGCACAAAGAATTAGTCTCTGCGTTTAGTAGGGTGCTAGATTCTGG
TTGGTATATCATGGGCGAAGAACTTGAGCAGTTCGAGAAAGAGTTCGCAGAATACTGTGGAGTTAAGTATTGCATTG
GTGTAGCAAATGGCCTTGATGCGTTGATACTAGTATTGAGGGCATGGAAAGAACTTGGCTATCTTGAAGACGGTGAC
GAGGTATTAGTACCGGCAAATACATATATTGCTTCTATTCTTGCTATAACAGAGAACAAACTTGTTCCTGTTCTTGT
TGAACCAGATATAGAAACTTATAATATTAATCCTGCTTTAATTGAAAATTACATTACGGAAAAAACTAAAGCAATAT
TACCGGTTCACTTATATGGTCTATTGTGCAATATGCCAGAAATTAGTGCAATCGCCAGAAAATATAATCTGTTGATT
CTTGAAGATTGTGCACAAGCACATGGTGCAATACGTGATGGTCGCAAAGCTGGAGCTTGGGGGGATGCTGCAGGATT
TAGTTTTTATCCAGGAAAAAACCTTGGAGCTTTGGGGGATGCGGGAGCTGTTACTACAAATAATGCAGAATTATCCT
CAACTATAAAAGCTTTGCGAAATTATGGGTCACATAAGAAATATGAAAATATTTATCAGGGATTGAATAGTCGATTG
GATGAACTGCAAGCAGCCTTATTGCGTGTAAAAATCCATACATTACCGGAAGATACTGCGATTCGGCAAAGGATTGC
TGAAAAATATATTCGTGAAATAAAAAACCCTGCGATTACGTTACCAGTGTACGAAGGCCAAGGTGCGCATGTTTGGC
ATTTATTTGTAGTAAGAATCGCTAATCGTGAAAAATTCCAGTCATACTTATTAGAGAAGGGTATCAAAACCTTAATT
CACTATCCATTACCACCCCATAAGCAGCAAGCATATCAAAATATGTCTAGCCTTAGCCTTCCAATTACTGAGCAAAT
TCATGATGAAGTCATTTCTTTACCTATAAGTCCGGTAATGAGTGAAGATGATGTCAATTATGTAATCAAAATGGTCA
ATGATTACAAGTAATGAAAAAATTTCTTCAGGTAACTATATTATCCGCTATCTATACATTCATTAAAATGATTGCGG
GTTTTATCATCGGTAAGGTAGTAGCAATTTATACAGGGCCATCAGGGGTAGCAATGCTTGGCCAAGTGCAAAGTTTA
ATCACAATAGTTGCAGGTACTACCTCTGCACCTGTAAGCACAGGCCTTGTTCGATATACTGCGGAAAATTGGCAAGA
AGGACAAGAAGCATGCGCGCCATGGTGGCGCGCATGCTTAAGGGTTACTCTGTTTTTATTCTTGCTTATTATTCCCG
TTGTTATTATATTGTCGAAAAATATTAGTGAGTTACTTTTTAGCGATGGACAATACACATGGTTAATCATTTTCGCA
TGTTGTATATTGCCATTCTCCATTATAAATACATTGATCGCTTCAGTTTTAAATGGTCAACAATTTTATAAGCAATA
TATATTGGTTGGGATGTTTTCTGTATTCATTTCTACTATGTTTATGATTTTGTTGATTGTAGCTTATAATCTTAAAG
GTGCATTGATTGCCACAGCTATAAATAGTGCTATTGCTGGTCTTGTATTGGTTTTATTTTGTCTCAATAAATCTTGG
TTTAGATTTAAATATTGGTGGGGTAAAACGGATAAAGACAAAATTATAAAAATTATTCATTATACTCTGATGGCTCT
GGTTTCTGTTATCTCCATGCCTACAGCATTGATGTGTATTAGAAAAATATTGATTGCTAAAACTGGTTGGGAGGATG
CAGGGCAATGGCAGGCCGTATGGAAGATATCTGAGGTTTATCTTGGTGTTGTGACAATTGCTTTGTCAACATATTTC
TTACCAAGATTGACAATTATAAAAACAAGTTTCCTTATAAAAAAAGAAGTAAATAGTACTATATTATACATAATATC
TATTACTTCATTCATGGCGTTGAGTATCTATTTATTCCGCGATTTGGTAATAACAGTTTTATTTACTGAACAGTTTC
GCTCAGCTCGTGAATTATTTTTATTACAACTTATAGGGGATGTAATAAAAATTGCTGGGTTTCTTTATGCATACCCT
CTTCAAAGTCAGGGGCATACTAAACTATTCATCAGTTCAGAAGTGATTTTTTCTATGCTCTTTATCATTACCACCTA
TATTTTTGTTGTAAATTATGGAGTACATGGTGCTAACATAAGTTATGTCATTACATATAGTTTATATTTTGTGTTTG
CATTTGTGTTTACTAATTTTATTAATGTTAGAAGAAATAATTAAAAACAGAGGTTGAATTTTGAAAATAATTATACC
TGTCTTAGGATTTGGCAGGGCTGGTGGTGAAAGAGTTCTTTCTAAGCTGGCAACTGAATTGATGAATTATGGACATG
ATGTAAGTTTTGTTGTTCCAGATAATAGAACTAATCCATATTATGCTACCACAGCAAAAATTGTCACGAGTAAATCT

AGTCAAAACCGTGTAAAAATATTGAGAATCATTAAAAATTACTATAATCTGTGGCGTAAATGCATAGAGTTAAATCC
TGATGCTGTAGTTGCTAGTTTTCATTTGACTGCCTATCTTGTCGCATTATTACCAATCACCCGTCGTAAGAAATATT
ATTATATTCAGGCGTATGAAGTTAATTTTTTTGATAATATAATATGGAAATTAATAGCGGGTTTAACATATTATTTA
CCGCTTAAAAAAATACTAAATAGTCCTAATTTGCTTCCTCATAAACATGATGATTTTATAGGAGTAGTTCCTGCAGG
AGTAGATTTAAACGTTTTCTATCCGAAACCATCAAATAGGTTATTAAATGGTCACACATCAATAGGGATTATTGGTA
GAAAAGAGAAGCACAAAGGAACTAGCGAAATTATTTCAGTATTGTGTTCACTGGAAAATAAAGCTGGAATTATAATC
AATATTGCGATCTATCTTGAAGAAGTTGATAAGCAGCGTTTAATCGCTGCCGGGTTTCAGGTTAATTTTTTTCCGAT
TACTTCTGATTTAGAATTGGCATCCTTTTATCGAAGCAATGACATCATGATTGCTGTTGGGTTAATTGAAGATGGCG
CTTTCCATTATCCTTGTGCTGAATCAATGGCTTGTGGTTGTCTTGTTATTTCAAATTATGCGCCACTTACTGAAACT
AACAGTGTACTTAAATTAGTCAAGTTTGATGCTTGCAAACTTGGTGAAGCAATTAATCTTTGTCTCAATCTTGACCT
AGAAGAAAAAAGCAAAGAAATCCAATCTAATATTTCTGTGTTGAATAAATATGACTGGAAAATTGTTGGTGAAACTT
TCAATAGTTTATTGTTAGATGCAAATAAATAGTATACGTTGATGGGGAAAATATGAATATTGTTAAAACTGATATTC
CAGATCTGATCGTTCTTGAACCAAAAGTGTTTAGTGATGAACGCGGCTTTTTTATGGAGAGTTATAATCAGATTGAA
TTTGAGAAGGCAATAGGAAGGCACGTAAATTTTGTTCAGGATAATCATTCAAAATCTAGTAAAGGCGTACTACGTGG
GTTGCATTATCAATTAGCACCGTATGCACAGGCTAAATTAGTTCGATGTGTTGTAGGTCAGGTATTTGATGTTGCTG
TTGATCTTAGAAAAAATTCACCAACGTTCAAAAAATGGTTTGGAATAACCCTTTCCGCAGAAAATAAACGACAATTA
TGGATACCCGAAGGATTTGCTCATGGTTTCTTGGTGACCAGTGATGAAGCTGAGTTCATTTATAAGACAACTAACTA
CTATGCTCCTGGTCATCAGCAAGCAATTATTTACAATGATCCTATTTTAAACATCGATTGGCCTTTCTGCAGTAGTG
CTCTGTCATTATCACAAAAAGATCAAGAAGCAAAATTATTTTCAGAATTATTGGACAGTGAACTGTTCTAATAAAGT
GTGCCACCTTATCCGTCTGAAGGATAGGTGGTTGCTTATATTTTTTTGAGTATGTTTGTATAATGACAGAAAATAGT
CCGAAATATAAACACGATAAAAGCTTAATAAGTTTTATCTACTTATTTTTTATATTTACACTTATTGTAGGCTTTAT
TATCGCAAATACCCAGTTTTTGGGGCGAAGTAGAGACTATGATAATTATATACAGATCTTTTCTGGTAAAGAAGGGG
AGGGGGTTCTTGAATTATTTTATCGCGGATTGATGTTAATAACGACCAGCTATGAAACTATCATTTTTATAATTTTA
ACATGTTCTTTTTTTATAAAGGCAAGGTTTCTCGCTAACTATTCGCGTAATTTTTCAGGCTTGACCTTATTCTTTAT
TTATTATGCAAGCGTTGCACTTTGGGTTTTAGATTATACTCAATTCAGAAATGGTCTATGTATTTCCATTTTAATGT
TTTCCGTATACTATTTATTTATAAATAAACCGACTTATTTTTATTTCTCGGTATTATGTGCAATTGCAACTCATTGG
TCTGCTTTGCCTTTTTTGCTTTTATATCCTTTTGTCTATTCAACAAAAATAAGACGCCTTGGTTATTTTTGTTTCAG
TATTCTTGTTTTGATTGCGATCTCAGGAGAAGGAAAAGAGATCATATCTTTTATAAGAAATTTTGGAGTGGGACAAA
AAATAGGAAATGAAGCTGGTGTAAATTTAATAAATTCATTATCCCTTACCGCTATTTCCTGGTTTATTATTAGTTAC
ATATCAAGCATTGGAAATGAAAGGAGAAATTTAAGGCTTTTCTTTTGTTATGGTGTCATGCAATACGTGACTTTTAG
CCTTTTCTCTCTACCTGTTATGGCTTTCCGTATTTTGGAAATGTATTTTTTCCTTATGCTAACCATTGGGGTGTTTA
TTAAGCAAAAAAAGAATTATTATTTTATTTTTTGCAAAGTGTTAATTTTATTGTATCTAACATACTATTATCATATG
GTCTTTGGAGTGATTAATGTGTAAGGCTAAGGTGTTGGCTATAATTGTTACTTACAACCCGGAAATTATTCGATTGA
CGGAATGTATTAACTCTTTAGCCCCACAAGTTGAGAGAATAATTCTTGTAGATAATGGCTCAAATAATAGTGATTTG
ATAAAAAATATCAGTATTAATAACCTTGAAATTATTTTACTTTCGGAAAACAAAGGCATTGCATTTGCTCAGAACCA
TGGTGTTAAGAAGGGCCTGGAAGCAAAAGAGTTTGACTATTTATTTTTCTCAGATCAGGATACTTGCTTTCCTAGCG
ATGTTATTGAAAAACTTAAGAGTACATTTACGAAAAATAATAAAAAAGGTAAAAATGTTGCTTGTGCTTCTCCTTTT
TTTAAAGACCATCGTTCAAATTATATGCATCCGTCAGTCAGCCTAAATATTTTTACGAGTACAAAAGTTATATGTAG
TGAAGTAGACGATGATCTTTATCCCTCGCATGTTATTGCTTCTGGGATGTTAATGTCTCGTGAAGCATGGCGCGTCG

TCGGACCATTTTGTGAAAAACTCTTTATAGACTGGGTTGATACAGAATGGTGTTGGCGTGCATTAGCTAATAATATG
ATTATTGTTCAGACACCATCAGTCATCATTTCTCATGAACTTGGGTATGGGCAGAAAATTTTTGCTGGTCGATCTGT
TACAATACATAATTCTTTCAGAAATTTTTATAAAATACGCAATGCAATATACTTAATGCTGCATTCAAATTATAGCT
TCAAGTATCGTTATCATGCTTTTTTTCATGCGACAAAGAATGTTGTATTTGAAATTTTATATTCGAAAGAAAAATTA
AATTCACTGAAGGTTTGTTTTAAAGCTGTACGTGATGGTATGTTCAATAATTTTTAATACGAAAATAGTTAGGCTCA
AGGTGTTTAAATGGAAGAAAATAATATGAAGACGGTCGCTGTAGTTGGCACAGTGGGTGTTCCTGCTTGTTATGGTG
GGTTCGAATCACTTGTTCAGAATCTAATTGATTATCAATCTGATGGTATACAATATCAGATATTTTGCTCTTCAAAA
AAATATGATAAAAAATTTAAAAATTATAAAAATGCAGAATTAATCTATTTGCCGATAAATGCCAATGGCGTCTCTAG
CATAATTTATGATATTATGTGTTTAATTATTTGTTTATTCAAAAGGCCAGATGTTGTTTTAATATTGGGGGTGTCTG
GTTGTTTATTTCTACCAATTTATAAACTATTTTCAAAATCAAAGATTATTGTCAATATTGATGGGCTTGAATGGCGT
AGAAATAAATGGGGAACGTTTGCTAAGAAATTTCTTAAAATATCTGAGGCGATATCTATTAGAATAGCTGATATTAT
CATTTCAGATAATCAAGCAATAGCTGATTATGTGGAAAATAAGTACAAGAAAAAAAGTGTAGTTATAGCTTATGGCG
GAGATCATGCCACTAATCTTAGTACACCGATAGACAATGATCAAAAAAAAGAAGGTTATTATTTGGGGCTTTGTAGG
ATAGAGCCTGAGAATAATATAGAAATGATTCTGAATGCCTTCATTAATACAGATAAAAAAATTAAATTTATGGGTAA
TTGGGATAACAGCGAGTATGGACGCCAGCTAAAAAAATATTATTCAAACTATCCAAATATCACCCTACTAGAACCTA
ACTATAATATTGAAGAGCTTTATAAACTAAGAAAAAATTGTCTTGCATACATTCATGGACACTCGGCTGGTGGAACA
AACCCTTCTTTAGTTGAAGCGATGCATTTTAATATTCCTATTTTTGCTTTCGATTGTGACTTTAATCGTTACACAAC
TAACAATTTAGCTCATTACTTTAATGATTCTGAACAACTTAGCTTATTAGCAGAAAGTTTGTCTTTTGGAAATCTTA
AATGTCGAGTATTAGATTTAAAAAATTATGCTGAAGATATGTATAACTGGAGGCATATAGCTGCTATGTATGAATCT
ATTTATTAAACGCATTAACAATAATATAATTGACCTTATATAGCAGGGAAAGATCACGTAACGCTGCGGCGCGCCGA
TCCCCATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGA
ACTAAGGAGGATATTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTT
TGTATACTTATTTGCGAACATTCCAGGCCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCC
AAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCGCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATAC
CGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGAAGTGATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAAACTGGTTCCTT
ACTATACGGTGAAAGAGTTTGTCGAATCTCTGGAAACGCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCAGGTGCAGGC
ACGGATGCTGCTATTGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATTGATGGTGGTAACACCTTCTT
CCAGGACACTATTCGTCGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTTAACTTCATCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTG
AAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTGGTAGCACCGATCCTG
ACCAAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGCCGATGGCGCAGGTCACTATGT
GAAGATGGTTCACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCC
TGAACCTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGAATAACGGTGAACTGAGCAGTTACCTGATCGAC
ATCACCAAAGATATCTTCACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAA
CAAAGGTACCGGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGCTGTCGCTGATTACCGAGTCTGTGT
TTGCACGTTATATCTCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTTGCCGCATCTAAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCA
GCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTCGTGCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCCAGGG
CTTCTCTCAGCTGCGTGCTGCGTCTGAAGAGTACAACTGGGATCTGAACTACGGCGAAATCGCGAAGATTTTCCGTG
CTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCTGCAGAAAATCACCGATGCTTATGCCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTG
TTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAATTGCCGATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGATGTCGTTGCTTATGCAGTACA

GAACGGTATTCCGGTTCCGACCTTCTCCGCAGCGGTTGCCTATTACGACAGCTACCGTGCTGCTGTTCTGCCTGCGA
ACCTGATCCAGGCACAGCGTGACTATTTTGGTGCGCATACTTATAAGCGTATCGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACC
GAATGGCTGGATTAA

[0890] SEQ ID NO:13(O6A rfb基因座核苷酸序列实例-O6A-EPA生产菌株stGVXN4112和stLMTB10923)

[0891] ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCG
ATACCCAAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGAT
CAAAGAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAAT
CACTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATTTGCCCGCCGGGCGTGACAATTATG
AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTGGGCCACTCCATTTTATGTGCACGACCTGCCATTGGTGACAATCCATT
TGTCGTGGTGCTGCCAGACGTTGTGATCGACGACGCCAGCGCCGACCCGCTGCGCTACAACCTTGCTGCCATGATTG
CGCGCTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCTGTCATC
CAGACCAAAGAGCCGCTGGACCGCGAAGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTCATCGAAAAACCGGATCAGCCGCA
GACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTTGGTCGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAACTTGAACGCACTC
AGCCTGGTGCATGGGGGCGTATTCAGCTGACTGATGCCATTGCCGAACTGGCGAAAAAACAGTCCGTTGATGCCATG
CTGATGACCGGCGACAGCTACGACTGCGGTAAAAAAATGGGTTATATGCAAGCGTTCGTGAAGTATGGACTACGCAA
CCTCAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGGATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAATCTGACCGGATGTAAC
GGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAGATTAGCGGCGAAAGTAATTTGTTGCGAATTTTCCTGCCGTTGTTTT
ATATAAACAATCAGAATAACAACGACTTAGCAATAGGATTTTCGTCAAAGTTTTCCAGGATTTTCCTTGTTTCCAGA
GCGGATTGGTAAGACAATTAGCATTTGAATTTTACGGGTTTAGCGCGAGTGGGTAACGCTCGTCACATCGTAGACAT
GCATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCTGAAATTATAAAGTCATTCTTATAGAACATCG
CATTTCAATAATATAATTACACCTAAATGAATAGGATACAACGTGTGCACAATTATTTAAGGCTTAAAGATAAAATA
AAAAACGTATTTTTAGGGTTGTATATATTGCAGTTATTTAATTATATCGCGCCATTGGTAATTATCCCTATCCTGAT
AAAATATATTGGGTTGGGGGAATATGGGGAATTGGTCTATATTACATCTATTTATCAAATAGTGGCTTTGATTATTG
ATTTTGGCTTTACTTACACAGGACCTGTGGTTGCTGCGAGACATAGATGTGAGACCCAAAATTTACAGCGCTATTAC
TCAATAGTTGTTCTTTTAAAATCATTGCTTTTTATAATTGCATTAACATGTGTATTTTTATTGTGCAGATTAAATAT
AGTCCACTTGTCATTTTTTGGGTTTTTGTCAATTTTTCTATGCACTATTGGTAATATATTATCGCCCAATTGGTTTT
TGCAGGGGATTGGTGATTTTAAAAAACTTTCATACTCACAAGTAATAGTGAGAATAACATTGTTTATCATACTTCTT
GTTTATGTCTGTAGTGGCGGAGATAATGTTTTTATCCTAAGTTTTTTGCAAAATGCAACATTACTCATATGCTGTAT
ATACTTATGGCCAAATATTCATATTAGCCATGTTGTTCATCTTAAACCTAATGAATGCATTGTGGAATTTAAGAAGG
CAGGAAATGTTTTTATTGGCGTAATAGGTACGATTGGTTACAATGGTCTAATTCCTGTGTTAATTGGAAACCTTTGC
GGTAATACGAGTCTTGGTGTTTTTTCAATCGTTCAAAAAATGACAACAGCATGTCAAAGTCTAATTAATCCAATATC
ACAGTATATGTTATCTCAAGTTTCAGAAATTAAACCTCAAGATAAACTGTTTTATTATAGAATTAAAAAAAGTTTTT
TTGTGCATTTAACAATTAGCATAATTGCATGTTTATGTTATATGGGGTTAGGGCAATATGTGGCGACTTTTATAGGT
AAAGTTGACGTTTCATTTGTTATTATTTTATTTGCGTCAATAATTACCATTTTTTCATCTTTAAATAATGTCCTTGG
TATACAGTTTCTTATACCGACAGATAATGTAAAAATACTACGAAGTATAAATGTTATGGCGGGAATTATTGTTGTTA
GTTTGTCCTGGCTGTTAATATCACGCTTTGACATTCTGGGGGGGGTTTTATTAAACCTAATTGGTGAGTTTCTTGTA
TTCAGTATGCTAGCTTTTATTGCCCATCGAAAGTGGGGAGCGAGAGTATAATGAAAGTGAAGGCGGTTCCTGCTATT
ACATTCTATTTAAGTTTAATGCTGACAATTTTAGTGTTACTGTTTGGTAATGAACCAAATAAATCACAATATATCCT

TGTTATAGCAACGATAACAGTTTTTTATATCGCATATATCACTAATAAAATAACTTCTCCGGCCAGCCTTCTCGTTA
TATCATCTTTTGTGTTTTTAGGTTGTCGCCCTTTATTATCTTTGTTTGCAAACTATGATTATAGGATTGCCGATTGG
TTTATTGAAGGATATATGGATGACGATGTGATTTTGGCTAACTATGCTATAACACTAATGTATTATGGTTATACATT
GGGACTAATTCTATGCAAAAATACTGAAAAATTTTATCCGCATGGTCCTTATCCTGAAAAACAATTGCTAAAAATAA
AGTTTCTTTTGACTTTATTTTTTCTGGGTTCGATAGGTATGGTTGTAAAAGGGATATTCTTTTTTAACTTTATAGAA
TCTAATAGTTATGTTGATATTTATCAATCAAATATAACAACGCCAATAGGTTATGATTTTCTATCTTATTTATTTTA
TTGTTCTTTTTTCCTTATATGTGCGTTTCATATACAGTTCAGAACAAATAAAAAATTTCTTTTTATTGCGATATGCA
TTGCTGCATTTAGCACCTTGAAGGGTAGTCGTAGTGAAGCTATAACGTTTCTTTTAACGGTTACATGTATATATTTT
AATGAAGTAAAGACAAGAAACTTACGTCTGCTGATTACAATGATTTTTGTTTTTAGCGTCATTTTTGTGATTAGTGA
ATTTATCTCAATGTGGCGCACTGGAGGGAGTTTTTTTCAATTAATGCAGGGTAATAATCCTGTTATAAACTTTGTAT
ACGGCATGGGAGTATCATATCTTTCCATTTATCAATCAGTAAAACTACAACTATTGTCAGGGGGATATAATGTTACC
TATCTATTCAGCCAGTTAATAATAACTTGCTCGTCAATATTTAATGTCAAATTGAGCTTGCCGGAAATAAGCTATAG
CCATTTGGCCTCATACACAGCAAACCCAGAACTATATAATCTTGGGTTCGGACTTGGGGGGAGTTATTTAGCAGAAT
CGTTTTTAGCATTTGGTCTGATTGGATGTTTCATTATACCCTTTTTACTTTTACTTAATTTAAATGTATTGGAAAAA
TATACAAAAAACAAACCAATTATATATTTTGTTTATTATAGTGTGTTGCCACCTATATTATTCACACCAAGAGAGAC
TTTGTTCTATTTCTTCCCCTATCTTGTCAAAAGTATATTTGTTGCTTTTTTAGTTACATTATACATCCAGTATAAAA
AGGATTGACCAAAATGTCAGAAAAAAATGTCAGCATAATAATCCCAAGTTATAACAGGGCTCATATTCTTAAGGAGG
TCATACCAAGTTATTTTCAGGATGAGACTTTAGAGGTTATAGTTATCAATGATGGATCAACAGATAATACAAATAGT
GTATTAGCTGAACTGAAGGAAAAATATTCTCAGTTAGTTATTTTAGAAAATGAAACGAATAAAAAACAGATGTATTC
TAAAAACCGAGGGATTGAAATAGCCAAAGGGAAATATATTTTTTTTGGTGATGATGACTCTTACCTCTTACCCGGTG
TTATATCTCGGTTATTGGCTACAAAATATGAGACAGGCGCTGATGTAATCGGCGCAAGAATACTTTATATGAATAAT
AACGAGAAAACAATTGAAGATTGCATAAATCGACATAAAAAAGAGGGGCGTTTTGTTAGTGATCTAAATAGATTGGA
TTTTAGTTATACATGTGATTTGGACCATCCGATTGAATGTTTTTATGCACAGCCTTTTGTTCTAGCTGAAAGGGAAC
TAATATCGAAATATCGATTTGATATATCTTATACGGGAAACTGCTATCGTGAGGAAACTGATTTCATGCTATCTCTA
TTTATTAAAAATAAAAAATTTATATATGATTCAAAGGCTTTGTTAATAAATTTACCTCCAAGAAAAGCGACGGGAGG
GGCAAGAACAGCTAATCGATTAAAATATCATTACGAAAGTTGCATAAATAATTATAGATTTTTAAAAAAATATAATG
ATAATTTGAATCTTCTTTCAGGACAAAAGCATGCTATATTTTACCGACAGTGTCAATTCGTTCTGCTAAAAATGAAG
TCGTTTATCGGGAAGTTTTTAAAATGATTATATATATCGCCGCGTATAATGGTTCAGGAGGGCAAGGTGGGGTGGAA
AGGGTTGTTGCCCAACAATGTAACATTCTTAAAAATTTGGGGGTTAAAGTCATTATACTTGATAAAACATACTTCAA
AATTTCTAACAAAATTCGTAACAAAAAAATACAAGTAGCACTTTATCCAATATTAGTTTCTCTTTATTTAACCTTAC
AAAAATTACGTGGCGTGACGTTTAAAGTTATTGCACATGGCTATTGTTCTCCTTTTTATAGGAATGACATCTTAATA
GCTCATGGCAATATGAAATGTTATTTTCAAACAGTCATGAATAAAAAACCTAATCGGTTGTCTGGCAGTGGTCTTTT
ATCTTTCTATGAGCGTTGGGCTGGAGCATTTTCAAAAAATATCTGGGCTGTTTCAAATAAGGTTAAAAGTGAATGGA
ATGAGCTTTACAATATTAATTCACATAAAATCAAAGTTGTTCGAAATTTTATAAATCTTGCACAATTTGATTACACT
GATGTTAATGAAGCAGAATATGTGACATTTGTCGGGCGATTGGAAAAAGGAAAAGGAATAGATGATCTGTATTACAT
ATGTAAAAATCTGCCAGATACTTCCTTCCATTTAGTTTCAAGTATTCCCGCCCCACAAAATTTTGCTTCGCTAAATA
ATGTTCTGACCAGCATTGCTGTCCCCTATGCGAAAATGCCAGAAATATTTAAGAAATCCAGAGTACTTATTTTACCG
TCCTATTATGAAGGATATGAGCTGGTTACTATTGAAGCGCTATGCTGTGGTTGCCCTGTGATAGGCTATAATGTTGG
TGCAATTAGAGAGTTGTATGCAGAAAGTTTTCCTGGCGTATTTATTGCCAATAATAAAGAAGATTTAGCACAAGTAG

CCTACAAATTAATTAGTCTTGATAATGAAAAATATTATCATTTGAGACAAACTATTTATAGCAAGCGTGAGCTTTTT
TCTGAAGAGAGATATGCGGAAATTTTAACGGCGGCATTTAATGAAAAAAAATAAGAAACTCTGTCTCATTTCAATTA
ACTCATATAATGAACTTACCGGAGGAGGAGTATATTTACGTACGCTTGTTAGTTTTCTACAAAAACAGAATGTTAAT
TTAACACTTATTGATAAAAAATCCTCAGGTAAACTATTCGAAGACAATACTTTTCAACATATATCATTTATTAAAGG
TAAACGTCAGGATATAATATCCAGGCTTTTTTTTATACCATCATTTTATGTCCCTTATATTTTCTCAATAATTAAAA
TTTTACGGAAGCAAGATATTCTTGCTTTTCACAACTCTCGGCTTGGATTGTTATGTCTGCTTTTTAGAATACTCATG
CCCCACAAAAAGATCATATTGTTTACGGATAACTTCGAATATGACTTAATAAGACAAAAAGATAAAAACATAACTAC
TTTTATTGAAAAATTAATTGTTTATCTCAATGAATTTATCGGGCTTAAGAATTCAGATTTAGTTAGCTATATTACCC
GGCAAGATAAAAATGCAATGGATAAATTTTATGGGATTAAAAAAAGCAGAAATTTAATTCTCCCTGTGATATTTAGT
AGAGAAAAACCAACTGATGTATTGTCAGCTCACTTTATTAATGAGTATAATCGATTGAATAATGATAATAGGAAAAA
AGTAGTATTTACTGCATCTTTTGATTTTTTTCCAAATATAGATGCTGCCAACTATGTTTTAAATGCAGCAAAGTCTA
ATAATGATTATTGCTATATTTTGGCAGGTAGGAAAAGTACTACTTTGAATCTTCCTGATTTGGATAATTTATTTTTT
TTCGATAATCTATCTAATAGTGAAATGTCATATTTATTATCTGCTTGTGATGTTTTTTATTCTCCTATAGTTTTAGG
AAGTGGAATGAAAACAAAAATTGCAGAAGCACTATCATATGGATTATATATTTATGCGACAGAGCATTCCTTAATCG
GCTATGATGAAATTATACACAATAAGGAGTGTGTTAAAAAAATCTCACATTTGGATGAGGAATTTCCTAAAGATTTC
AAGATGAAAAGTATCAATAAACAGCTAATAATGTCTTATCAGCAAAAATATTATTCACATTATCGGTTTAATGGCCA
TGAACTTGATATAATAAATTTTGACGATTAGTTAGTGGAGATATAATATGAACATATTAGTAACTGGTGGTGCTGGA
TATATCGGATCTCATACGGCTATTGAATTACTGAATGCAGGTCATGAGATTATCGTTCTGGACAATTTCAGTAATGC
TTCATACAAGTGTATCGAAAAAATAAAAGAAATTACTCGACGTGATTTTATAACAATTACTGGAGATGCTGGGTGTA
GGAAGACACTCTCCGCTATTTTCGAGAAACACGCCATAGATATAGTTATTCATTTTGCTGGCTTTAAATCTGTTTCA
GAGTCTAAAAGTGAACCCTTAAAGTATTACCAGAATAATGTTGGAGTGACCATTACTTTATTACAGGTAATGGAAGA
GTACAGAATTAAAAAATTTATCTTTAGTTCATCTGCGACAGTCTATGGTGAACCAGAGATAATTCCAATTCCAGAAA
CAGCTAAAATTGGAGGAACTACGAATCCATATGGCACATCGAAGTATTTTGTTGAAAAAATTCTAGAGGATGTTAGT
TCCACGGGAAAACTGGATATAATTTGCTTGAGATATTTTAATCCTGTCGGTGCTCATTCTAGTGGTAAAATAGGTGA
GGCTCCATCTGGTATCCCTAATAATCTTGTTCCTTATTTATTGGATGTTGCGAGTGGTAAACGTGATAAATTATTTA
TTTATGGCAATGATTACCCTACTAATGATGGAACAGGTGTAAGGGATTTTATTCATGTTGTTGACTTAGCGAAAGGT
CATTTGGCTGCAATGAATTATTTAAGTATCAATTCGGGATATAATATCTTTAATCTTGGTACAGGAAAAGGTTATTC
GGTACTTGAATTAATCACTACATTTGAAAAATTAACAAACATTAAGGTCAATAAATCTTTTATAGAGAGAAGGGCAG
GGGATGTTGCGTCTTGTTGGGCTGATGCAGATAAAGCTAATTCTTTATTGGACTGGCAAGCCGAACAAACTCTAGAA
CAGATGTTATTGGACTCGTGGCGTTGGAAAAAAAATTATCCAGACGGATTCTGAATATAAAAGGTTTCAGTTTTATG
AATCAATCAGAGCAGAGAAAAAAAATACTGGTTCTTACACCTCGCTTTCCCTACCCTGTCATTGGAGGGGATAGATT
AAGAGTCTATATGTTATGTAAAGAACTTTCCAAAAAATATGATCTTATTCTTCTGAGCTTATGTGATCAACCACTAG
AACTTGAAATAAATATAAATGACTCGGTCTTCAAAGAAATTCATCGTGTCTATCTACCAAAATATAAATCATATTAT
AATGTATTAAAAGCTTTGGTTACGCAAAAACCGTTGCAAATTGCTTATTATCAATCGGACACATTTAAGAATAAATA
CAATAAATTAATTAAACAATGCGATGCAGTATTTTGTCATCTGATAAGAGTTGCTGATTATGTTAAGGATACAGACA
AGTTCAAAATTCTTGATATGACAGATGCAATATCTTTGAATTACAGTCGCGTTAAAAAATTAGCAAGTAAAAAAAGT
TTGCGTGCAATTATTTATTCTCTGGAACAAAAAAGATTAGAATCATATGAACGTTCTGTGGCGAATCTTTTTGATTT
GACCACTTTTATTTCATCCGTAGACCGTGACTATCTCTACCCTAATCTGGGCAGTAATATCCATATAGTCAATAATG
GGGTTGATACATCAGCCTTGAGATATATAAAAAGAGAAATAAAAATCGATAAGCCTGTGGAACTTATATTTATCGGA

AATATGTATTCTTTACAAAATATGGATGCTGCAAAACATTTTGCTAAGAATATTTTACCTTGCTTGTATGATGAGTT
TAATATTATTTTTAAAGTGATTGGTAAGATCTCAGAAACTAATAAAAATATATTAAATTCATTTAAAAATACAATTG
CTTTAGGTACTGTTGATGATATCAATTCTTCCGCTTCTACAGGGCATATAGGTATATGTCCTGTTCGTCTTGGAGCA
GGCGTACAAAATAAAATTCTTGAATACATGGCTTTAGGTTTACCATGTATTACATCTAGCATTGGTTATGAAGGTAT
TAATGCAAAATCAGGTAGCGAAATTTTTGTTGCAGATACAGTAGAGCAATATAAAAACGTACTAAGAGAAATAATTT
ACGATTATAATCGTTATACTGAAGTGGCTGAAAATGCCCGTAGTTTTGTAGAAAATAATTTTTCTTGGGAATCAAAA
GTTGCCAATTTAATGAATACATTAGATGAGAAATTATATGAACAATAATAAAATTATTACACCTATCATTATGGCTG
GTGGTTCAGGCAGTCGGTTGTGGCCACTATCAAGAATTCTCTATCCGAAACAATTTCTTAGCCTAATCGGTAGTCAT
ACCATGCTTCAAACAACGGCTAATCGTCTGGATGGTTTGGATTGTACCAACCCTTATGTCATTTGTAATGAACAATA
CCGCTTTATAGTTGCTGAACAGCTTAGAAAAATCGATAGATTGACTTCAAAGAATATCATCCTTGAGCCTGTTGGGC
GTAACACTGCCCCTGCAATTGCATTAGCGGCGTTGCTGATGTCTAAGTCTGATAAAAGTGCAGATGATCTTATGCTC
GTACTGGCTGCAGATCACGTTATACACGATGAAGAAAAATTTTGTAACGCTGTTAGATCGGCAATTCCATACGCTGC
TGATGGGAAATTGGTAACATTTGGTATAATTCCAGACAAAGCAGAAACTGGTTATGGTTATATACATCGAGGACAAT
ATATTAATCAGGAAGATTCGGATGCATTTATAGTGTCATCATTTGTTGAAAAGCCAAATCATGAGACAGCCACTAAA
TATCTTGCTTCCGGTGAGTATTATTGGAATAGCGGTATGTTTTTGTTTAGTGCAAATCGTTATATAGAGGAACTTAA
ACAATTTCGGCCTGATATTTTATCCGCTTGTGAAAAAGCAATTGCTTCAGCGAACTTTGACCTTGATTTTGTGCGTT
TAGATGAAAGTTCTTTCTCTAAGTGCCCTGAAGAATCAATTGATTACGCTGTAATGGAAAAAACAAAAGACGCAATT
GTTATTCCAATGGATGCTGGCTGGAGTGATGTCGGTTCATGGTCTTCTCTTTGGGAAATTAATGATAAAGACTCAGA
CGGCAACGTAATAGTTGGGGATATTTTCTCTCATGAAACAAAGAATTCTTTCATATATGCCGAATCGGGAATTGTTG
CTACAGTTGGAGTGGAAAATTTAGTTGTTGTCCAAACAAAGGATGCTGTTCTTGTCTCAGAGAGAAATAAAGTTCAG
GATGTAAAGAAAATAGTAGAACAAATTAAAAATTCAGGTCGTAGCGAGCATTATGTTCATCGCGAAGTATATCGTCC
TTGGGGTAAATATGATTCCATTGACACAGGGGAGCGTTATCAGGTCAAACGTATAACAGTAAATCCTGGTGAAGGAC
TTTCTTTACAAATGCACCATCATAGGGCAGAACATTGGATCATAGTTTCTGGAACTGCAAGGGTGACTATAGGTTCT
GAAACTAAGATTCTTAGCGAAAATGAATCTGTTTACATACCTCTTGGTGTAATACACTGCTTGGAAAATCCAGGGAA
AATTCCTCTTGATTTAATTGAAGTTCGTTCTGGATCTTATTTAGAAGAAGACGATGTTATCCGTTTTCAGGACCGAT
ATGGTCGTAGCTAAATTTTTGATAATGTAACGTTAGTAGAAGAGCGCTAATATTTTTAGTTAATCTGTAATAAGTAT
TATTTGTTTAAGGTATATCATGTCGAGTTTACCCTGCTTTAAAGCCTATGATATTCGCGGGAAATTAGGCGAAGAAC
TGAATGAAGATATTGCCTGGCGCATTGGTCGCGCTTATGGCGAATTTCTCAAACCGAAAACCATTGTGTTAGGCGGT
GACGTCCGACTCACCAGCGAAACCTTAAAACTGGCGCTGGCGAAGGGGTTACAGGATGCGGGCGTCGATGTGCTGGA
TATTGGCATGTCCGGCACCGAAGAGATCTATTTCGCCACGTTCCATCTCGGCGTGGATGGCGGCATCGAAGTTACCG
CCAGCCATAACCCGATGGATTACAACGGCATGAAACTGGTGCGCGAAGGGGCTCGCCCGATCAGCGGTGATACCGGA
CTGCGCGACATCCAGCGTCTGGCAGAAGCCAACGACTTTCCTCCCGTTGATGAAACCAAACGCGGTCGCTATCAGCA
AATCAATCTGCGTGACGCTTACGTTGATCACCTGTTCGGTTATATCAACGTCAAAAACCTCACGCCGCTCAAGCTGG
TGATTAACTCCGGGAACGGCGCGGCGGGTCCGGTGGTGGACGCCATTGAAGCCCGCTTTAAAGCCCTCGGCGCACCC
GTGGAATTAATCAAAGTGCACAACACGCCGGACGGCAATTTCCCCAACGGTATTCCTAACCCGCTACTGCCGGAATG
TCGCGACGACACCCGCAATGCGGTCATCAAACACGGCGCGGATATGGGCATTGCCTTTGATGGCGATTTTGACCGCT
GTTTCCTGTTTGACGAAAAAGGGCAGTTTATTGAGGGCTACTACATTGTCGGCCTGCTGGCAGAAGCGTTCCTCGAA
AAAAATCCCGGCGCGAAGATCATCCACGATCCACGTCTCTCCTGGAACACCGTTGATGTGGTGACTGCCGCAGGCGG
CACCCCGGTAATGTCGAAAACCGGACACGCCTTTATTAAAGAACGTATGCGCAAGGAAGACGCTATCTACGGTGGCG

AAATGAGCGCCCACCATTACTTCCGTGATTTCGCTTACTGCGACAGCGGCATGATCCCGTGGCTGCTGGTCGCCGAA
CTGGTGTGCCTGAAAGGAAAAACGCTGGGCGAACTGGTGCGCGACCGGATGGCAGCGTTTCCGGCAAGCGGTGAGAT
CAACAGCAAACTGGCACACCCCGTTGAGGCGATTAACCGCGTGGAACAGCACTTTAGCCGCGAGGCGCTGGCGGTGG
ATCGCACCGATGGCATCAGCATGACCTTTGCCGACTGGCGCTTTAACCTGCGCTCCTCTAACACCGAACCGGTGGTG
CGGTTGAATGTGGAATCGCGCGGCGATGTACCGCTGATGGAAGAAAAGACAAAACTTATCCTTGAGTTACTGAACAA
GTAATTCAGTAATTTCATATAAATGGGTTTTAAAAAACGGAAAAGATGAGATATCCGGTGTGGTATATCCAAGGTAA
TGCTATTCAGTATCTCTATGAGTGAGTTAACATCTATACCACATTTAAGCCGCACACTTCGGGATCCCCATATGAAT
ATCCTCCTTAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATA
TTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTT
GCGAACATTCCAGGCCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCG
GCGTAGTCGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCGCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTC
AACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGAAGTGATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAAACTGGTTCCTTACTATACGGTGAA
AGAGTTTGTCGAATCTCTGGAAACGCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTA
TTGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATTGATGGTGGTAACACCTTCTTCCAGGACACTATT
CGTCGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTTAACTTCATCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCT
GAAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTGGTAGCACCGATCCTGACCAAAATCGCCG
CCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGCCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTTCAC
AACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCAA
CGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGAATAACGGTGAACTGAGCAGTTACCTGATCGACATCACCAAAGATA
TCTTCACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACCGGT
AAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGCTGTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTTTGCACGTTATAT
CTCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTTGCCGCATCTAAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCGACAAGG
CTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTCGTGCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCCAGGGCTTCTCTCAGCTG
CGTGCTGCGTCTGAAGAGTACAACTGGGATCTGAACTACGGCGAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCAT
CCGTGCGCAGTTCCTGCAGAAAATCACCGATGCTTATGCCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGT
ACTTCAAGCAAATTGCCGATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGATGTCGTTGCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCCG
GTTCCGACCTTCTCCGCAGCGGTTGCCTATTACGACAGCTACCGTGCTGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGC
ACAGCGTGACTATTTTGGTGCGCATACTTATAAGCGTATCGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATT
AA

[0892] SEQ ID NO:14(O8rfb基因座核苷酸序列实例-O8-EPA生产菌株stLMTB11734)

[0893] ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCG
ATACCCAAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGAT
CAAAGAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAAT
CACTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG
AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCATT
TGTCGTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATGATTG
CACGTTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCCGTCATC
CAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGATCAGCCGCA
GACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTCGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAACTGGAACGTACTC

AGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCCGTTGATGCAATG
CTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAGTATGGCCTACGCAA
CCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAATCTGACCGGATGTAAC
GGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAATCTTCCTGCCGTTGTTTT
ATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCAGGATTTTCCTTGTTTCCAGA
GCGGATTGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTAACGCTCGTCACATCATAGGCAT
GCATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATACCTCTATTAATCAAACTGAGAGCCG
CTTATTTCACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGCTAGCGATCGCTTAAGATCTAGGATTTCATTATG
TTACTTCCTGTAATTATGGCTGGTGGTACCGGCAGTCGTCTCTGGCCGATGTCACGCGAGCTTTATCCGAAACAGTT
CCTCCGCCTGTTCGGGCAGAACTCCATGCTGCAGGAAACCATCACCCGACTCTCGGGCCTTGAAATCCATGAACCGA
TGGTCATCTGTAACGAAGAGCACCGCTTCCTGGTGGCTGAACAGCTACGCCAGCTCAATAAGCTGTCGAATAATATT
ATTCTTGAGCCGGTCGGGCGCAACACCGCCCCGGCCATCGCCCTGGCAGCCCTTCAGGCCACCCGCGACGGCGACGA
CCCGCTGATGCTGGTTCTCGCCGCTGACCATATCATCAATAACCAGTCGGCCTTCCACGACGCCATCCGGGTCGCCG
AGCAGTATGCTGATGAAGGTCATCTGGTCACCTTCGGTATCGTGCCGAATGCCCCGGAAACTGGCTACGGTTACATT
CAGCGCGGCGTGGCGCTCACCGATAGTGCCCATTCCGCGTACCAGGTGGCCCGCTTTGTGGAGAAGCCGGATCGCGA
GCGCGCCGAGGCTTACCTCGCCTCCGGGGAGTACTACTGGAACAGCGGCATGTTTATGTTCCGCGCCAAGAAATACC
TCATCGAGCTGGCCAAATACCGTCCGGATATCCTGGAAGCCTGCCAGGCTGCGGTGAATGCCGCCGATAATGGCAGC
GATTTCATCAATATCCCGCATGATATTTTCTGCGAGTGCCCGGATGAGTCCGTGGACTATGCCGTTATGGAGAAAAC
CGCCGATGCGGTGGTGGTCGGTCTCGATGCTGACTGGAGCGACGTCGGCTCCTGGTCCGCACTATGGGAGGTCAGCC
CGAAAGACGAGCAGGGCAATGTCCTCAGCGGTGACGCGTGGGTACACAACAGCGAAAACTGCTACATCAACAGCGAC
GAGAAGCTAGTGGCGGCCATTGGCGTAGAGAATCTGGTGATTGTCAGCACTAAGGACGCCGTGCTGGTGATGAATCG
CGAGCGTTCCCAGGACGTGAAGAAGGCGGTCGAGTTCCTCAAGCAGAACCAGCGCAGCGAGTACAAGCGCCACCGTG
AGATTTACCGCCCCTGGGGCCGTTGCGACGTAGTGGTCCAGACCCCGCGCTTCAACGTCAACCGCATCACGGTGAAA
CCAGGCGGTGCCTTCTCGATGCAGATGCACCACCATCGCGCCGAGCATTGGGTTATTCTCGCCGGCACCGGTCAGGT
GACTGTCAACGGTAAGCAGTTCCTGTTGTCCGAGAACCAGTCCACCTTTATTCCGATTGGCGCCGAGCACTGCCTGG
AAAACCCTGGCTGTATTCCGCTGGAAGTGCTGGAGATCCAGTCGGGGGCGTACCTTGGCGAGGACGACATTATTCGT
ATTAAAGACCAGTATGGTCGTTGCTAATTATTTTCGGGACAAGACGCAGAATGACACAGTTAACTTGTTTTAAAGCT
TATGACATCCGTGGTGAACTGGGTGAGGAACTGAACGAGGACATCGCCTACCGTATCGGTCGCGCCTACGGCGAATT
TCTGAAACCCGGGAAGATAGTGGTGGGGGGCGATGTGCGCCTCACAAGCGAGTCGCTGAAGCTGGCGCTGGCCCGCG
GGTTAATGGACGCCGGTACCGACGTGCTGGACATCGGCCTGAGCGGTACCGAAGAGATTTACTTTGCCACCTTCCAC
CTTGGGGTAGATGGTGGCATCGAGGTGACCGCGAGCCACAATCCTATGAACTACAACGGCATGAAGCTGGTGCGCGA
GAATGCGAAGCCCATCAGCGGCGACACCGGCCTGCGGGATATCCAGCGCCTGGCGGAGGAAAACCAGTTCCCGCCAG
TGGACCCGGCGCGTCGCGGGACCCTGAGCAAGATATCGGTACTGAAGGAGTATGTTGACCATCTGATGAGCTACGTG
GACTTCTCGAACTTCACCCGTCCACTGAAGTTGGTGGTGAACTCCGGAAACGGGGCTGCGGGGCACGTGATTGATGA
GGTGGAGAAACGCTTCGCGGCGGCTGGGGTGCCGGTAACCTTTATCAAGGTGCATCACCAGCCGGATGGCCATTTCC
CTAACGGTATCCCGAATCCGCTGCTGCCGGAGTGCCGCCAGGATACCGCCGACGCGGTGCGCGAGCATCAGGCCGAC
ATGGGGATTGCCTTTGACGGCGACTTCGATCGCTGCTTCCTGTTCGATGACGAAGCTTCGTTTATCGAGGGGTATTA
CATTGTCGGCCTGCTGGCTGAGGCGTTCCTGCAGAAGCAGCCGGGAGCGAAAATCATTCACGACCCGCGCTTGACGT
GGAACACGGTAGACATCGTGACCCGCAACGGCGGCCAGCCGGTGATGTCGAAGACGGGGCATGCGTTCATCAAGGAG

CGGATGCGTCAGGAAGACGCTATCTACGGCGGGGAGATGAGTGCGCACCATTACTTCCGCGATTTCGCCTACTGCGA
TAGCGGGATGATCCCGTGGCTGCTGGTGGCGGAGCTGCTGTGTCTGAAGAACAGCTCGCTGAAATCGCTGGTGGCGG
ACCGCCAGAAGGCGTTCCCTGCGTCGGGAGAGATCAACCGCAAGCTAAGTAATGCTGCTGAGGCGATCGCCCGCATC
CGGGCGCAGTATGAGCCGGCGGCTGCACACATCGACACAACGGACGGGATCAGTATTGAATACCCTGAATGGCGCTT
TAACCTGCGCACGTCTAACACCGAGCCGGTGGTGCGTCTGAACGTTGAGTCCAGAGCTGATGTGGCGCTTATGAATG
AAAAAACGACCGAGCTGTTACACCTGTTAAGCGGGGAATAAGGTGAGAGATTTACTAACGACGATTTATCGTTATCG
GGGATTTATCTGGAGCAGTGTTAAACGTGATTTTCAGGCACGCTATCAAACTAGTATGCTGGGCGCACTATGGCTCG
TTTTACAACCGCTCTCTATGATTCTGGTCTATACCCTGGTTTTTTCCGAGGTGATGAAGGCAAGAATGCCCGATAAT
ACCGGGTCGTTTGCCTATAGTATTTATCTCTGTTCCGGGGTACTGACCTGGGGATTATTTACTGAGATGCTGGATAA
AGGTCAGAGCGTATTTATTAACAATGCTAATCTGATCAAGAAACTCAGTTTTCCGAAAATCTGTCTGCCGATCATCG
TGACGTTATCGGCGGTGCTAAATTTCGCGATTATTTTCAGTCTGTTTCTAATTTTTATCATTGTCACCGGTAACTTC
CCCGGCTGGCTCTTTCTCTCGGTGATACCGGTCCTGCTTTTGCAGATCCTGTTTGCCGGTGGGCTGGGGATGATCCT
TGGTGTCATGAACGTCTTTTTCAGGGATGTGGGGCAACTGGTTGGCGTTGCGCTGCAATTCTGGTTTTGGTTCACAC
CCATTGTTTATGTACTGAATTCATTACCTGCATGGGCAAAAAATCTGATGATGTATAACCCGATGACTCGGATCATG
CAATCTTATCAGTCCATCTTCGCCTATCATCTGGCCCCCAACTGGTATTCGCTATGGCCAGTATTGGCTCTCGCCAT
TATTTTCTGCGTCATCGGTTTCAGGATGTTCCGCAAGCATGCGGCGGATATGGTGGATGAATTATAATGAGTTATAT
CAGAGTAAATAATGTCGGTAAGGCGTATCGCCAGTATCACTCAAAGACCGGGAGACTGATCGAATGGTTATCCCCTC
TGAATACCAAACGCCATAATTTGAAATGGATCCTCCGCGATATTAATTTCGAAGTCGCTCCGGGCGAGGCTGTCGGT
ATTATCGGTATCAACGGTGCAGGCAAGAGTACCCTGCTTAAACTCATAACCGGGACGTCCAGGCCGACGACTGGAGA
AATTGAAATCTCCGGACGTGTCGCTGCATTACTCGAATTGGGGATGGGGTTTCATTCTGATTTCACTGGTCGGCAGA
ATGTTTATATGTCTGGGCAACTGTTGGGGTTATCGTCAGAGAAAATAACTGAACTGATGCCGCAAATTGAAGAGTTT
GCTGAGATTGGGGACTATATCGATCAACCTGTGCGCGTCTACTCCAGTGGGATGCAAGTTCGATTAGCTTTTAGTGT
AGCGACGGCTATCCGTCCTGATGTGCTAATTATCGATGAGGCATTATCTGTTGGGGATGCATATTTCCAGCATAAAA
GCTTTGAGCGTATTCGAAAATTTCGTCAGGAAGGGACCACGCTGTTGCTGGTATCCCATGATAAACAAGCGATCCAA
AGCATTTGCGACCGGGCCATTTTATTGAATAAAGGCCAAATTGAAATGGAAGGTGAACCTGAAGCAGTGATGGATTA
TTACAATGCTCTTCTGGCCGATAAACAAAATCAGTCCATTAAACAAGTTGAGCATAATGGTAAAACGCAAACTGTTT
CAGGCACTGGTGAGGTGACTATCTCTGAGGTTCATCTTCTCGATGAACAGGGCAATGTGACTGAATTTGTTTCGGTA
GGGCATCGTGTCAGCTTGCAGGTCAACGTTGAGGTCAAGGACGATATTCCTGAGCTTGTTGTCGGATATATGATTAA
GGATCGACTTGGGCAGCCGATTTTCGGGACCAATACGTACCATCTCAATCAGACACTCACCTCCCTGAAAAAAGGAG
AAAAGCGTTCGTTCTTATTTTCTTTCGATGCGAGATTGGGGGTTGGCTCCTATTCTGTCGCTGTCGCGTTGCATACT
TCCAGTACGCACCTCGGCAAAAACTATGAATGGCGCGATCTGGCCGTGGTATTCAACGTCGTTAACACGGAACAACA
AGAGTTTGTCGGCGTGTCCTGGTTGCCGCCTGAACTGGAGATTTCTTAATGGGTTCGTCGTTTTATCGTTCATTTGA
AGAACGACACAGAGGTTCGGTTGAAGAAATCAAGCGCCGCTTGAGTTTTTATTTACCTTTTCTTGCAGGTCTGAAGG
ACATTTATCCTGATGGCGTGATTGCGGATATTGGTTGCGGACGTGGCGAATGGTTGGAGATCCTGACTGAAAATGGC
ATTGCGAACATCGGCGTCGATCTCGATGATGGCATGCTGGCGCGCGCCAGGGAGGCCGGACTGAATGTGCAGAAAAT
GGATTGTCTGCAGTTTTTGCAAAGTCAGGCGGATCAGAGCCTGATAGCGTTGACCGGTTTTCATATTGCTGAGCATT
TGCCGTTTGAGGTCCTGCAGCAACTCGCCATGCATACCCTACGGGTGCTGAAACCAGGTGGTTTGCTGATCCTCGAA
ACGCCGAACCCGGAGAATGTAAGCGTCGGCACCTGTTCATTTTATATGGATCCAACGCATAATCATCCTCTGCCACC
GCCACTGCTTGAGTTTTTACCTATTCATTATGGTTTTACCCGAGCAATTACCGTTCGTCTGCAGGAAAAAGAGGTTC

TTCAATCTCCGGATGCAGCCGTTAATTTGGTCGATGTACTCAAAGGGGTGAGCCCCGACTACAGCATCATTGCTCAG
AAAGCAGCGCCAACAGATATTCTTGAACGCTTTGACACCCTGTTTACCCAGCAGTACGGTCTGACGCTGGATGCTCT
GAGCAACCGTTACGATGCGATTTTGCGCCAACAGTTTTCGTCCGTTGTCTCACGGCTGGAGACGTTGAACCAAACCT
ATATGCAACAGATAAGCCAAATGTCAGAGACTATTCAGACGTTGCAAGGTGAGGTTGACGATCTGAGTCATGTCATC
GATCAGAACCATCAGCTTCATCAGCAAATGGCGGATTTACATAACAGTCGTTCATGGCGTATTACTCAACCACTACG
CTGGTTGTCTTTGCAACGTCAATTATTACGTCAGGAAGGGGCTAAAGTGCGAGCCCGTAGGGCTGGGAAAAAAATAT
TGCGCAAAGGGATGGCGCTCTCGCTGGTCTTTTTCCATCGTTACCCTAAGTCTAAGGTTTATCTGTTTAAGGTTCTG
AGAAAAACTGGCTGCTATACATTGCTACAACGTTTGTTCCAACGCGTAATGCTGGTGCAATCTGACACGATGATGAT
GCAGTCCAGAAGATATGATGTGGGTACTGAAGAAATGACAAGTCGCGCGATGAGTATTTATAACGAATTAAAAAATA
AAAATACGGAGAAATAACGATGCGTATTGTCATAGATTTACAAGGCGCACAGACGGAAAGCCGCTTTCGTGGCATCG
GTCGTTATAGTATCGCAATCGCCAGAGGCATAATCAGAAATAACAGCCGGCATGAGATTTTCATCGCGCTATCCGCC
ATGCTGGATGAGTCGATTGCAAATATTAAGGCGCAATTTGCCGATCTCCTGCCGGCAGAAAATATAGTCGTATGGCA
TGCCGTAGGCCCTGTTCGTGCGATGGACCAAGGTAATGAATGGCGTCGGGAGAGCGCAGAACTGATTCGGGAAGCGT
TTCTTGAATCATTGTGTCCAGATGTCGTTTTCATTACGAGTTTGTTTGAAGGTCATGTCGACGATGCGGCTACATCG
GTACACAAATTTAGTCGTCAGTATAAAGTAGCCGTACTGCACCACGATCTTATCCCCCTCGTGCAGGCGGAAACCTA
TCTGCAGGACGATGTATACAAACCCTACTATTTACAGAAAGTTGAGTGGTTAAAAAACGCTGACCTTTTGTTGACTA
ACTCTGCTTATACCGCACAGGAAGCGATCGAGCATCTGCATTTACAGGGCGATCATGTGCAGAATATTGCAGCCGCA
GTCGATTCTCAGTTTTGTATGGCGGAGGTGGCAGCGAGCGAAAAAGAGACCGTCCTTGGCCATTACGGTATTCAGCG
CGAGTTCATGTTGTATGCGCCCGGAGGATTTGACTCAAGGAAAAACTTTAAACGGTTGATTGAGGCCTATGCCGGGC
TCAGTGATGCCTTACGTCGCAGTCATCAACTGGTCATCGTCAGTAAGCTTTCCATCGGTGATCGTCAGTATCTGGAA
TCCCTTGCGTCAGGTAATGGTTTACAGCAGGGCGAACTGGTACTCACTGGTTATGTGCCGGAAGATGAGCTGATCCA
GCTCTATCGCCTATGTAAGCTGTTCATCTTTGCTTCACTACATGAAGGTTTTGGGTTGCCGGTTCTGGAAGCAATGT
CGTGCGGTGCGCCGGTGATTGGCTCAAATGTCACCAGTATTCCTGAAGTCATCGGTAATCCTGAGGCATTATTCGAC
CCGTATTCTGTCTCTTCCATGAGGGATAAGATCGCGCAATGTTTGACTGATGATACCTTCCTCGCGCGTCTGAAAGA
AATGGCGCAGCAGCAAGCGCGTAATTTCTCTTGGGATAAAGCTGCGGTGACTGCTCTGGAAGCTTTCGAAAAGATCG
CGGTAGAAGACACCGGTACTGCGCAGGTTTTGCCTGAAGCTTTGATTCAGAAGATCCTTGCTATCTCACAAGGGCAG
CCAGATGACCGCGATCTGCGCTTGTGCGCAACGGCCATTGATTACAATCTGAAAACGGCAGAACTTTATCAAATCGA
CGATAAATCGCTGAACTGGCGTGTGGAAGGCCCATTCGATAGCTCATATAGTCTGGCGTTGGTCAACCGCGAATTTG
CCCGGGCACTCTCAGCCGATGGTGTAGAGGTTTTATTGCATTCCACTGAAGGACCAGGTGATTTTGCCCCAGATGCC
TCGTTTATGGCACAGTCGGAAAATAGTGATCTTCTGGCATTTTATAATCAATGTCAGACCCGCAAGAGTAACGAAAA
GATAGATATTATTAGCAGAAATATCTATCCACCGCGGGTTACCAAAATGGATGCCAAAGTAAAATTCCTTCATTGTT
ATGCTTGGGAAGAAACGGGCTTTCCGCAACCGTGGATCAATGAATTTAATCGGGAACTTGACGGAGTGCTGTGTACT
TCGGAACATGTTCGTAAAATACTGATTGATAACGGACTGAATGTGCCCGCATTTGTTGTTGGCAATGGCTGTGACCA
TTGGCTCAATATCCCAGCCGAGACGACAAAAGATGTGGATCACGGAACATTCCGTTTCCTGCACGTCTCTTCTTGTT
TCCCACGCAAAGGGATACAGGCAATGCTTCAGGCTTGGGGGAAGGCGTTCACTCGTCGTGACAATGTTATCTTAATC
ATTAAGACTTTTAACAATCCGCACAATGAAATTGACGCATGGCTGGCTCAGGCCCAGGCTCAATTCATAGACTATCC
CAAAGTTGAAGTGATCAAAGAGGATATGTCAGCCACCGAGCTTAAAGGGCTTTATGAAAGCTGTGATGTTTTGGTTG
CTCCAGGTTGCGCTGAAGGCTTTGGTTTACCTATTGCTGAAGCAATGCTGAGTGGGCTACCGGCTATCGTCACCAAT
TGGAGCGGGCAACTTGATTTTGTTAATTCACAAAATTCATGGCTGGTTGACTATCAGTTCACTCGGGTAAAAACGCA

CTTTGGTCTGTTTTCCTCAGCCTGGGCCAGTGTGGATATTGACAACTTAACAGATGCATTAAAAGCGGCAGCCTCAA
CCGATAAATCAGTGCTGCGTGACATGGCCAATGCTGGTCGCGAGCTTCTTCTGCAGCAGTTTACCTGGAAAGCGGTG
GCTGATCGTTCTTGCCAGGCGGTCAAGACTCTGCGTGCGCATATTGATATTGCACAGCATCGGGCGCGCATTGGCTG
GGTGACGACCTGGAACACGAAATGTGGGATCGCAACCTATTCCCAGCATCTGGTGGAAAGCGCACCTCATGGCGCGG
ATGTTGTTTTTGCTCCCCAGGTCAGCGCTGGCGATCTTGTGTGTGCAGACGAAGAGTTTGTACTTCGCAACTGGATT
GTAGGTAAAGAGAGCAACTATCTGGAAAACCTCCAGCCACACATTGATGCTCTGAGACTCGATGTCATTGTGATCCA
ATTCAACTATGGATTCTTTAATCATCGAGAACTGTCGGCGTTTATTCGTCGCCAGCATGACGCCGGTCGTTCAGTTG
TTATGACGATGCACTCAACTGTGGATCCGCTGGAAAAAGAGCCGAGCTGGAATTTCCGTCTTGCTGAAATGAAAGAG
GCGCTGGCACTTTGCGACCGGTTGTTGGTGCATTCGATTGCCGATATGAACCGCCTTAAAGATTTAGGCTTAACTGC
GAATGTTGCTTTATTCCCGCACGGTGTTATCAACTACTCCGCAGCGAGCGTCACACGTCAACAGCAGTCTTTACCGC
TAATTGCGAGCTATGGCTTCTGCTTACCGCATAAGGGCCTGATGGAACTAGTAGAATCCGTCCATAGACTCAAGCAA
GCCGGTAAACCGGTTCGTTTACGACTGGTGAACGCAGAGTATCCTGTTGGGGAGTCACGCGATCTGGTGGCAGAGCT
TAAAGCTGCTGCTCAGCGGTTAGGTGTTACCGATCTGATTGAGATGCATAATGATTTCCTACCTGATGCGGAGAGTC
TGCGGTTGCTTTCAGAAGCCGATCTTCTGATTTTTGCTTATCAGAATACTGGGGAGTCTGCTAGCGGGGCGGTACGT
TATGGTATGGCGACTCAAAAACCTGTTGCGGTAACGCCCCTGGCGATATTTGATGATTTGGACGATGCCGTCTTTAA
ATTTGATGGATGCAGCGTCGATGATATCAGTCAGGGGATTGACCGGATCCTGAATTCCATCCGTGAACAGAACTCTT
GGGCAACCAGGACTCAACAACGTGCCGATGCATGGCGGGAACAACATGATTATCAAGCTGTTTCACGCCGTCTGGTT
AATATGTGTCAAGGCTTAGCTAAAGCTAAATATTTTAAATAAAAATATCTCTCTTGTATTTTTTGCCTTTGAATACA
AGAGGGGTTAGATAATGTGTCATTTATTATGAAAATTATTTTTGCTACTGAGCCAATTAAATACCCATTAACGGGCA
TCGGTCGGTATTCCCTGGAGCTGGTTAAGCGGCTGGCGGTCGCCCGCGAAATTGAAGAATTAAAGCTATTTCACGGT
GCGTCGTTTATAGAACAGATCCCTTTGGTGGAGAATAAAAGCGATACCAAAGCCAGCAATCATGGTCGTCTGTCGGC
GTTTCTACGCCGACAGACGCTGTTGATTGAGGCTTATCGCTTGCTGCATCCGCGGCGCCAGGCGTGGGCATTGCGCG
ACTATAAGGATTATATCTACCATGGCCCCAATTTTTATCTGCCGCATAAACTGGAACGCGCCGTGACCACGTTTCAT
GACATATCCATTTTTACCTGCCCGGAATATCATCCAAAAGATCGGGTTCGCTATATGGAGAAGTCCCTGCATGAGAG
TCTGGATTCGGCAAAGCTGATCCTGACCGTTTCTGATTTCTCGCGCAGTGAAATTATCCGCTTGTTCAACTATCCGG
CGGAGCGGATCGTAACCACCAAGCTAGCCTGCAGCAGTGACTATATCCCACGCAGCCCGGCAGAGTGTCTGCCGGTA
CTGCAGAAATATCAGCTGGCGTGGCAGGCCTACGCGCTATATATCGGCACTATGGAGCCACGTAAAAATATCCGAGG
CCTGCTGCATGCCTATCAGCTGCTACCGATGGAGATCCGCATGCGCTATCCGCTAATCCTTAGCGGCTATCGCGGCT
GGGAAGACGATGTGCTGTGGCAGTTAGTCGAGCGCGGTACTCGGGAAGGCTGGATCCGTTACCTCGGATATGTTCCG
GATGAAGACCTGCCGTATCTGTACGCAGCGGCCAGAGTCTTTGTTTATCCCTCCTTCTACGAGGGATTCGGTTTACC
TATTCTTGAAGCGATGTCTTGCGGTGTGCCGGTAGTATGCTCCAATGTCACCTCTTTGCCTGAGGTTGTTGGCGATG
CCGGCCTCGTTGCCGATCCTAATGATATAGACGCGATTAGCGCGCAAATTTTGCAGAGCCTGCAAGATGATAGCTGG
CGGGAAATCGCCACCGCGCGCGGTCTTGCTCAGGCGAAACAGTTTTCGTGGGAGAACTGTGCGACACAGACCATTAA
CGCCTATAAATTACTCTAAGGGTGTCAGTTGAGAGTTCTACACGTCTATAAGACTTACTATCCCGATACCTACGGCG
GTATTGAGCAGGTCATTTATCAGCTAAGTCAGGGCTGCGCCCGCCGGGGAATCGCAGCCGATGTTTTCACTTTTAGC
CCGGACAAAGATACAGGTCCTGTCGCTTACGAAGATCATCGGGTCATTTATAATAAACAGCTTTTTGAAATTGCCTC
CACGCCGTTTTCGCTGAAAGCGTTAAAGCGTTTTAAGCTGATTAAAGATGACTACGATATCATCAACTACCATTTTC
CGTTTCCCTTTATGGATATGCTGCATCTTTCGGCGCGGCCTGACGCCAGGACTGTGGTGACCTATCACTCTGATATA
GTGAAACAAAAACGGTTAATGAAGCTGTACCAGCCGCTGCAGGAGCGATTTCTCAGCGGCGTAGATTGCATCGTTGC

CTCGTCGCCCAATTACGTGGCTTCCAGCCAGACCCTGAAAAAATATCTGGATAAAACGGTGGTGATCCCGTTTGGTC
TGGAGCAGCAGGACGTGCAGCACGATCCGCAGAGGGTCGCGCACTGGCGGGAAACTGTCGGCGATAAGTTCTTTCTC
TTCGTCGGCACTTTCCGCTACTACAAAGGGCTGCATATTCTGATGGATGCCGCTGAGCGTAGCCGACTGCCAGTGGT
GGTTGTAGGGGGCGGGCCGCTGGAATCGGAAGTGCGGCGTGAAGCGCAGCAGCGCGGGCTGAGCAATGTGATGTTTA
CCGGCATGCTCAACGACGAAGATAAGTACATTCTCTTCCAGCTCTGCCGGGGCGTGGTATTCCCCTCGCATCTGCGC
TCTGAGGCGTTTGGCATTACGTTATTGGAAGGCGCACGCTTTGCAAGGCCGCTGATCTCTTGCGAGATCGGTACAGG
TACCTCTTTCATTAACCAGGACAAAGTGAGTGGTTGCGTGATTCCGCCGAATGATAGCCAGGCGCTGGTGGAGGCGA
TGAATGAGCTCTGGAATAACGAGGAAACCTCCAACCGCTATGGCGAAAACTCGCGTCGTCGTTTTGAAGAGATGTTT
ACTGCCGACCATATGATTGACGCCTATGTCAATCTCTACACTACATTGCTGGAAAGCAAATCCTGAGCGGCCGCGAG
CTCGTCGACTCGAGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAA
TAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAG
TACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTCCAGGCCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAA
TGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCGCTCAACATCGAAAGCCGTGGT
TATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGAAGTGATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAAACTGGT
TCCTTACTATACGGTGAAAGAGTTTGTCGAATCTCTGGAAACGCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCAGGTG
CAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATTGATGGTGGTAACACC
TTCTTCCAGGACACTATTCGTCGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTTAACTTCATCGGTACCGGTGTTTCTGG
CGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTGGTAGCACCGA
TCCTGACCAAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGCCGATGGCGCAGGTCAC
TATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGG
TGGCCTGAACCTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGAATAACGGTGAACTGAGCAGTTACCTGA
TCGACATCACCAAAGATATCTTCACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCG
GCTAACAAAGGTACCGGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGCTGTCGCTGATTACCGAGTC
TGTGTTTGCACGTTATATCTCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTTGCCGCATCTAAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCAC
AGCCAGCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTCGTGCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCC
CAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGCTGCGTCTGAAGAGTACAACTGGGATCTGAACTACGGCGAAATCGCGAAGATTTT
CCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCTGCAGAAAATCACCGATGCTTATGCCGAAAATCCACAGATCGCTA
ACCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAATTGCCGATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGATGTCGTTGCTTATGCA
GTACAGAACGGTATTCCGGTTCCGACCTTCTCCGCAGCGGTTGCCTATTACGACAGCTACCGTGCTGCTGTTCTGCC
TGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTGACTATTTTGGTGCGCATACTTATAAGCGTATTGATAAAGAAGGTGTGTTCC
ATACCGAATGGCTGGATTAA

[0894] SEQ ID NO:15(O15rfb基因座核苷酸序列实例-O15-EPA生产菌株stLMTB11738)

[0895] ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCG
ATACCCAAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGAT
CAAAGAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAAT
CACTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG
AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCATT
TGTCGTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATGATTG
CACGTTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCCGTCATC

CAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGATCAGCCGCA
GACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTCGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAACTGGAACGTACTC
AGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCCGTTGATGCAATG
CTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAGTATGGCCTACGCAA
CCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAATCTGACCGGATGTAAC
GGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAATCTTCCTGCCGTTGTTTT
ATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCAGGATTTTCCTTGTTTCCAGA
GCGGATTGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTAACGCTCGTCACATCATAGGCAT
GCATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATACCTCTATTAATCAAACTGAGAGCCG
CTTATTTCACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGCTAGCATGAGCAAAACTAAACTAAATGTTCTTTA
CCTTGCAATAAGTCAGGGTGCCAATTACCTACTGCCATTATTAATTTTTCCTTATCTTGTTAGAGTCATTGGTGTAT
CGAATTTTGGTGATCTGAGTTTTTCATTGATAACTATACAAGTGTTGTTAATGGTTGTTGAATATGGTTTTGGATAT
AGTGGGACAAGAGAAATAGCACTAAATAACGATAAAAAATACCATTCTGAATTTTTTTGCGGTGTGGTGCTTGCTCG
TTTTATATTAATGCTAATTGCAGCTATAATACTCATAATACTCTGTTTTTTTTATGTTTTTAACGACGTTAAGTCTT
TGTTATGTGTTGGTTTTCTGTCCGTAATTGCAGGTGTTTTCAATCCAAATTGGTTTTTGCAAGGTAAGGAAATGATG
AGTGTGATGGCTGTGCTGTCACTATTTTCACGAGGCATAGCAGTCGTTGCAGTTTATCTAATTATAAAACCCGCAAC
GCCGATGTACATCAGTGCCTTATTATTGAGCATGCCATATATTTTGTATTCATTCTGTGGCGTTGCCTACTTACTTA
TTATCAAGGAGATTTTTTTATGTAGGCCACCGATAAAGAAAATTCAAGTAATTTTAAAAAATGGATTTCATTTTTTT
TGTTCAACACTTGCGACTAGTGCATACACAATGTTGACCCCTCTTGTATTGGGTGGCGTATCTGGAAAGTTTGATGT
AGGCATCTTTAACTCAGCTAACATGATCAAACAAGGTTTGGCTGGACTTGCATCACCATTAGTCCAAGCTTTTTATC
CAAGAATTAACATTTTGCAAAGAGAGAATCCATATATTGCAAACTTAAAATCTAGAATGATTCTTAAATACTTGCTT
GTTTTTTACATGGCTTTAGCAATACCATTTTTACTTTTTGCCAACCAATTATCATTATTAATATTCGGCATGAAAGG
TGAAGTAATTGCAGGTGCAATGCAATTAATGACATTGCTTCCTATATTCATAGGTTTTAATACAGTTGTCGGGTTAC
TTGTATTAGTACCTAATGGGATGCAAAAACAGTATTTCAAATCTATTTTCCTAGGAACTATTACTTGTTTAAGCATA
GTTTATCCAGCATGTAAATATTATGGAGCAACGGGTGCGATTGTGAGTCTTATTGTAGCTGAAATTTTCGTTGGCAT
GGGAATGCTTAAACAATTCATTAAAGTAAATAAAACCGTATGTAGGCCTCATAAATTATGAATATCTCGGTAATAAT
ATCTGTTTGGAAACGCCCAGTTCAATTAGAATTGATTCTCTCTGAGCTCGATTCTCAGGCTAAAGACAATAGTCTAC
ACCTAGAAGTAATTGTTTCCGATAGTCATAGTGGTAAAGAAATTGATGATGTAGTTGCTGATAATATTCATAAAAAG
AAAAATATTAATATTATCCATCAACATACTAAAAATATACTCTCCGCTAAGCGCAATTTCGGAGCATCCCTAGCCCA
TGGGGATTATTTAATATTTCTTGATGATGATTGTATACCCGCAAGTGGATATATATCATCGTTGCTGAACTATTTAA
AAAAAATGAATAGTAAAAGCGTTTTATGTGGGGAAGTTAGATTCGAAAATGAACTCATTGAGACCAGCAATTACTAT
CGCTACAGGAACTCTTTACACCCTAAGTTTAGTGATAGTCCTGATATCTCTATGAATGCCTGGACTTTTGTCGCAAT
GAATTGTGTTCTTGATAGAAAGGCATTTTCATCAGGTATAGTTTCATATAATGAAAATTTTATTGGTTATGGTTGTG
AAGATCATGAGTTTGGGTGGCAACTTGAAAAAAATGACTTCAAAATTATTTTTGCTGATTTTAAAATATTACATCAC
GAATACAGTGGCGATATAGAAGGATATACAAAAAAAATTCGTGCTACAGCACGTGATGGTATGAATGTATTAAGCAA
AGTAAGGCCTGAAATGTTTTCTACTAATAAAAAATTATTCCTAGTTGAGAAAATATTTAGTAAACACAAAACGTTTA
GTAAAATATGCCAATCAATATTTTTCAATAAATTTATTTTTAAAAAAATAATACAATTTTTAAAAAAAACAGATGCA
AATAAAAAACTCTATTTCCCAATTCTTTACAGATATGTGTTGATTTCGGCATATATACATGGTATTGGAGAGCGTGG
CACCTCAAAAACAGATGATTTGCTTAAGAACTGGTATATATAGATGATGCTATCTTCATTTATTAAGACATTTGTAT

GGAAGGTAAAAAACAATGAAGTATAATGCATTGATGGCTTTTTTATTATTTTTTGTTGTTTTTTTTAGATTGTCGCT
GATAATACCTTTCTTATATTTGGCATTTATTCCTGCATTTTTTGGTATTATGTATTTAGTGCGTAATTTTATGATTA
CTATGGGCAATGGATTGGTATCTATAGATCGTAAAAATTTGTTGCTGTTATCTATATTCATAATTATTTTTTTATTT
TGTTTGGTTTTCGATTTGTTTCAAAAAAGCCATTCTTTTCAAAGTTATTTTACCGTTAGATTATTTATGTTGTTTTT
ATTTTCATTTGTTCCTGCGTATTATTTAGTAAATAGATTCATAAAGGGTGACTTGAAATTAATGGAGCGAATATTAG
TGTATTCTCTCTGGGTTCAAATAGTTATTTTTTTTGGTATGTATATAAGTCCAGAGTTAAAAAGATTGTTATATACT
TTCTTTGGTATGTCTGACTCTGTTAATCTTTGGGAACAAAATGCTAAAGTAAGAGGATTTGGGTTGTCGGGTGAAAT
AAATTTCATGACACCATTTTTGATGATCTATATGTCATTTTTTATGATGAAAAGGCGTTATGCTTTAATTACTTTAA
TTTGTCTGACTCAAATCGTAAATTCTAACATGGCTGTGATTGCAGCCATTATTGGTATCGGTTGCTCTAGACTTAAT
ATTAATATAAAAATTGCAACAGTATTGATTTTGGGAGTTTTAGTTTATAGCTTAGGAGCGGTGTTCTTTCCTCGATT
TTATGATGAGTTCGTTTCTGGAGATGGCACAAGAACTCTGGATATCTTATTACAGCAACATGTGTTTGTTGTAGGTA
ATTTAGATTTTTTTAATATTATATTTGGATTACAGCAAAACATATCTTCATCAATCCCCGATATTAAACAAAGTTCG
GATATGGGCTGGGTTATACTGTTTAATTACGGTGGGTTAACATTTATTACACTCTTTTTATTTTTAATCTTTACTAT
TTCTATTGCGACATTTGGAATGACATATCAAGCAATTATATGGATGTTAATTGGGATAATTTTCAATACCAAAGGTT
TAGTTTTAGGATCTAACGGCTATTTCTTTCTATCTTTTATATATATGTTTTTGAATAGAGTAACACTTAGTGGACAG
AGTTCAATTACTAATAAGTTAGGTCAAGTAAGTAAATAGCTTCCAGAGTATATTTGTCAATGATTTGAGGTTCGGTT
ATTATGTTTTCATCTAAAACACTGTTAATTACTGGTGGTACTGGCTCTTTCGGGAATGCTGTATTAAATAGATTTCT
TGATACAGATATTGCAGAAATCCGTATATTTAGTCGTGATGAAAAAAAACAAGATGATATGCGGAAAAAATACAATA
ATCAAAAATTAAAGTTCTATATTGGTGATGTCAGAGATTACCGTAGTATTTTGAATGCGACTCGCGGTGTTGATTTT
ATATATCATGCAGCGGCACTTAAGCAAGTTCCATCATGTGAATTTCATCCTATGGAAGCCGTTAAAACTAATATCCT
TGGTACGGAAAATGTTCTTGAAGCAGCTATAGCGAATGAAGTGAAGAGGGTTGTATGCCTAAGTACTGATAAAGCTG
TATACCCGATTAACGCAATGGGTATTTCAAAAGCTATGATGGAAAAGGTCATGGTCGCGAAATCCCGTAATGTTGAT
CGCAATAAAACAGTAATATGTGGTACCCGTTATGGGAATGTTATGGCATCTCGCGGTTCAGTTATTCCATTATTTGT
TGATCTTATTAGAGCGGGCAAGCCACTCACAATAACTGATCCTAATATGACCCGCTTTATGATGACTCTTGAGGATG
CGGTAGATTTAGTTCTTTATGCGTTTGAACATGGTAATAATGGTGATATCTTTGTGCAAAAAGCACCTGCAGCAACT
ATTGACACATTAGCTATTGCTTTAAAGGAATTACTAAATGTTCCTGACCATCCGGTAAATGTCATTGGAACGCGTCA
TGGCGAGAAATTATATGAAGCTCTACTTAGTCGTGAGGAAATGATCGCTGCTATAGATATGGGCGATTATTACCGTG
TCCCGCCAGATCTTCGTGACCTTAATTATGGCAAATATGTTGAGCAAGGTGATAGCCGAATATCTGAAATAGAAGAT
TATAACTCTCATAATACTCAACGGTTAGATGTTGAAGGCATGAAAGAGCTCTTGCTAAAATTAGCCTTTATTCGAGC
AATTCGTGCTGGTGAAAAATATAATCTGGATTCATGATATGAAAATATTAGTTACTGGTGCAAATGGTTTTATTGGT
CGTAATTTATGTTTGAGGCTTGAGGAACTTGGTTATAAAGATCTTATTAGAATTGATCGAGAATCAACGAAGCAAGA
TCTTGAACAAGGCTTACAGGATGCCGATTTTATTTATCACTTAGCTGGTATCAATAGACCTAAGACTGATGATGAGT
TTATTTCTGGAAACAGTGATTTAACAAAGCATATAGTTGAGTATCTCCTTTCTATTGGTAAGAATACACCAATTATG
CTAAGTTCTTCGATACAAGCTGAACTTAATAATGCTTATGGGGTTAGCAAAGCTGTAGCTGAAAGCTATGTCGAAAA
ATATGCTGCTGCTAGTGGTTCTTCGTATTATATTTTCAGATATCCAAACGTTTTTGGTAAATGGTGTAAGCCAAACT
ATAATTCTTTTATAGCAACTTTTTGCTACAATATTTCCAATGATATTGAGATTACTATCAATGATGCAGCAGCGCCA
GTCAATCTGGTCTATATTGATGATGTTTGTACTGATGCTATAGCTCTTCTCTCTGGGACGGTTGAAAGTGGATATAA
AGTTGTTGCACCAATTTATTCAACAACAGTTGGTGAAGTTGCAGAATTAATTTATAGCTTCAAAAATAGCCGTTCCA
CCCTGATCACAGAGGCTGTCGGGGCGGGATTTACCCGTGCATTGTATTCTACATGGCTGAGTTATTTACCAGCAGAG

AAGTTTGCGTACAAGGTACCTTTTTATGGGGATGCCCGCGGAGTCTTTTGTGAGATGTTGAAAACGCCTTCAGCGGG
GCAGTTTTCATTTTTTACTGCTCACCCTGGTATTACGCGTGGCGGACATTACCATCACAGTAAAAATGAGAAGTTTT
TGGTCATTCGAGGTCAGGCATGCTTTAAATTTGAACATGTGATTACCGGTGAGCGATATGAACTGAAAGTTTCATCG
GGTGAGTTTAAGATTGTTGAAACAGTTCCTGGTTGGACACATGACATTACAAATATTGGAACTGATGAATTAATAGT
CATGCTCTGGGCAAATGAAATTTTCAACCGTGATGAGCCCGATACTATTGCGAGACCTCTATAATGAAAAAATTAAA
AGTTATGTCTGTTGTTGGAACCCGTCCTGAGATTATCCGTTTGTCGAGGGTTCTTGCTAAGTTTGATGAATACTGCG
AGCATATTATTGTCCATACTGGTCAAAATTATGATTACGAATTAAATGAAGTGTTCTTCAATGACTTGGGTGTTCGA
AAACCTGATTATTTTTTAAATGCAGCGGGTAAAAATGCGGCGGAAACCATTGGTCAGGTTATTATTAAGGTAGATGA
AGTATTAGAAATCGAAAAACCTGAAGCAATACTGGTATTGGGCGATACGAATTCATGTATTTCTGCCATTCCGGCCA
AACGCCGTAAAGTGCCTATATTTCATATGGAAGCAGGTAACCGTTGTTTCGATCAACGCGTGCCTGAAGAAACCAAC
AGACGTATTGTTGACCATACGGCTGATATCAATATGACCTACAGTGATATTGCTCGTGAATATCTCTTGGCTGAAGG
TATCCCAGCTGATCGGATCATAAAAACTGGTAGCCCTATGTTTGAGGTTCTTTCATATTATATGCCCCAAATTGATG
GTTCAGATGTGCTATCGCGTTTGAATCTACAGTCTGGTGAGTTTTTTGTAGTAAGTGCGCATCGTGAAGAGAATGTT
GATTCTCCAAAACAGCTCGTAAAGCTTGCGAACATTCTAAATACTGTTGCTGAAAAATATAATCTTCCAGTTATTGT
CTCCACACACCCAAGGACACGTAACCGAATCCGTGAGCAAGGAATTGAATTTCATTCAAATATAAATCTACTGAAAC
CATTGGGTTTCCATGATTATAACCACTTGCAGAAGAACTCACGAGCTGTGCTTTCAGATAGCGGTACTATCACTGAA
GAGTCATCCATCATGAATTTCCCAGCGGTAAACATCCGGGAAGCGCATGAGCGTCCGGAAGGCTTTGAGGAAGCATC
CGTCATGATGGTGGGGTTAGAGTGTGAACGCGTATTACAAGCGCTGGATATTCTGGCAACACAACCGCGAGGTGAAG
TCCGTCTTTTACGTCAGGTTAGTGATTACAGCATGCCAAATGTGTCGGATAAAGTTGTCAGAATTGTTCACTCTTAC
ACAGATTATGTTAAGAGAGTCGTCTGGAAAGAATATTGATGAAACTTGCTTTAATCATAGATGATTACCTGCCCAAC
AGTACTCGTGTTGGTGCAAAAATGTTTCATGAACTTGCTCAAGAATTTATCCAGCGTGGGCACGATGTTACGGTAAT
TACTCCTGGTACGGGCATGCAAGAAGAGATTTCTTTTGATACCTTTCAGGGGGTAAAAACATGGCGTTTTAAAAGCG
GGCCGCTCAAGGATGTAAGTAAAATTCAGCGAGCGGTCAATGAAACGCTTTTGTCCTATCGGGCGTGGAAAGCCATC
AAAAAATGGGTAAAAAAAGAGACCTTTGAGGGGGTGATTTATTATTCACCTTCCATATTCTGGGGGCCTTTAGTTAA
AAAAATTAAAGCTCGTTGCCAATGTCCTGCTTATCTTATTTTAAGAGATATGTTTCCACAATGGGTAATTGATGCAG
GAATGCTTAATGCTGGTTCCCCAATAGAACGCTACTTTCGTCTTTTTGAAAAAATATCTTATCGTCAGGCAAATCGT
ATTGGACTTATGTCTGATAAGAATCTTGATGTTTTTCGGAAAGATAATAAAGGCTATCCGTGCGAAGTTTTGCGTAA
TTGGGCATCCCTAACACCAACGATCATACCCAAGGATTATATACCACTACGTAAGCGACTTGGCCTAGAGGATAAAA
CCATTTTCTTCTATGGTGGAAACATAGGTCATGCACAGGACATGACAAACTTGATGCGACTTGTGAGAAACATGGCA
GCATATCCTCAAGCTCATTTCCTATTTATTGGCCAGGGGGATGAAGTTGAATTAATTAATTCATTAGCATCTGAGTG
GGCATTGACGAATTTCACCTATTTGCCCTCGGTTAACCAAGATGAATTTAAGTTCATTTTGTCGGAAATGGATATCG
GCTTGTTTTCTCTTTCCGCTAGACACTCTTCCCATAATTTTCCTGGTAAGTTATTAGGCTATATGGTTCAGTCGCTA
CCTATTTTAGGTAGCGTAAATGCCGGAAATGATTTGCTCGACATTGTCAATCAAAATAATGCGGGATTAATCCATGT
CAATGGTGAGGACGATAAATTATGTCAATCTGCGCTATTAATGTTGCATGATATTGATGTGCGCCGGCAACTTGGTT
CGGGGGCGAATATATTGTTGAAAGAACAATTCTCCGTTGAGTCTGCGGCACAGACGATAGAAATGAGGTTGGAGGCA
TGCAATGCGATTAATTGATAATGACCAACTCGACGAATTATATGATCAAGCCGGGCAATCGGAACGTTTACGTTCCC
ACCTTATGATGCACGGCTCGCATCAAGAAAAGGTACAGCGTTTACTTATTGCATTAGTAAAGGGCAGCTATGTTGAA
CCGCATTATCACGAACTTCCTCATCAGTGGGAAATGTTCATTGTTATGGAGGGGCAACTTCAGGTTTGTTTGTATGG
TAGAAATGGTGAGGTTATAAAGCAATTTATAGCAGGAGATAATACTGGAATGAGCATTGTGGAGTTTTCTCCGGGCG

ATATACACAGTGTCGAATGCCTATCTCCGCGTGCTCTTATGGTGGAAGTTAAGGAGGGGCCATTTGACCCTTCTTTT
GCAAAATCGTTCGTGTGAGCGGCCGCGAGCTCGTCGACTCGAGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCT
ATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAG
CATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTCCAGGCCGCGAGCATTCAGCG
CGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGATGGGACGCA
ACCTTGCGCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGAAGTG
ATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAAACTGGTTCCTTACTATACGGTGAAAGAGTTTGTCGAATCTCTGGAAACGCCTCG
TCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAG
GAGACATCATCATTGATGGTGGTAACACCTTCTTCCAGGACACTATTCGTCGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGC
TTTAACTTCATCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCA
GAAAGAAGCCTATGAATTGGTAGCACCGATCCTGACCAAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTA
CCTATATTGGTGCCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTG
ATTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTG
GAATAACGGTGAACTGAGCAGTTACCTGATCGACATCACCAAAGATATCTTCACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACT
ACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACCGGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATCTC
GGCGAACCGCTGTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTTTGCACGTTATATCTCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTTGCCGC
ATCTAAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTCGTGCGC
TGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGCTGCGTCTGAAGAGTACAACTGGGAT
CTGAACTACGGCGAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCTGCAGAAAATCACCGA
TGCTTATGCCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAATTGCCGATGACTACCAGC
AGGCGCTGCGTGATGTCGTTGCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCCGGTTCCGACCTTCTCCGCAGCGGTTGCCTAT
TACGACAGCTACCGTGCTGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTGACTATTTTGGTGCGCATACTTA
TAAGCGTATTGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

[0896] SEQ ID NO:16(O16rfb基因座核苷酸序列实例-O16-EPA生产菌株stLMTB11739)

[0897] ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCG
ATACCCAAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGAT
CAAAGAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAAT
CACTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG
AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCATT
TGTCGTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATGATTG
CACGTTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCCGTCATC
CAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGATCAGCCGCA
GACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTCGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAACTGGAACGTACTC
AGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCCGTTGATGCAATG
CTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAGTATGGCCTACGCAA
CCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAATCTGACCGGATGTAAC
GGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAATCTTCCTGCCGTTGTTTT
ATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCAGGATTTTCCTTGTTTCCAGA
GCGGATTGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTAACGCTCGTCACATCATAGGCAT

GCATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATACCTCTATTAATCAAACTGAGAGCCG
CTTATTTCACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGTGAAAATACTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTAT
TGGTTCAGCTGTAGTTCGTCACATTATAAATAATACGCAGGATAGTGTTGTTAATGTCGATAAATTAACGTACGCCG
GAAACCGGGAATCACTTGCTGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATGTTTTTGAACATGCGGATATTTGCGATGCACCT
GCAATGGCACGGATTTTTGCTCAGCATCAGCCGGATGCAGTGATGCACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTC
AATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTTGGTACTTATGTCCTTTTGGAAGCCGCTCGCAATTACT
GGTCTGCTCTTGATAGCGACAAGAAAAATAGCTTCCGTTTTCATCATATTTCTACTGACGAAGTCTATGGTGATTTG
CCTCATCCAGATGAAGTAAATAATACAGAAGAATTACCCTTATTTACTGAGACGACAGCTTACGCGCCAAGCAGCCC
TTATTCCGCATCCAAAGCATCCAGCGATCATTTAGTCCGCGCGTGGAAACGTACATATGGTTTACCGACAATTGTGA
CTAATTGCTCGAACAACTATGGTCCTTATCATTTCCCGGAAAAGCTTATTCCACTGGTTATTCTTAATGCACTGGAA
GGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAAAGGAGATCAGATCCGCGACTGGTTGTATGTTGAAGATCATGCGCGTGCGTT
ATATACCGTCGTAACCGAAGGTAAAGCGGGTGAAACTTATAACATTGGTGGGCACAACGAAAAGAAAAACATCGATG
TAGTGCTCACTATTTGTGATTTGCTGGATGAGATTGTACCGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAAATCACTTATGTT
GCTGATCGTCCGGGACACGATCGCCGCTATGCTATTGATGCTGAGAAGATTGGTCGCGCATTGGGATGGAAACCACA
GGAAACGTTTGAGAGCGGGATTCGTAAAACGGTGGAATGGTACCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAATGTGAAAA
GTGGTGCCTATCAATCGTGGATTGAACAGAACTATGAGGGCCGCCAGTAATGAATATCCTCCTTTTTGGCAAAACAG
GGCAGGTAGGTTGGGAACTACAGCGTGCTCTGGCACCTTTGGGTAATTTGATTGCTTTTGATGTTCACTCTACTGAT
TATTGCGGTGATTTTAGTAATCCTGAAGGTGTAGCTGAAACCGTAAGAAGCATTCGGCCGGATATTATTGTCAATGC
AGCCGCTCACACCGCAGTAGACAAAGCAGAATCAGAACCGGAGTTTGCACAATTAATTAACGCAACAAGTGTCGAAG
CGATTGCGAAAGCAGCAAATGAAGTTGGAGCCTGGGTTATCCATTACTCGACTGATTACGTCTTCCCTGGAAATGGC
GATATGCCATGGCTGGAGACGGATGCAACCGCACCACTAAATGTTTACGGTGAAACCAAGTTAGCCGGAGAAAAAGC
GTTACAGGAATATTGCGCGAAGCATCTTATTTTCCGGACCAGCTGGGTCTATGCAGGAAAAGGAAATAACTTCGCCA
AAACGATGTTACGTCTGGCAAAAGAGCGTGAAGAATTAGCGGTTATTAACGATCAGTTTGGTGCGCCAACAGGTGCT
GAACTGCTGGCTGATTGTACAGCACATGCCATTCGTGTCGCACTGAATAAACCGGATGTCGCAGGCTTGTACCATTT
GGTAGCCAGTGGTACCACAACCTGGTACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGCATTCCCC
TTGCACTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAACAACAGCCTATCCTACACCAGCTCGTCGTCCACATAACTCTCGCCTT
AATACAGAAAAATTTCAGCAGAACTTTGCGCTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTTGGCGTGAAACGAATGCTCAATGA
ATTATTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTGATGGTGGAGCAAGATGAATTAAAAGGAATG
ATGAAATGAAAATGCGTAAAGGTATTATTTTAGCGGGTGGTTCTGGTACACGTCTTTATCCTGTGACTATGGCTGTC
AGTAAACAGCTATTACCTATTTATGATAAACCGATGATCTATTACCCGCTCTCTACACTGATGTTGGCGGGTATTCG
CGATATTTTGATTATCAGTACACCTCAGGATACTCCTCGTTTTCAACAATTGCTGGGTGACGGTAGCCAGTGGGGCC
TGAATCTTCAGTACAAAGTGCAACCTAGCCCAGATGGCCTCGCGCAGGCATTTATCATCGGTGAAGAGTTTATTGGT
GGTGATGATTGTGCTTTGGTTCTTGGTGATAATATCTTTTACGGTCACGATCTGCCGAAGCTAATGGAGGCCGCTGT
TAACAAAGAAAGTGGTGCAACGGTATTTGCCTATCACGTTAATGATCCAGAACGCTATGGTGTCGTTGAGTTTGATA
AAAACGGTACGGCAATCAGTCTGGAAGAAAAACCGTTAGAACCAAAGAGTAATTACGCCGTTACAGGTCTGTACTTT
TATGATAACGACGTGGTTCAGATGGCGAAAAACTTGAAGCCGTCTGCACGTGGTGAGTTAGAAATTACAGATATTAA
CCGTATTTATCTTGAGCAGGGACGTCTGTCTGTCGCGATGATGGGGCGTGGCTACGCGTGGCTGGACACGGGGACTC
ATCAGAGTCTGATAGAAGCAAGTAATTTTATTGCGACAATTGAAGAGCGCCAGGGATTGAAGGTTTCCTGTCCTGAA
GAGATTGCATTTCGTAAAGGTTTTATTGATGTTGAGCAAGTAAGAAAATTAGCTGTACCACTAATAAAGAATAATTA

TGGGCAGTATCTTTATAAAATGACGAAGGATTCAAATTAATGAATGTGATTAGAACTGAAATTGAAGATGTGCTAAT
TCTGGAGCCAAGAGTATTTGGTGATGATAGAGGTTTCTTTTATGAGAGCTTTAATCAATCAGCATTTGAACATATTC
TAGGCTATCCGGTCAGCTTTGTTCAAGACAATCACTCACGTTCATCAAAAAATGTACTCAGAGGCCTTCACTTTCAA
CGCGGCGAGTACGCACAAGATAAACTTGTACGCTGCACTCATGGAGCAGTTTTTGATGTTGCTGTTGATATTCGACC
CAATTCGGTATCCTTTGGTAAATGGGTTGGTGTTCTGCTTTCAGCTGATAATAAGCAGCAGTTGTGGATACCAAAAG
GGTTTGCTCATGGCTTTTTGGTTCTGTCTGATATCGCTGAATTTCAATATAAAACTACAAACTATTATCATCCTGAA
AGCGATTGTGGAATATGTTGGAATGATGAACGCATTGCAATTGATTGGCCCCAAACATCAGGGTTAATCCTTTCGCC
AAAAGATGAAAGGCTCTTTACGTTAGATGAGCTTATCAGATTAAAATTAATTGCATGAATACGAATAAATTATCTTT
AAGAAGAAACGTTATATATCTGGCTGTCGTTCAAGGTAGCAATTATCTTTTACCATTGCTTACATTTCCATATCTTG
TAAGAACACTTGGTCCTGAAAATTTCGGTATATTCGGTTTTTGCCAAGCGACTATGCTATATATGATAATGTTTGTT
GAATATGGTTTCAATCTCACAGCAACTCAGAGTATTGCCAAAGCAGCAGATAGTAAAGATAAAGTAACGTCTATTTT
TTGGGCGGTGATATTTTCAAAAATAGTTCTTATCGTCATTACATTGATTTTCTTAACGTCGATGACCTTGCTTGTTC
CTGAATATAACAAGCATGCCGTAATTATATGGTCGTTTGTTCCTGCATTAGTCGGGAATTTAATCTACCCTATCTGG
CTGTTTCAGGGAAAAGAAAAAATGAAATGGCTGACTTTAAGTAGTATTTTATCCCGCTTGGCTATTATCCCTCTAAC
ATTTATTTTTGTGAACACAAAGTCAGATATAGCAATTGCCGGTTTTATTCAGTCAAGTGCAAATCTGGTTGCTGGAA
TTATTGCACTAGCTATCGTTGTTCATGAAGGTTGGATTGGTAAAGTTACGCTATCATTACATAATGTGCGTCGATCT
TTAGCAGACGGTTTTCATGTTTTTATTTCCACATCTGCTATTAGTTTATATTCTACGGGAATAGTTATTATCCTGGG
ATTTATATCTGGACCAACGTCCGTAGGGAATTTTAATGCGGCCAATACTATAAGAAACGCGCTTCAAGGGCTATTAA
ATCCTATCACCCAAGCAATATACCCAAGAATATCAAGTACGCTTGTTCTTAATCGTGTGAAGGGTGTGATTTTAATT
AAAAAATCATTGACCTGCTTGAGTTTGATTGGTGGTGCTTTTTCATTAATTCTGCTCTTGGGTGCATCTATACTAGT
AAAAATAAGTATAGGGCCGGGATATGATAATGCAGTGATTGTGCTAATGATTATATCGCCTCTGCCTTTTCTTATTT
CATTAAGTAATGTCTATGGCATTCAAGTTATGCTGACCCATAATTATAAGAAAGAATTCAGTAAGATTTTAATCGCT
GCGGGTTTGTTGAGTTTGTTGTTGATTTTTCCGCTAACAACTCTTTTTAAAGAGATTGGTGCAGCAATAACATTGCT
TGCAACAGAGTGCTTAGTTACGTCACTCATGCTGATGTTCGTAAGAAATAATAAATTACTGGTTTGCTGAGGATTTT
ATGTACGATTATATCATTGTTGGTTCTGGTTTGTTTGGTGCCGTTTGTGCGAATGAGTTAAAAAAGCTAAACAAAAA
AGTTTTAGTGATTGAGAAAAGAAATCATATCGGTGGAAATGCGTACACAGAGGACTGTGAGGGTATCCAGATTCATA
AATATGGTGCACATATTTTTCATACCAATGATAAATATATATGGGATTACGTTAATGATTTAGTAGAATTTAATCGT
TTTACTAATTCTCCACTGGCGATTTATAAAGACAAATTATTCAACCTTCCTTTTAATATGAATACTTTCCACCAAAT
GTGGGGAGTTAAAGATCCTCAAGAAGCTCAAAATATCATTAATGCTCAGAAAAAAAAGTATGGTGACAAGGTACCTG
AAAATTTGGAGGAGCAGGCGATTTCATTAGTTGGGGAGGACTTATACCAAGCATTGATAAAGGGTTATACGGAGAAG
CAGTGGGGAAGAAGTGCAAAAGAATTGCCTGCATTTATTATTAAGCGAATCCCAGTGAGATTTACGTTTGATAACAA
TTATTTTTCCGATCGCTATCAAGGTATTCCGGTGGGAGGCTACACTAAGCTTATTGAAAAAATGCTTGAAGGTGTGG
ACGTAAAATTAGGCATTGATTTTTTGAAAGACAAAGATTCTCTAGCGAGTAAAGCCCATAGAATCATCTACACTGGA
CCCATTGATCAGTACTTCGACTATAGGTTTGGAGCGTTAGAATATCGCTCTTTAAAATTTGAGACGGAACGCCATGA
ATTTCCAAACTTCCAAGGGAATGCAGTAATAAATTTCACTGATGCTAATGTACCATATACCAGAATAATTGAGCATA
AACATTTTGACTATGTTGAGACAAAGCATACGGTTGTTACAAAAGAATATCCATTAGAGTGGAAAGTTGGCGACGAA
CCCTACTATCCAGTTAATGATAATAAAAACATGGAGCTTTTTAAGAAATATAGAGAGTTAGCTAGCAGAGAAGACAA
GGTTATATTTGGCGGGCGTTTGGCCGAGTATAAATATTATGATATGCATCAAGTGATATCTGCCGCTCTTTATCAAG
TGAAAAATATAATGAGTACGGATTAATGATCTATCTTGTAATTAGTGTCTTTCTCATTACAGCATTTATCTGTTTAT

ATCTTAAGAAGGATATATTTTATCCAGCCGTATGCGTTAATATCATCTTCGCACTGGTCTTATTGGGATATGAAATA
ACGTCAGATATATATGCTTTTCAGTTAAATGACGCTACGTTGATTTTTCTACTTTGCAATGTTTTGACATTTACCCT
GTCATGTTTATTGACGGAAAGTGTATTAGATCTAAATATCAGAAAAGTCAATAATGCTATTTATAGCATACCATCGA
AGAAAGTGCATAATGTAGGCTTGTTAGTTATTTCTTTTTCGATGATATATATATGCATGAGGTTAAGTAACTACCAG
TTCGGGACTAGCTTACTTAGCTATATGAATTTGATAAGAGATGCTGATGTTGAAGACACATCAAGAAATTTCTCAGC
ATACATGCAGCCAATCATTCTAACTACTTTTGCTTTATTTATTTGGTCTAAAAAATTTACTAATACAAAGGTAAGTA
AAACATTTACTTTACTTGTTTTTATTGTATTCATCTTTGCAATTATACTGAATACTGGTAAGCAAATTGTCTTTATG
GTTATCATCTCTTATGCATTCATCGTAGGTGTTAATAGAGTAAAACATTATGTTTATCTTATTACAGCTGTAGGTGT
TCTATTCTCCTTGTATATGCTCTTTTTACGTGGACTGCCTGGGGGGATGGCATATTATCTATCCATGTATTTGGTCA
GCCCTATAATCGCGTTTCAGGAGTTTTATTTTCAGCAAGTATCTAACTCTGCCAGTTCTCATGTCTTTTGGTTTTTT
GAAAGGCTGATGGGGCTATTAACAGGTGGAGTCTCTATGTCGTTGCATAAAGAATTTGTGTGGGTGGGTTTGCCAAC
AAATGTTTATACTGCTTTTTCGGATTATGTTTATATTTCCGCGGAGCTAAGCTATTTGATGATGGTTATTCATGGCT
GTATTTCAGGTGTTTTATGGAGATTGTCTCGAAATTACATATCTGTGAAAATATTTTATTCATATTTTATTTATACC
TTTTCTTTCATTTTTTATCATGAAAGCTTCATGACTAATATTAGCAGTTGGATACAAATAACTCTTTGTATCATAGT
ATTCTCTCAATTTCTTAAGGCCCAGAAAATAAAGTGAAAATGTATTTTTTGAATGATTTAAATTTCTCTAGACGCGA
TGCTGGATTTAAAGCAAGAAAAGATGCACTGGACATTGCTTCAGATTATGAAAACATTTCTGTTGTTAACATTCCTC
TATGGGGTGGAGTAGTCCAGAGAATTATTAGTTCTGTTAAGCTTAGTACATTTCTCTGCGGTCTTGAAAATAAAGAT
GTTTTAATTTTCAATTTCCCGATGGCCAAACCATTTTGGCATATATTGTCATTCTTTCACCGCCTTCTAAAATTTAG
AATAGTACCTCTGATTCATGATATTGATGAATTAAGAGGAGGAGGGGGTAGTGATTCTGTGCGGCTTGCTACCTGTG
ATATGGTCATAAGTCACAATCCACAAATGACAAAGTACCTTAGTAAATATATGTCTCAGGATAAAATCAAAGACATA
AAAATATTTGATTACCTCGTCTCATCTGATGTGGAGCATCGAGATGTTACGGATAAGCAACGAGGGGTCATATATGC
TGGCAACCTTTCTAGGCATAAATGTTCTTTCATATATACTGAAGGATGCGATTTTACTCTCTTTGGTGTCAACTATG
AAAATAAAGATAATCCTAAATATCTTGGAAGTTTTGATGCTCAATCTCCGGAAAAGATTAACCTCCCAGGCATGCAA
TTTGGACTCATTTGGGATGGAGATTCTGTCGAAACCTGTAGTGGTGCCTTTGGCGACTATTTAAAGTTTAATAACCC
TCATAAGACATCTCTTTATCTTTCAATGGAACTTCCAGTATTTATATGGGATAAAGCCGCCCTTGCGGATTTCATTG
TAGATAATAGAATAGGATATGCAGTGGGATCAATCAAAGAAATGCAAGAGATTGTTGACTCCATGACAATAGAAACT
TATAAGCAAATTAGTGAGAATACAAAAATTATTTCTCAGAAAATTCGAACAGGAAGTTACTTCAGGGATGTTCTTGA
AGAGGTGATCGATGATCTTAAAACTCGCTAAACGATATGGTCTCTGTGGTTTTATTCGGCTTGTTAGAGATGTCTTA
TTGACTCGTGTATTTTACCGGAACTGTAGAATTATTCGATTTCCCTGCTATATTCGCAATGATGGTAGCATTAATTT
TGGTGAAAATTTCACAAGTGGAGTCGGTCTCAGGCTGGATGCATTTGGACGTGGCGTGATTTTTTTTTCCGATAATG
TGCAAGTTAACGACTATGTTCATATCGCCTCAATTGAGAGCGTTACGATAGGTCGGGATACGCTTATTGCAAGTAAA
GTATTTATTACCGATCATAATCACGGTTCCTTTAAGCACTCTGATCCAATGAGTTCGCCAAATATACCTCCAGACAT
GCGCACGTTGGAATCTTCAGCTGTTGTAATTGGCCAGAGGGTTTGGTTGGGTGAGAATGTGACGGTTTTGCCTGGAA
CAATTATTGGTAATGGAGTCGTAGTCGGCGCCAATTCTGTTGTTAGAGGTTCTATTCCCGAAAATACTGTCATTGCG
GGAGTACCAGCAAAAATCATAAAGAAATACAATCATGAGACCAAATTATGGGAAAAAGCATAGTCGTTGTTTCTGCG
GTCAATTTTACCACTGGCGGTCCATTTACCATTTTGAAAAAATTTTTGGCAGCAACTAATAATAAAGAAAATGTCAG
TTTTATCGCATTAGTCCATTCTGCTAAAGAGTTAAAAGAAAGTTATCCATGGGTTAAATTCATTGAGTTTCCTGAGG
TTAAAGGGTCGTGGCTAAAACGTTTGCACTTTGAATATGTAGTTTGTAAAAAACTTTCAAAAGAGCTGAATGCTACG
CATTGGATTTGTCTGCATGATATTACGGCCAATGTCGTCACTAAAAAAAGATATGTGTATTGTCATAACCCTGCCCC

TTTTTATAAAGGAATTTTATTCCGTGAAATTCTTATGGAGCCTAGCTTTTTCTTATTTAAAATGCTATACGGGCTGA
TATATAAAATAAACATTAAAAAAAATACTGCAGTGTTTGTTCAACAATTCTGGATGAAAGAAAAATTTATCAAGAAA
TATTCTATAAATAACATCATTGTCAGTCGGCCAGAAATTAAATTATCTGATAAAAGCCAACTTACTGATGATGATTC
TCAATTTAAGAATAACCCTTCTGAGTTGACAATATTTTACCCTGCTGTTCCACGAGTATTTAAAAATTACGAGCTTA
TTATTAGTGCAGCAAGGAAATTGAAAGAACAATCCAATATTAAATTTCTGCTTACTATCAGTGGTACAGAAAATGCG
TATGCAAAATATATTATCAGTCTTGCAGAAGGACTGGATAATGTTCATTTCCTCGGGTACTTGGATAAAGAAAAAAT
CGATCATTGTTATAATATTTCAGATATAGTTTGTTTTCCCTCTAGGTTAGAAACATGGGGATTGCCGTTGTCTGAGG
CTAAAGAGCGAGGTAAGTGGGTATTAGCATCAGATTTCCCATTTACTAGAGAAACTCTTGGTAGTTATGAAAAGAAA
GCTTTTTTTGATTCTAATAACGATGACATGTTAGTTAAACTTATTATTGACTTCAAAAAAGGTAACCTCAAAAAAGA
TATCTCTGATGCAAATTTCATTTATCGTAATGAAAATGTATTAGTTGGGTTTGATGAACTAGTTAATTTTATTACTG
AAGAACATTGAAATGGTATATATAATAATCGTTTCCCACGGACATGAAGACTACATCAAAAAATTACTCGAAAATCT
TAATGCTGACGATGAGCACTACAAGATTATCGTACGCGACAACAAAGACTCTCTATTATTGAAACAAATATGCCAGC
ATTATGCAGGCCTGGACTATATTAGTGGAGGTGTATACGGCTTTGGTCATAATAATAATATTGCGGTGGCGTATGTA
AAGGAAAAATATAGACCCGCAGATGATGATTACATTTTGTTTTTGAATCCCGATATCATCATGAAGCATGATGATTT
GCTGACATATATTAAATATGTCGAAAGTAAGCGTTATGCTTTTAGTACATTATGCCTGTTCCGAGATGAAGCGAAAT
CTTTACATGATTATTCCGTAAGAAAATTTCCTGTGCTTTCTGATTTTATTGTGTCATTTATGTTAGGGATTAATAAA
ACAAAAATTCCTAAAGAAAGTATCTATTCTGATACGGTTGTTGATTGGTGCGCAGGATCATTTATGCTGGTACGTTT
TTCAGATTTTGTGCGTGTAAATGGCTTCGATCAAGGTTACTTTATGTACTGTGAAGATATTGACCTGTGCTTGAGGC
TTAGCCTGGCTGGTGTCAGACTTCATTATGTTCCCGCTTTTCATGCGATACATTATGCTCATCATGACAATCGAAGT
TTTTTTTCAAAAGCCTTCAGATGGCACTTAAAAAGTACTTTTAGATATTTAGCCAGAAAACGTATTTTATCAAATCG
CAACTTTGATCGAATTTCATCAGTTTTTCACCCGTAAGAGCTCGGTACCCGGGCCTAGGGTGTAGGCTGGAGCTGCT
TCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATCCGTCGACGGCG
GCCGCCCTGCAGGCATGCAAGCTTGATCCATATGGATCGCTAGCTTAATTAAATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATG
GATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTCCAGGCCGCGAGCATTCAGCGCGGT
GATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCT
TGCGCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGAAGTGATTG
CCGAAAATCCAGGCAAGAAACTGGTTCCTTACTATACGGTGAAAGAGTTTGTCGAATCTCTGGAAACGCCTCGTCGC
ATCCTGTTAATGGTGAAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGA
CATCATCATTGATGGTGGTAACACCTTCTTCCAGGACACTATTCGTCGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTTA
ACTTCATCGGTACGGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAA
GAAGCCTATGAATTGGTAGCACCGATCCTGACCAAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTA
TATTGGTGCCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTG
CTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGAAT
AACGGTGAACTGAGCAGTTACCTGATCGACATCACCAAAGATATCTTCACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCT
GGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACGGGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCG
AACCGCTGTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTTTGCACGTTATATCTCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTTGCCGCATCT
AAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTCGTGCGCTGTA
TCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGCTGCGTCTGAAGAGTACAACTGGGATCTGA
ACTACGGCGAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCTGCAAAAAATCACCGATGCT

TATGCCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAATTGCCGATGACTACCAGCAGGC
GCTGCGTGATGTCGTTGCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCCGGTTCCGACCTTCTCCGCAGCGGTTGCCTATTACG
ACAGCTACCGTGCTGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTGACTATTTTGGTGCGCATACTTATAAG
CGTATTGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

[0898] SEQ ID NO:17(O18Arfb基因座核苷酸序列实例-O18A-EPA生产菌株BVEC-L-00559)

[0899] ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCG
ATACCCAAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGAT
CAAAGAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAAT
CACTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG
AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCATT
TGTCGTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATGATTG
CACGTTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCCGTCATC
CAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGATCAGCCGCA
GACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTCGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAACTGGAACGTACTC
AGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCCGTTGATGCAATG
CTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAGTATGGCCTACGCAA
CCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAATCTGACCGGATGTAAC
GGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAATCTTCCTGCCGTTGTTTT
ATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCAGGATTTTCCTTGTTTCCAGA
GCGGATTGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTAACGCTCGTCACATCATAGGCAT
GCATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATACCTCTATTAATCAAACTGAGAGCCG
CTTATTTCACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGTGAAAATACTTGTTACTGGTGGCGCAGGATTTAT
TGGTTCAGCTGTAGTTCGTCACATTATAAATAATACGCAGGATAGTGTTGTTAATGTCGATAAATTAACGTACGCCG
GAAACCGGGAATCACTTGCTGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATGTTTTTGAACATGCGGATATTTGCGATGCACCT
GCAATGGCACGGATTTTTGCTCAGCATCAGCCGGATGCAGTGATGCACCTGGCTGCTGAAAGCCATGTTGACCGTTC
AATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTTGGTACTTATGTCCTTTTGGAAGCCGCTCGCAATTACT
GGTCTGCTCTTGATAGCGACAAGAAAAATAGCTTCCGTTTTCATCATATTTCTACTGACGAAGTCTATGGTGATTTG
CCTCATCCAGATGAAGTAAATAATACAGAAGAATTACCCTTATTTACTGAGACGACAGCTTACGCGCCAAGCAGCCC
TTATTCCGCATCCAAAGCATCCAGCGATCATTTAGTCCGCGCGTGGAAACGTACATATGGTTTACCGACAATTGTGA
CTAATTGCTCGAACAACTATGGTCCTTATCATTTCCCGGAAAAGCTTATTCCACTGGTTATTCTTAATGCACTGGAA
GGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAAAGGAGATCAGATCCGCGACTGGTTGTATGTTGAAGATCATGCGCGTGCGTT
ATATACCGTCGTAACCGAAGGTAAAGCGGGTGAAACTTATAACATTGGTGGGCACAACGAAAAGAAAAACATCGATG
TAGTGCTCACTATTTGTGATTTGCTGGATGAGATTGTACCGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAAATCACTTATGTT
GCTGATCGTCCGGGACACGATCGCCGCTATGCTATTGATGCTGAGAAGATTGGTCGCGCATTGGGATGGAAACCACA
GGAAACGTTTGAGAGCGGGATTCGTAAAACGGTGGAATGGTACCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAATGTGAAAA
GTGGTGCCTATCAATCGTGGATTGAACAGAACTATGAGGGCCGCCAGTAATGAATATCCTCCTTTTTGGCAAAACAG
GGCAGGTAGGTTGGGAACTACAGCGTGCTCTGGCACCTTTGGGTAATTTGATTGCTTTTGATGTTCACTCTACTGAT
TATTGCGGTGATTTTAGTAATCCTGAAGGTGTAGCTGAAACCGTAAGAAGCATTCGGCCGGATATTATTGTCAATGC

AGCCGCTCACACCGCAGTAGACAAAGCAGAATCAGAACCGGAGTTTGCACAATTAATTAACGCAACAAGTGTCGAAG
CGATTGCGAAAGCAGCAAATGAAGTTGGAGCCTGGGTTATCCATTACTCGACTGATTACGTCTTCCCTGGAAATGGC
GATATGCCATGGCTGGAGACGGATGCAACCGCACCACTAAATGTTTACGGTGAAACCAAGTTAGCCGGAGAAAAAGC
GTTACAGGAATATTGCGCGAAGCATCTTATTTTCCGGACCAGCTGGGTCTATGCAGGAAAAGGAAATAACTTCGCCA
AAACGATGTTACGTCTGGCAAAAGAGCGTGAAGAATTAGCGGTTATTAACGATCAGTTTGGTGCGCCAACAGGTGCT
GAACTGCTGGCTGATTGTACAGCACATGCCATTCGTGTCGCACTGAATAAACCGGATGTCGCAGGCTTGTACCATTT
GGTAGCCAGTGGTACCACAACCTGGTACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGCATTCCCC
TTGCACTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAACAACAGCCTATCCTACACCAGCTCGTCGTCCACATAACTCTCGCCTT
AATACAGAAAAATTTCAGCAGAACTTTGCGCTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTTGGCGTGAAACGAATGCTCAATGA
ATTATTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTGATGGTGGAGCAAGATGAATTAAAAGGAATG
ATGAAATGAAAATGCGTAAAGGTATTATTTTAGCGGGTGGTTCTGGTACACGTCTTTATCCTGTGACTATGGCTGTC
AGTAAACAGCTATTACCTATTTATGATAAACCGATGATCTATTACCCGCTCTCTACACTGATGTTGGCGGGTATTCG
CGATATTTTGATTATCAGTACACCTCAGGATACTCCTCGTTTTCAACAATTGCTGGGTGACGGTAGCCAGTGGGGCC
TGAATCTTCAGTACAAAGTGCAACCTAGCCCAGATGGCCTCGCGCAGGCATTTATCATCGGTGAAGAGTTTATTGGT
GGTGATGATTGTGCTTTGGTTCTTGGTGATAATATCTTTTACGGTCACGATCTGCCGAAGCTAATGGAGGCCGCTGT
TAACAAAGAAAGTGGTGCAACGGTATTTGCCTATCACGTTAATGATCCAGAACGCTATGGTGTCGTTGAGTTTGATA
AAAACGGTACGGCAATCAGTCTGGAAGAAAAACCGTTAGAACCAAAGAGTAATTACGCCGTTACAGGTCTGTACTTT
TATGATAACGACGTGGTTCAGATGGCGAAAAACTTGAAGCCGTCTGCACGTGGTGAGTTAGAAATTACAGATATTAA
CCGTATTTATCTTGAGCAGGGACGTCTGTCTGTCGCGATGATGGGGCGTGGCTACGCGTGGCTGGACACGGGGACTC
ATCAGAGTCTGATAGAAGCAAGTAATTTTATTGCGACAATTGAAGAGCGCCAGGGATTGAAGGTTTCCTGTCCTGAA
GAGATTGCATTTCGTAAAGGTTTTATTGATGTTGAGCAAGTAAGAAAATTAGCTGTACCACTAATAAAGAATAATTA
TGGGCAGTATCTTTATAAAATGACGAAGGATTCAAATTAATGAATGTGATTAGAACTGAAATTGAAGATGTGCTAAT
TCTGGAGCCAAGAGTATTTGGTGATGATAGAGGTTTCTTTTATGAGAGCTTTAATCAATCAGCATTTGAACATATTC
TAGGCTATCCGGTCAGCTTTGTTCAAGACAATCACTCACGTTCATCAAAAAATGTACTCAGAGGCCTTCACTTTCAA
CGCGGCGAGTACGCACAAGATAAACTTGTACGCTGCACTCATGGAGCAGTTTTTGATGTTGCTGTTGATATTCGACC
CAATTCGGTATCCTTTGGTAAATGGGTTGGTGTTCTGCTTTCAGCTGATAATAAGCAGCAGTTGTGGATACCAAAAG
GGTTTGCTCATGGCTTTTTGGTTCTGTCTGATATCGCTGAATTTCAATATAAAACTACAAACTATTATCATCCTGAA
AGCGATTGTGGAATATGTTGGAATGATGAACGCATTGCAATTGATTGGCCCCAAACATCAGGGTTAATCCTTTCGCC
AAAAGATGAAAGGCTCTTTACGTTAGATGAGCTTATCAGATTAAAATTAATTGCATGAGGCCGGCCTTAAGGAGGAC
TAGTCCCGGCGCGCCATGAGTTTAATCAAAAACAGTTTTTGGAACCTTTGCGGGTATGTACTTCCAGCTATTGTGAC
ACTACCAGCTTTGGGTATTATGGGGCGAAAATTAGGCCCAGAATTATTTGGTGTATTCACTTTGGCATTAGCTGTTG
TGGGTTATGCAAGCATTTTTGATGCAGGCCTTACTCGCGCAGTGATACGAGAAGTCGCAATTGAAAAAGATAATGAA
GAAAATAAGTTGAAAATTATTTCTTCAGCGACAGTTGTAATTATTTATTTGAGTTTGGCCGCCTCACTCTTATTATT
TTTTTTTAGTGGTCATATCGCATTGCTACTGAACATTAGTGAGACTTTTTTTCATAATGTAAGTGTCTCGCTTAAAA
TTCTCGCAGCATCCATACCATTATTTTTGATTACTCAAATATGGTTGTCAATTTTAGAAGGTGAAGAAAGATTTGGT
TTACTTAATATCTACAAATCAATTACGGGAGTGATATTAGCAATCTCACCGGCATTATTTATACTTATTAAACCCTC
TTTGATGTATGCGATAATAGGCTTAGTTCTAGCAAGGTTTTTATGTTTTATTTTGGCTTTTATAATTTGTCACGATA
AAGTGCTTAAAGCTAAACTAACAATCGATATACCAACAATTAAAAGATTGTTTATGTTCGGTGGTTGGATTACAGTA
AGTAATATCATCAGCCCTGTGCTATCATATTTTGATAGGTTTATTGTTTCAAATCAACTTGGGGCTGCTAATGTTGC

TTTTTATACTGCACCATCAGAAATTATTTCTCGGCTTAGTATAATTCCAGGTGCGTTTTCAAGAGCCTTATTTCCAA
GATTAGCTAATGCAAATAATTCCGCTGAAAGATATAAAACGAAAAGATTAATTACAATTTCACTTTTAATAATCATC
ACCCCTATTTTTTGTATTGGCGTGTTATTTTCAGAGAAGATAATGGTTTTATGGATGGGGGCATCATTTTTTGGTGA
GCCTGGTTTGGTATTATCAATATTACTGATTGGCTTTATTTTTAATGGATTGGCACAAGTACCATTTGCCAGTATTC
AATCCCGAGGTCATGCTAAGATAACTGCATTTGTTCATCTCTTAGAGTTGTTTCCTTATTTATTACTTTTATTTTAC
CTCATAAAAGCACATGGGGTTGTTGGCGCGGGTATTGCGTGGTCAGTGAGGATGATAGTAGATTATATAGCATTAAG
TCTTTTGGACGGTAAGTATATTAATAAATAAAATTCAAAATGCAAGTTAATAACTCATGGCTTTATTTGGGTAGGTG
ACAATTTATAATGATATATATATTAACTTTAACTCTTCTTCTAGTTATAGCCATAATGTTTTCTCTTCTCGGCACAA
AAAGTAGGATCACATCTCCATTACCTTTGCATTTTTTACCATGGTTACTAACTTTAATTGTCGGGATAAGTAATTAC
GATCAATTTTACGAGTTTAATGAAAGAAGCTTTTACTCTTTGTTGATTTGGTTTACAGTTATTTTTATATTTTATTT
CATAGGGGAACTGGTTAATTATAAACGTGAAAATATAAATGTTTATTATGGTCTTTCACATATTAAATATGAATGTA
AAAAATATTGGATCATTGTCATCCCAATTTCATTATATACCATTTTCGAAATATATATGGTTGGTATGGGGGGAGCA
GATGGATTCTTTCTCAATTTACGTCTTGCAAATACATTGGAGGGCTATACGGGTAAAAAATTTATCTTAATGCCTGC
TGTATATCCTCTAATGATGGCTATGTTCGCAATTGTTTGTCTAACAAAAACTTCCAAATTAAATAAATACTCCATTT
ATTTCTGGATGTTTTTGTATTGTATTGGCACAATGGGAAAATTTTCAATATTAACGCCAATATTGACATATTTAATT
ATTTATGACTTCAAACATAGATTAAAAGTAAAAAAAACAATAAAGTTTACATTGTTGATAATTATATTAGCTTTAAC
TTTGCATTTTACACGTATGGCTGAGAATGACCACTCAACATTTTTATCTATTTTAGGGCTCTATATTTATTCACCAA
TAATTGCTTTAGGCCAGTTGAATGAAGTAAATAGTAGTCATTTTGGTGAGTATACGTTTAGATTCATATATGCTATA
ACTAATAAAATTGGCCTTATTAAAGAATTGCCAGTAAATACTATTCTTGACTATTCATACGTTCCTGTACCAACAAA
TGTATATACTGCACTTCAACCATTTTACCAGGATTTTGGTTATACTGGCATCATATTTGGAGCAGTATTATACGGAC
TAATATATGTGAGTTTATACACGGCCGGTGTTCGTGGAAATAATACACAGGCATTACTGATTTACGCATTGTTTTCA
GTTAGCAGTGCAACGGCTTTCTTCGCTGAAACGCTAGTAACGAATTTAGCTGGAAATGTGATGTTAGTATTATGTAC
CATCTTACTATGGCGATTTACAGTAATATGCAAACCAGTACAGTAACCATTCTAATGGCCACCTACAATGGCGAGGC
CTTCATCAAAAATCAGATTTTGTCACTACAACAACAAACATTTTCTAACTGGCGGTTATTTATTCAGGATGATGGGT
CTACAGACAATACTATATCTATAATAAAAAACTTCCAAAAATCTGACTCCAGAATTCGGCTAGTTGATGATAATTTG
AAAGGTCAAGGTGCAGGAAAAAATTTTTTATCGCTGATAAAGTACAGCGAGACAGATTATACAATTTATTGTGACCA
AGATGATATTTGGTTAGAAAACAAAATATTTGAATTAGTAAAGTATGCAAATGAAATTAAATTGAATGTATCAGATG
CGCCTTCGCTAGTTTATGCTGATGGCTATGCTTATATGGATGGTGAGGGTACAATCGATTTTTCTGGGATATCTAAC
AATCATGCTGATCAATTAAAGGATTTTCTTTTTTTTAATGGTGGATACCAAGGATGTTCTATTATGTTCAATCGTGC
AATGACCAAATTTCTTCTGAATTATCGAGGATTTGTATATCTACATGACGATATCACAACATTAGCTGCATACGCTC
TTGGTAAAGTTTATTTTCTCCCGAAATACCTTATGTTATATAGACAGCACACGAATGCGGTAACTGGTATCAAAACA
TTCCGCAATGGATTGACTTCTAAATTTAAATCACCAGTAAACTATCTTTTATCACGAAAACATTATCAGGTAAAAAA
ATCTTTTTTTGAATGTAACAGCTCTATCTTATCAGAGACGAATAAAAAAGTTTTTTTGGATTTTATTTCATTTTGTG
AATCAAATAATAAATTTACAGATTTTTTTAAGTTATGGCGAGGTGGGTTTAGATTAAATAACAGTAGAACTAAATTA
TTATTAAAATTCTTAATACGGAGAAAATTTAGCGAATGATTTCAATACTTACACCTACTTTTAATCGGCAACATACT
TTATCAAGGCTATTCAATTCTCTTATATTACAAACTGATAAAGATTTTGAGTGGATAATAATTGATGATGGTAGTAT
AGATGCAACAGCGGTACTTGTAGAAGATTTTAGAAAAAAATGTGATTTTGACTTGATTTATTGCTATCAGGAAAATA
ATGGTAAGCCCATGGCTTTAAACGCTGGTGTTAAAGCTTGTAGAGGCGATTATATCTTTATTGTTGACAGTGATGAT
GCACTAACTCCCGATGCCATAAAATTAATTAAAGAATCAATACATGATTGCTTATCTGAGAAGGAAAGTTTCAGCGG

AGTCGGTTTTAGAAAAGCATATATAAAAGGGGGGATTATTGGTAATGATTTAAATAATTCTTCAGAACATATATACT
ATTTAAATGCGACTGAGATTAGCAATTTAATAAATGGTGATGTTGCATATTGTTTTAAAAAAGAAAGTTTGGTAAAA
AATCCATTCCCCCGTATAGAAGATGAAAAATTTGTTCCAGAATTATATATTTGGAATAAAATAACTGACAAGGCGAA
GATTCGATTTAACATAAGCAAAGTTATATATCTTTGTGAGTATCTTGATGATGGTCTTTCTAAAAATTTCCATAACC
AGCTTAAAAAATACCCAAAGGGGTTTAAGATTTATTACAAAGATCAAAGAAAACGAGAGAAAACTTATATAAAAAAA
ACAAAGATGCTAATTAGATATTTGCAATGTTGTTATTATGAGAAAATAAAATGAAAATACTATTTGTCATTACAGGT
TTAGGCCTTGGAGGTGCTGAGAAGCAGGTTTGTCTTTTAGCTGATAAATTAAGTTTAAGCGGGCACCATGTAAAGAT
TATTTCACTTGGACATATGTCTAATAATAAAGTCTTTCCTAGCGAAAATAATGTTAATGTCATTAATGTAAATATGT
CAAAAAACATTTCTGGAGTTATAAAAGGTTGTGTCAGAATTAGAGATGTTATAGCTAATTTCAAACCAGACATTGTA
CACAGTCATATGTTTCATGCAAACATTATCACTAGATTGTCTGTAATTGGAATCAAAAACAGACCTGGTATTATATC
AACTGCACATAATAAAAATGAAGGTGGGTATTTCAGAATGCTCACATATAGAATAACCGATTGTTTAAGTGATTGTT
GTACAAATGTTAGCAAAGAAGCAGTGGATGAGTTTTTACGGATAAAAGCCTTTAATCCCGCTAAAGCAATTACTATG
TATAATGGGATAGATACCAATAAATTTAAATTTGATTTATTGGCAAGGAGGGAAATTCGAGACGGTATTAATATAAA
AAATGATGATATATTATTACTTGCTGCAGGTCGTTTAACGTTAGCTAAAGATTATCCTAATTTATTGAATGCAATGA
CTCTGCTTCCTGAACACTTTAAACTTATTATTATTGGTGATGGTGAATTGCGTGACGAAATTAATATGCTTATAAAA
AAATTGCAATTATCTAATAGGGTGTCCTTGTTGGGAGTTAAAAAAAATATTGCTCCCTATTTTTCTGCATGTGATAT
TTTTGTTCTCTCTTCTCGTTGGGAAGGATTTGGATTAGTCGTGGCAGAAGCTATGTCATGTGAGCGAATTGTTGTTG
GCACGGATTCAGGGGGAGTAAGAGAAGTTATTGGTGACGATGATTTTCTTGTACCCATATCTGATTCAACACAACTT
GCAAGCAAAATTGAAAAATTGTCTTTGAGCCAGATACGTGATCACATTGGTTTTCGGAATCGTGAGCGTATTTTAAA
AAATTTCTCAATAGATACTATTATTATGCAGTGGCAAGAACTCTATGGAACTATAATTTGCTCAAAACATGAAAGGT
AGATTTATATTTGGAACGTGTCTTTTGTTTGAATTTAATTCAATCTCAATTGAGATTTTTGTATTTCAAAAATACCA
TCATAGCTAACGATGATTGGTATTTATTTTAAGATGCTTTCTATAAATATATTGACGTTTTTAATGCGCCGAAACGA
TTGGGCTGGGAACAGAGAAGTAAAACTGTTTTGAGAATGAAGAGTTTTTGAGATGTTTATGGATATTAAAAATTGAT
CCAGTGAATTAATTATTTATAATAAATCAAGATTTAATGTTAATAAATGATAATCTTTTCTGACACTCATATTAATT
ATGAGTGGTACGTTTGGTAAACGGTAAACTATTATATGACAGCTAGAACAACTAAAGTTTTGCACTTACAATTACTC
CCACTCTTAAGTGGCGTTCAAAGGGTAACATTAAACGAAATTAGTGCGTTATATACTGATTATGATTATACACTAGT
TTGCTCAAAAAAAGGTCCACTAACAAAAGCATTGCTGGAATATGATGTCGATTGTCATTGTATCCCCGAACTTACGA
GAGAAATTACCGTAAAGAATGATTTTAAAGCATTGTTCAAGCTTTATAAGTTCATAAAAAAAGAAAAATTTGACATT
GTGCATACACATTCTTCAAAAACAGGTATTTTGGGGCGAGTTGCTGCCAAATTAGCACGTGTTGGAAAGGTGATCCA
CACTGTACATGGTTTTTCTTTTCCAGCCGCATCTAGTAAAAAAAGTTATTACCTTTATTTTTTCATGGAATGGATAG
CAAAGTTCTTTACGGATAAGTTAATCGTCTTGAATGTAGATGATGAATATATAGCAATAAACAAATTAAAATTCAAG
CGGGATAAAGTTTTTTTAATTCCTAATGGAGTAGACACTGATAAGTTTTCTCCTTTAGAAAATAAAATTTATAGTAG
CACCTTGAATCTAGTAATGGTTGGTAGATTATCCAAGCAAAAAGATCCTGAGACATTATTGCTTGCTGTTGAAAAAC
TGCTGAATGAAAATGTTAATGTTAAGCTGACACTTGTAGGAGATGGTGAACTAAAAGAACAGTTAGAAAGCAGGTTC
AAACGGCAAGATGGACGTATAATTTTTCATGGATGGTCAGATAACATTGTTAATATTTTAAAAGTTAATGATCTTTT
TATATTACCTTCTCTTTGGGAGGGTATGCCATTAGCAATTTTAGAAGCATTGAGCTGTGGACTTCCATGTATAGTCA
CTAATATTCCAGGTAATAATAGCTTAATAGAAGATGGCTATAATGGTTGTTTGTTTGAAATTAGAGATTGTCAGTTA
TTATCTCAAAAAATCATGTCATATGTTGGTAAGCCAGAACTGATTGCACAGCAATCTACCAATGCACGATCATTTAT
TCTGAAAAATTATGGATTAGTTAAAAGAAATAATAAGGTCAGACAGCTATATGATAATTAAGAGCTCGGTACCCGGG

CCTAGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGA
GGATATTCATATCCGTCGACGGCGGCCGCCCTGCAGGCATGCAAGCTTGATCCATATGGATCGCTAGCTTAATTAAA
TAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTC
CAGGCCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGG
TATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCGCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCC
GTGAGAAGACGGAAGAAGTGATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAAACTGGTTCCTTACTATACGGTGAAAGAGTTTGTC
GAATCTCTGGAAACGCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCCT
CAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATTGATGGTGGTAACACCTTCTTCCAGGACACTATTCGTCGTAATC
GTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTTAACTTCATCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCT
TCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTGGTAGCACCGATCCTGACCAAAATCGCCGCCGTAGCTGA
AGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGCCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTG
AATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCAACGAAGAACTG
GCGCAGACCTTTACCGAGTGGAATAACGGTGAACTGAGCAGTTACCTGATCGACATCACCAAAGATATCTTCACCAA
AAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACGGGTAAATGGACCA
GCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGCTGTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTTTGCACGTTATATCTCTTCTCTG
AAAGATCAGCGTGTTGCCGCATCTAAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCGACAAGGCTGAGTTCAT
CGAAAAAGTTCGTCGTGCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGCTGCGT
CTGAAGAGTACAACTGGGATCTGAACTACGGCGAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAG
TTCCTGCAAAAAATCACCGATGCTTATGCCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCA
AATTGCCGATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGATGTCGTTGCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCCGGTTCCGACCT
TCTCCGCAGCGGTTGCCTATTACGACAGCTACCGTGCTGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTGAC
TATTTTGGTGCGCATACTTATAAGCGTATTGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

[0900] SEQ ID NO:18(O25B rfb基因座核苷酸序列实例-O25B-EPA生产菌株stGVXN4459)

[0901] ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCG
ATACCCAAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGAT
CAAAGAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAAT
CACTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG
AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCATT
TGTCGTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATGATTG
CACGTTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCCGTCATC
CAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGATCAGCCGCA
GACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTCGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAACTGGAACGTACTC
AGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCCGTTGATGCAATG
CTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAGTATGGCCTACGCAA
CCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAATCTGACCGGATGTAAC
GGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAATCTTCCTGCCGTTGTTTT
ATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCAGGATTTTCCTTGTTTCCAGA
GCGGATTGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTAACGCTCGTCACATCATAGGCAT
GCATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATACCTCTATTAATCAAACTGAGAGCCG

CTTATTTCACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGCTAGCAGTGAAGATACTTGTTACTGGTGGCGCAG
GATTTATTGGTTCTGCTGTTGTTCGTCACATAATAAATAATACGCAAGATAGTGTTGTTAATGTCGATAAATTAACA
TACGCCGGAAACCTGGAATCACTTGCAGATGTTTCTGATTCTGAACGCTATTTCTTTGAACATGCGGATATTTGTGA
TGCAGCTGCAATGGCACGGATTTTTGCTCAGCATCAGCCGGATGCAGTGATGCACCTGGCAGCTGAAAGCCATGTTG
ACCGTTCAATTACAGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTGGGTACTTATGTCCTTTTAGAAGCGGCTCGG
AATTATTGGTCTGGTCTGGATGATGAAAAGAAAAAAAACTTCCGTTTTCATCATATTTCTACTGATGAGGTGTATGG
TGACTTACCCCATCCGGATGAAGTAAATAGCAATGAAACGTTGCCGCTATTTACGGAAACGACAGCATACGCGCCAA
GTAGTCCATATTCTGCTTCTAAAGCTTCCAGCGATCATTTGGTTCGCGCATGGAAACGTACTTATGGTTTACCGACC
ATTGTGACTAATTGCTCGAACAACTATGGTCCTTATCATTTCCCGGAAAAGCTTATTCCACTGGTTATTCTTAATTC
ACTGGAAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAAAGGAGATCAGATCCGCGACTGGTTGTATGTAGAGGATCATGCTC
GAGCGTTATATACCGTCGTAACCGAAGGTAAAGCGGGCGAAACTTATAACATTGGTGGACACAACGAAAAGAAAAAC
ATCGACGTAGTGTTCACTATTTGTGATTTGTTGGATGAGATAGTCCCGAAAGAGAAATCTTACCGCGAGCAAATTAC
TTATGTTACCGATCGTCCGGGACACGATCGCCGTTATGCGATTGATGCTGAGAAGATTGGTCGCGAATTGGGATGGA
AACCACAGGAAACGTTTGAGAGTGGGATTCGTAAAACGGTGGAATGGTACCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAAT
GTGAAAAGTGGTGCCTATCAATCGTGGATTGAACAGAACTATGAGGGCCGCCAGTAATGAATATCCTCCTTTTTGGC
AAAACAGGGCAGGTAGGTTGGGAACTACAGCGTGCTCTGGCACCTCTGGGTAATTTGATTGCTCTTGATGTTCACTC
CACTGATTACTGTGGTGATTTTAGTAATCCTGAAGGTGTAGCTGAAACCGTAAGAAGCATTCGGCCTGATATTATTG
TCAACGCAGCCGCTCACACCGCAGTAGACAAAGCAGAATCAGAACCGAAGTTTGCACAATTACTGAACGCGACGAGT
GTCGAAGCGATCGCGAAAGCAGCCAATGAAGTCGGCGCCTGGGTTATTCACTACTCTACTGACTACGTATTTCCGGG
GACCGGTGAAATACCATGGCAGGAGGAGGATGCAACCGCACCGCTAAATGTTTACGGTGAAACCAAGTTAGCGGGAG
AAAAAGCATTACAAGAGCATTGTGCGAAGCACCTTATTTTCCGGACCAGCTGGGTCTATGCAGGTAAAGGAAATAAC
TTCGCCAAAACAATGTTGCGTCTGGCAAAAGAGCGTGAAGAATTAGCCGTTATTAATGATCAGTTTGGTGCGCCAAC
TGGCGCAGAGTTACTGGCTGATTGTACGGCACATGCTATTCGTGTGGCACTGAATAAACCGGAAGTCGCAGGCTTGT
ACCATCTGGTAGCTAGTGGTACCACAACGTGGCACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGC
ATTCCCCTTGCACTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAACAACAGCCTATCCTACACCAGCTCGTCGTCCACATAACTC
TCGCCTTAATACAGAAAAATTTCAGCAGAACTTTGCGCTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTTGGCGTGAAACGAATGC
TTAACGAATTATTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTAATGGTGGAGCAAGATGTATTAAA
AGGAATGATGAAATGAAAACGCGTAAAGGTATTATTTTGGCGGGTGGTTCTGGTACTCGTCTTTATCCTGTGACGAT
GGCCGTCAGTAAACAGCTGTTACCGATTTATGATAAACCGATGATCTATTACCCGCTCTCTACACTGATGTTAGCGG
GTATTCGCGATATTCTGATTATCAGTACACCACAGGATACTCCTCGTTTTCAACAACTGCTGGGTGACGGGAGCCAG
TGGGGCCTGAATCTTCAGTACAAAGTGCAACCGAGTCCGGATGGTCTTGCGCAGGCGTTTATTATCGGTGAAGAGTT
TATTGGTGGTGATGATTGTGCTTTGGTACTTGGTGATAATATCTTCTACGGCCACGACCTGCCGAAGTTAATGGACG
TAGCTGTTAACAAAGAAAGTGGTGCAACGGTATTTGCCTATCACGTTAATGATCCTGAACGTTATGGTGTCGTGGAG
TTTGATAATAACGGTACTGCAATTAGCCTGGAAGAAAAACCGCTGGAACCAAAAAGTAACTATGCGGTTACTGGGCT
TTATTTCTATGACAATGACGTTGTGGAAATGGCGAAAAACCTTAAGCCTTCTGCCCGAGGTGAACTGGAAATTACCG
ATATTAACCGTATTTATATGGAACAAGGACGTTTGTCTGTCGCTATGATGGGGCGTGGCTATGCATGGCTGGATACA
GGGACGCATCAAAGTCTTATTGAAGCAAGCAACTTCATTGCCACCATTGAAGAGCGCCAGGGACTAAAGGTTTCCTG
TCCGGAAGAAATTGCTTATCGTAAAGGGTTTATTGATGCTGAGCAGGTAAAAGTATTAGCCGAACCGTTGAAGAAAA
ATGCTTATGGTCAGTATCTGCTCAAAATGATTAAAGGTTATTAATAAGATGAACGTAATTAAAACTGAAATTCCTGA

TGTGCTGATTTTTGAACCAAAAGTTTTTGGGGATGAACGTGGCTTCTTTTTTGAGAGTTTTAATCAGAGGATTTTTG
AAGAAGCAGTAGGTCGTAAGGTTGAGTTTGTTCAGGATAACCATTCTAAGTCCAGTAAAGGTGTTTTACGTGGTCTT
CATTATCAGTTAGAACCTTATGCTCAAGGAAAACTGGTGCGCTGTGTTGTTGGCGAGGTTTTTGATGTTGCGGTTGA
TATTCGTAAATCGTCACCTACATTTGGGAAATGGGTTGGGGTGAATTTGTCTGCTGAGAATAAGCGTCAGTTGTGGA
TTCCTGAGGGATTTGCACATGGTTTTTTGGTGCTGAGTGATTTAGCAGAAGTTTTATATAAAACGAATCAATATTAT
GCTCCATCACATGAAAAAAATATTATATGGAATGACCTCTTGCTTAATATTAAATGGCCGAGCACAGCACTGATCAC
TCTGTCTGATAAGGATGCAAATGGGGAAAGATTTGAACTAAGTGAGTTTTGAAATGTCTCTCTTAAAACATAGTATA
TGGAATGTTGCGGGCTACTTTATACCAACATTAATTGCAATTCCCGCCTTTGGATTAATTGCGAGGAAAATTGGTGT
AGAACTATTTGGTTTGTATACGTTAGCAATGATTTTTATAGGGTATGCAAGTATATTTGATGCTGGGTTAACAAGAG
CTGTTGTGCGTGAAATAGCATTACTAAAAAACAGAGTGGACGATTGTAATACGATAATAGTAACTTCTATTATCGCT
GTGATATTTTTAGGGTTTATCGGAGGCGGGGGAGTGTTTCTGCTTAAAGGCGATATTATTGAACTGTTAAATATCTC
ACCAATATATTACGCCGATTCGATAAAGTCTCTAGTATTATTATCATCTCTGATACCTGTATTCTTAGTCACGCAAA
TACTATTAGCAGAGCTTGAGGGTCGGGAATATTTTGGGATTCTAAATATACAAAAAAGTGTAGGGAATTCTTTAATT
GCAGGGTTACCTGCATTATTTGTTTTAATTAATCAAACGCTTTTTTCTGCAATTATTGGTGTAGCGATTGCAAGAGT
TATATGCTTGTGGTTAAGCTACATTATGAGCAGGGAAAGAATAACTATCGATATCTCATTTTTTTCAATAACTGTTT
TAAAGCGGTTATTTAGATATGGCGGGTGGGTAACTATAAGTAACATAATATCTCCTATATTAGCGAGTATGGATAGA
TTTATTCTATCCCATATCCAGGGAGCATCAAAAATATCATTCTATACAGTCCCTAATGAGCTGGTAACTAGGCTTGG
AATAGTTCCAGGCTCTCTTGGGAAAGCTGTTTTTCCAAAATTAAGTCATGCAAGGAATTTTACAGCGTCATATGCAG
AGCAAAAAAAAGCTTATATATTAATGACTGTCATTGTAATGCCTTTGGTTTTATTTGTATATTATTACGCAAAGTTT
ATTTTAACATTGTGGATGGGGGCTGAGTATGCAGGGATTTCGGTCGAAATATTACGGATTATGCTTATAGGGTATAT
TTTTAACTGTTATTCACAAATCTCTTTTGCCAACATACAGGCCTTTGGAAAAGCAAAATACACTGCATACATCCATA
TGATGGAATTTATTCCTTATTTGATAATGTTATATATAATTTCAAAGGAATATGGGGTTATTGGTGTTGCGTGGTTA
TGGACAATTCGAGTAATAATTGATTTTTTGATGCTTTTATATATGAGTTATCGTTGTAATAATCTTATGAAAAAAGG
GTAGCCTGATGATATATATTGTGGTATTAAATTGGAATGGGGCTATAGATACCATTAATTGTGTTAAAAGTTTAATG
GATTTAAATGTTAGCGATTATAAAATTATCATTGTTGATAACTGTTCTATGGATAACTCATATGATACTATAAAAGA
AAATCTTAATTCATTATATATTGCTGATAAAAGTATCATTGAGGTGAAGTATGAGGATAGAAATAAATATAAAACCT
TAGAAAACGATAAAATCATATTAATACAATCTCCGCAAAATAATGGGTACGCAAGTGGTAATAATATTGGCATAGAG
TTCGCTCTTAATCAGGAGAATATGAAATACGTCTGGGTTCTGAATAATGATACTGAAGTGGATAAAGAGGCTTTAAC
TCATTTAATTAGTAAATGTGATTCAGATAAAAGTATAGGGATTTGCGGTTCTCGTTTAGTCTATTTTGCCGACAGAG
AGATGCAGCAAGGACTAGGTGGGGTGCATAACAAATGGTTATGCACTACAAAAAATTATGAAATGGGAAGATTAGTT
TCCAAAAAATATGATGATGAAGTCATTAGTAATGATATAGATTATATAATTGGCGCATCGATGTTTTTCTCTAGAGA
ATGTTTGGAAACAGTTGGATTGATGAATGAAGAATATTTTTTATACTATGAAGAGTTAGATATTTGCCTCAGAGCAA
AAGCAAAGAACTTTAAATTAGGTATTTGCTCAGAAAGTTTGGTTTATCATAAAATAGGTGCAAGTACTGATGGGGGA
AAGAGCATGATGGCTGATCTTTGCTCAATAAAAAATAGGCTGGTCATTACAGAAAGGTTTTATCCCCAATATTATTG
GACGGTATGGTTGTCACTTTTTGTTGTAGCATTTAACCGTGCTAGAAGAGGTGAGTTTAATAAGATGAAAAGATGTT
TGAATGTTATGTTTAACTTCAAACGAAACAAAGGTAGCAAATGCCATTAGAATATGCACTTAATCATGGTGTTAATA
AATCTATAGTTTGATATGTTATTAAAGGGTATTTAATGAAAGTGGCTTTTTTATCTGCTTATGATCCACTATCTACA
TCCAGTTGGTCTGGCACACCTTATTATATGCTAAAGGCATTATCGAAGAGAAATATTTCCATTGAAATATTAGGACC
GGTAAATAGCTATATGATATACATGTTAAAAGTATATAAATTAATATTAAGGTGTTTCGGAAAAGAATATGATTATA

GTCATTCGAAGTTGCTTTCCAGGTATTACGGTAGAATATTCGGTAGGAAATTAAAAAAAATTGATGGTTTGGATTTT
ATTATCGCACCTGCAGGTTCCTCACAAATTGCTTTTTTAAAAACAACCATACCAATAATATATCTATCGGATACAAC
ATATGATCAATTAAAAAGCTATTATCCGAATTTAAATAAAAAAACAATTATAAATGATGAGGATGCAAGTTTAATCG
AACGCAAGGCTATTGAAAAAGCAACAGTAGTATCTTTCCCATCTAAATGGGCAATGGATTTTTGCAGGAATTATTAC
AGATTAGATTTTGATAAATTAGTTGAAATACCATGGGGGGCTAATTTATTTGATGATATTCACTTTGCTAATAAAAA
TATAATTCAAAAGAATAGTTATACTTGTCTTTTCTTGGGAGTTGATTGGGAAAGAAAAGGTGGGAAAACAGCCTTGA
AAGCAATTGAATATGTAAGGCAGTTATATGGGATCGATGTTAGACTAAAAATTTGTGGATGTACTCCGAATCAAAAG
ATTTTACCTACTTGGGTTGAATTAATTGATAAAGTAGATAAAAATAACGTTGACGAATATCAGAAATTCATCGATGT
GTTATCTAACGCTGATATACTTCTTTTACCAACCATTGCTGAATGTTATGGAATGGTATTTTGTGAAGCTGCTGCTT
TTGGATTGCCTGTTGTCGCTACAGATACAGGTGGAGTCAGTTCTATAGTTATCAACGAAAGGACGGGGATATTAATT
AAAGACCCGTTAGACTATAAGCACTTTGGAAATGCAATTCATAAAATAATTAGTTCCGTAGAGACTTATCAAAACTA
CTCCCAAAACGCAAGAATTAGATATAATAATATATTGCATTGGGACAATTGGGCTAAAAAGATAATTGAGATTATGT
ATGAGCATAAGAATAGAAGAATCAAATAGCACAAAAAGAATTATATGTTTATTTATACTTTTTCTTGTTTTCCCTGA
TTTTTTGTTTTATACATTAGGGGTTGATAATTTTAGCATTTCAACGATAATCTCAATTACATTGCTTTTTGTTTTTT
TAAGAGCTAAAAATATTTGCAAAGATAATTTTCTAATAATAGTAGCGTTATTCATATTGTTGTGTTTTAACTGTTTG
TTAAGTATGCTATTTAATATTGAACAGGCTTTAACATTTAAAGTTGTACTTTCAATATATAGCATCTTAATAATGGC
ATACGTCTCCTCTTGTTATGCACAGACGTTGTGGTTATGTTCTGAAGAAATACTTAAGAGATCCGTCTTTTATTTGT
TCGCATTTCTTTGCCTTATTGGCATTATAAGTATTCTTTTACAGAAGACTGAGATTATACATGATAAAAGTATGATT
CTTTTTCCTGAACCATCAGCATTTGCATTGGTTTTTATACCTATCTTTTCATTTTGTTTATACTATACAAGAGGGGG
GGGGCTACTATTGCTCTATATATTATCTTTGGGTATTGCGTTAGGTATCCAGAATTTAACAATGTTGGTAGGCATTG
TGATTAGTGTTTTTGTGATGAAAAAAATAACTATAAGGCAAACTATTGTTATACTTTTGGGGGCATGGATTTTTTCC
ATGATATTAAGTGATTTAGACATTTCTTACTATACATCGCGGCTTGATTTTAAAAATACTACGAACCTATCAGTGCT
TGTATATCTTTCAGGAATTGAAAGAGCTTTCTTGAATTTTATTACAAGTTATGGTCTTGGTATTGGTTTTCAACAAA
TGGGAGTGAATGGGGAGATAGGAATATATCAACAAATTTTAGCTGAACTTGATGCCCCTATGTTAAATATATACGAT
GGCTCATTTATTTCTTCTAAGTTAATATCTGAGTTTGGGGTTATTGGTGCATTAATGTGTATTTTCTATTTTTTTTA
TTTTTCCCGATTTTATCTGCGTTTCAAAAAAAGTAAGAGATATTCACCGCAGTATATTTTAGCATATAGCTTCTACA
TGTGTTTCTTCATCCCTCTTTTTATACGTGGTGCTGGTTATATAAACCCCTATGTGTTTATGTTATTTTCATCAATA
TTTTTGTGCAAATATCACGCTAAAAATATCTTGATGAAATCTAATGTCCAGATAGCTATATAATAGTAGATTATATT
ATCATTATCACGTAAATTACATATTAATAGCATATATGATAACTAGGACATAAATAATGTGCATTAAAAAAAAACTT
AAGTTAATTAAACGATATGGCCTTTATGGTGGTCTTAGGCTTCTTAAAGATATATTCTTAACAAAATTTTTATTTTG
TTCAAATGTTAGGATTATTAGATTTCCATGTTATATTAGAAAAGATGGAAGTGTTAGTTTTGGAAAAGGTTTTACAT
CAGGTGTAGGATTACGAGTTGATGCATTTATGGATGCCGTAGTTTCCATTGGAGAAAATGTTCAAATTAATGACTAT
GTTCACATCGCGGCTATTAATAATGTCATTATTGGTAGAGATACATTAATAGCAAGTAAAGTATTTATTAGTGATCA
TAATCATGGTATTTTTTCTAAATCCGATATCCATAGTTCACCAACTATTATTCCTTCGTCTAGGCCCCTTGAATCTG
CACCTGTGTATATTGGAGAGCGTGTGTGGATTGGCGAAAATGTGACAATATTACCAGGTGCGTGTATAGGTAATGGT
GTAGTTATTGGCGCAAACAGTGTTGTTCGTGGTGAGATTCCTAATAATGTGATCATTGCTGGTGTTCCAGCTAAAAT
TGTTAAAAAATATAACTATGAGCGTATGCAATGGGAAAGAATATAGTTGTAATATCGGCTGTTAATTTTACAACCGG
AGGCCCCTTTACCGTACTAAAAAATGTGCTTACAGCAACTAAAGATAGAGCCGAATGTAAATTTATTGCACTGGTTC
ATAGCTCTGCTGAACTAATGGAATTATTTCCGTGGGTTGAATTTATAGAGTATCCAGAAGTCAAGTCTTCGTGGGTT

AAAAGATTATATTTCGAATATATAACTTGCAATAGATTATCTAAGGTGATTAAGGCAACTCATTGGGTATGCTTACA
TGATATTACAGCAAATGTTAGTGTACCCTATAGATTTGTTTATTGCCACAATCCTGCACCGTTCTATAAATATTTAA
GCTATCGAGATATTATAGGAGAACCTAAATTTTATCTTTTTTATCTTTTTTATGGGCTTTTATACAATATCAATATA
AAAAAGAACACAGCAGTTTTTGTTCAGCAGCAGTGGCTAAAAAAAGAATTCGAAAAAAAATATAAGTTAAAGAATGT
TGTTGTTAGTCGCCCTGAAGATATTTGCCCTTTTGAAAGTGATGGTTTGGTAAGAAATAATAATAAAAAGGATGTGA
GGATATTTTACCCAGCAGTGCCCCGTATATTTAAAAACTTTGAAGTTATCATACGTGCTGCACAAATATTACAAGAT
AAAAATATTCATTTTTATCTTACTTTTGATGGTACTGAAAATAAGTATGCAAAAAGAATATATAAATTAGCTTCCGA
ACTGAAAAATGTACATTTCCTCGGTTACCTTAATGCAACCGAGATGGTTAACTTTTATCAAGATTCAGATATTATTT
GTTTCCCATCGAAACTAGAAACGTGGGGATTACCATTATCAGAAGCTAAAACATACAAAAAATGGATATTTGCGGCA
GACTTACCTTATGCTCATGAAGTTTTATATAACTATTCAAAAACTAGATATTTTCCATTTGACGATGAGAAAATACT
TGTTCGCTACATATTAGAGTACACAAGTAAAAATATGCATGAAGATATAAAAAATAGTAGGGTGAATTTTAATAATG
ATGCATTGACTGGTTTTGAACAGTTTATTGAATATATCCTCAAGGGGAACTGACGTGGTTTATATTATAATCGTTTC
ACATGGCCATGATGACTATATAGAAAATCTTTTATTAAATTTAAAGTTGCCCTCTGGAAGATTTAAAATAATAGTTC
GTGATAACAAAAGTTCAATGGTTTTAAAAAAAACATGCGAAAAAAATTGCGTAACCTATTTGCATGGAGGGCAATAT
GGATTTGGACATAATAATAACATAGCAGTGTCATATATAATTAATAACTTCATGATTATGAATAATGATTATTTTCT
CTTTCTTAACCCCGATGTATTCATAACCAGTGAAAGTTTGATTAATTATGTTGATTATATAATTAGTAATGATTATA
AGTTTAGCACATTATGTCTTTATCGAGATTTTACTAAAAGCAAACATGATTATTCAATACGGAGTTTTCCAACTTTA
TATGATTTTCTTTGTTCTTTTTTATTGGGGGTGAATAAAAGTAAAATTAAGAAGGAAAATATACTTTCTGATACTGT
AGTTGATTGGTGTGCTGGCTCATTTATGCTTATTCATGCTTTAAGTTTCTTAAATGTGAATGGTTTTGATCAAAAAT
ATTTTATGTATTGTGAAGATATTGACCTTTGTATGCGTTTAAAATTAAGTGGAGTAGATCTTTACTATACTCCCCAT
TTTGATGCTATTCATTATGCGCAGCATGAAAATAGAAGAATATTTACTAAAGCATTTCGATGGCATATAAGGAGTAT
TACGCGCTACATATTACGGAAACCAATTCTTTCTTATAAAAACTATAGAAAAATTACATCCGAACTGGTAAAGTGAT
TAAGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAA
GGAGGATATTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTATTTATACTTTAATAAGTACTTTGTAT
ACTTATTTGCGAACATTCCAGGCCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACCTGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGCA
ACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCGCTCAACATCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCT
CTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGAAGTGATTGCCGAAAATCCAGGCAAGAAACTGGTTCCTTACTAT
ACGGTGAAAGAGTTTGTCGAATCTCTGGAAACGCCTCGTCGCATCCTGTTAATGGTGAAAGCAGGTGCAGGCACGGA
TGCTGCTATTGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCATTGATGGTGGTAACACCTTCTTCCAGG
ACACTATTCGTCGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTTAACTTCATCGGTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAG
GGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTATGAATTGGTAGCACCGATCCTGACCAA
AATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGCCGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGA
TGGTTCACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCTATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAAC
CTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGAATAACGGTGAACTGAGCAGTTACCTGATCGACATCAC
CAAAGATATCTTCACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGTGATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAG
GTACCGGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGCTGTCGCTGATTACCGAGTCTGTGTTTGCA
CGTTATATCTCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTTGCCGCATCTAAAGTTCTCTCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGG
CGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTCGTGCGCTGTATCTGGGCAAAATCGTTTCTTACGCCCAGGGCTTCT
CTCAGCTGCGTGCTGCGTCTGAAGAGTACAACTGGGATCTGAACTACGGCGAAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGC

TGCATCATCCGTGCGCAGTTCCTGCAGAAAATCACCGATGCTTATGCCGAAAATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCT
GGCTCCGTACTTCAAGCAAATTGCCGATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGATGTCGTTGCTTATGCAGTACAGAACG
GTATTCCGGTTCCGACCTTCTCCGCAGCGGTTGCCTATTACGACAGCTACCGTGCTGCTGTTCTGCCTGCGAACCTG
ATCCAGGCACAGCGTGACTATTTTGGTGCGCATACTTATAAGCGTATTGATAAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATG
GCTGGATTAA

[0902] SEQ ID NO:19(O75rfb基因座核苷酸序列实例-O75-EPA生产菌株stLMTB11737)

[0903] ATGACGAATTTAAAAGCAGTTATTCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATATGTTGCCTGCCACTAAGGCG
ATACCCAAAGAGATGCTACCAATCGTCGACAAGCCAATGATTCAGTACATTGTTGACGAGATTGTGGCTGCAGGGAT
CAAAGAAATCCTCCTGGTAACTCACGCGTCCAAGAACGCGGTCGAAAACCACTTCGACACCTCTTATGAGTTAGAAT
CACTCCTTGAGCAGCGCGTGAAGCGTCAACTGCTGGCGGAAGTACAGTCCATCTGTCCGCCGGGCGTGACCATTATG
AACGTGCGTCAGGGCGAACCTTTAGGTTTAGGCCACTCCATTTTGTGTGCGCGACCTGCCATTGGTGACAACCCATT
TGTCGTGGTACTGCCAGACGTTGTGATCGACGATGCCAGCGCCGACCCGCTACGTTACAACCTTGCTGCCATGATTG
CACGTTTCAACGAAACGGGCCGCAGCCAGGTGCTGGCAAAACGTATGCCGGGTGACCTCTCTGAATACTCCGTCATC
CAGACTAAAGAGCCGCTGGACCGTGAGGGTAAAGTCAGCCGCATTGTTGAATTTATCGAAAAACCGGATCAGCCGCA
GACGCTGGACTCAGACATCATGGCCGTAGGTCGCTATGTGCTTTCTGCCGATATTTGGCCGGAACTGGAACGTACTC
AGCCTGGTGCATGGGGACGTATTCAGCTGACTGATGCTATTGCCGAGCTGGCGAAAAAACAATCCGTTGATGCAATG
CTGATGACCGGCGACAGTTACGACTGCGGCAAAAAAATGGGCTATATGCAGGCGTTTGTGAAGTATGGCCTACGCAA
CCTGAAAGAAGGGGCGAAGTTCCGTAAAGGTATTGAGAAGCTGTTAAGCGAATAATGAAAATCTGACCGGATGTAAC
GGTTGATAAGAAAATTATAACGGCAGTGAAAATTCGCAGCAAAAGTAATTTGTTGCGAATCTTCCTGCCGTTGTTTT
ATATAAACCATCAGAATAACAACGAGTTAGCAGTAGGGTTTTATTCAAAGTTTTCCAGGATTTTCCTTGTTTCCAGA
GCGGATTGGTAAGACAATTAGCGTTTGAATTTTTCGGGTTTAGCGCGAGTGGGTAACGCTCGTCACATCATAGGCAT
GCATGCAGTGCTCTGGTAGCTGTAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGCATTAATACCTCTATTAATCAAACTGAGAGCCG
CTTATTTCACAGCATGCTCTGAAGTAATATGGAATAAATTAAGCTAGCAGTGAAGATACTTGTTACTGGTGGCGCAG
GATTTATTGGTTCTGCTGTTGTTCGTCACATAATAAATAATACGCAAGATAGTGTTGTTAATGTCGATAAATTAACA
TACGCCGGAAACCTGGAATCGCTCGCTGAAATTTCTGATTCTGAACGTTATTCATTTGAGCATGCAGATATCTGCGA
TGCCGAAGCGATGGCTCGTATTTTCGCACAGCACCAGCCAGACGCGGTGATGCACCTGGCAGCAGAGAGCCACGTTG
ACCGCTCAATAACTGGCCCTGCGGCATTTATTGAAACCAATATTGTGGGTACTTATGTTCTTTTAGAAGCGGCGCGC
AATTATTGGTCTGGTCTGGATGATGAAAAGAAAAAAAACTTCCGCTTTCATCATATTTCTACTGATGAGGTGTATGG
TGACTTACCCCATCCGGATGAAGTAAATAGCAATGAAACGTTGCCGCTATTTACGGAAATGACAGCATACGCGCCAA
GTAGTCCATATTCTGCTTCTAAAGCTTCCAGCGATCATTTGGTTCGCGCATGGAAACGTACTTATGGTTTACCGACC
ATTGTGACTAATTGCTCGAACAACTATGGTCCTTATCATTTCCCGGAAAAGCTTATTCCACTGGTTATTCTTAATGC
ACTGGAAGGTAAGGCATTACCTATTTATGGCAAAGGAGATCAGATCCGCGACTGGTTGTATGTAGAGGATCATGCTC
GAGCGTTATATACCGTCGTAACCGAAGGTAAAGCGGGCGAAACTTATAACATTGGTGGACACAACGAAAAGAAAAAC
ATCGACGTAGTGTTCACTATTTGTGATTTGTTGGATGAGATAGTCCCGAAAGAGAAATCTTATCGTGAGCAAATTAC
CTATGTTGCTGATCGCCCAGGGCATGATCGCCGTTATGCAATTGATGCCGATAAAATTAGCCGCGAATTGGGCTGGA
AACCACAGGAAACGTTTGAGAGCGGGATTCGTAAAACTGTGGAATGGTATCTGTCCAATACAAAATGGGTTGATAAT
GTGAAAAGTGGTGCCTATCAATCGTGGATTGAACAGAACTATGGGGGCCGCCACTAATGAATATCCTCCTTTTTGGC
AAAACAGGGCAGGTTGGTTGGGAACTACAGCGTGCTCTGGCACCTCTGGGTAATTTGATTGCTCTTGATGTTCACTC
CACTGATTACTGTGGTGATTTTAGTAACCCTGAAGGTGTGGCTGAAACCGTTAGAAGCATTCGGCCTGATATTATTG

TCAACGCAGCCGCTCACACCGCAGTAGACAAAGCAGAATCAGAACCGGAGTTTGCACAATTACTGAACGCGACGAGT
GTCGAAGCGATCGCGAAAGCAGCCAATGAAGTCGGCGCTTGGGTTATTCACTACTCTACTGACTACGTATTTCCGGG
GACCGGTGAAATACCATGGCAGGAGGAGGATGCAACCGCACCGCTAAATGTTTACGGTGAAACCAAGTTAGCAGGAG
AAAAAGCATTACAAGAGCATTGTGCGAAGCACCTTATTTTCCGGACCAGCTGGGTCTATGCAGGTAAAGGAAATAAC
TTCGCCAAAACGATGTTGCGTCTGGCAAAAGAGCGTGAAGAATTAGCCGTTATTAATGATCAGTTTGGTGCGCCAAC
TGGCGCAGAGTTGCTGGCTGATTGTACGGCACATGCCATTCGTGTGGCACTGAATAAACCGGAAGTCGCAGGTTTGT
ACCATCTGGTAGCCAGTGGTACCACAACCTGGCACGATTATGCTGCGCTGGTTTTTGAAGAGGCGCGCAAAGCAGGC
ATTCCCCTTGCACTCAACAAGCTCAACGCAGTACCAACAACAGTCTATCCTACACCAGCTCGTCGTCCACATAACTC
TCGCCTTAATACAGAAAAATTTCAGCAGAACTTTGCGCTTGTCTTGCCTGACTGGCAGGTTGGTGTGAAACGCATGC
TCAACGAATTATTTACGACTACAGCAATTTAATAGTTTTTGCATCTTGTTCGTGATGGTGGAACAAGATGAATTAAA
AGGAATGATGGAATGAATACGCGTAAAGGTATTATTTTAGCGGGTGGTTCTGGTACACGTCTTTATCCTGTGACTAT
GGCTGTCAGTAAACAGCTGTTACCGATTTATGATAAACCGATGATCTATTACCCGCTCTCTACACTGATGTTGGCGG
GTATTCGCGATATTTTGATTATCAGCACGCCACAGGATACTCCTCGTTTTCAACAACTGCTGGGTGATGGGAGCCAG
TGGGGGCTAAATCTTCACTACAAAGTGCAACCGAGTCCGGATGGTCTTGCGCAGGCATTTATCATCGGTGAAGAGTT
TATCGGTGGTGATGATTGTGCTTTGGTACTTGGTGATAATATCTTCTACGGTCACGACCTGCCTAAGTTAATGGATG
CCGCTGTTAACAAAGAAAGTGGTGCAACGGTATTTGCCTATCACGTTAATGATCCTGAACGCTATGGTGTCGTTGAG
TTTGATAAAAACGGTACTGCAATCAGCCTGGAAGAAAAACCGTTACAACCAAAAAGTAATTATGCGGTAACCGGGCT
TTATTTCTATGATAACTACGTTGTGGAAATGGCGAAAAATCTTAAGCCTTCTGCCCGCGGTGAACTGGAAATTACCG
ATATTAACCGTATCTATATGGAACAGGGGCATTTATCTGTTGCCATGATGGGACGTGGATATGCCTGGCTGGACACG
GGGACACATCAAAGTCTTATTGAAGCAAGCAACTTCATTGCCACCATTGAAGAGCGCCAGGGCTTGAAAGTTTCCTG
CCCGGAAGAAATTGCTTACCGTAAAGGGTTTATTGATGCTGAGCAGGTGAAAGTATTAGCTAAACCGCTGAAAAAAA
ATGCTTATGGTCAGTATCTGCTAAAAATGATTAAAGGTTATTAATAAAATGAATGTTATTAAAACAGAAATTCCAGA
TGTACTGATTTTTGAACCGAAAGTTTTTGGTGATGAGCGTGGTTTCTTTATGGAAAGCTTTAATCAGAAAGTTTTCG
AAGAGGCTGTAGGGCGGAAGGTTGAATTTGTTCAGGATAATCATTCTAAATCGTGTAAAGGTGTACTTAGAGGTTTA
CACTTTCAGCTTCCTCCCTTTGAGCAGGCAAAATTAGTAAGGTGTATAGTTGGCGAGGTATTTGATGTTGCAGTAGA
CATTAGACCTAATTCTGAAACATTTGGTTCATGGGTTGGAGTAACTCTTTCGTCAGAAAATAAAAGGCAGCTATGGA
TTCCAGAAGGATTCGCCCATGGTTTTTTAACTTTAAGTGATATTGCAGAGTTTGTTTATAAAACTAACAACTATTAT
TCTTTAAATCATGAAAGGGGAGTCATTTGGAACGATGAGGAAATTAACATTGCCTGGCCCTCTCAATCAGAGAAGAT
TCTGTCACAGAAAGATATTAATTTACCATCATTTAGATTTGTTCAAATGTTTAGCAAGTAGTGTTATCTTTACACTG
CACATAGTCATCATTTTTTATGCTTTAAGTAAATTATATTGCACATCTATAACACAAAGCGCAATAATATTTCGACC
TGATGAAGGTTTGTGGTTATTTATCTTTCTAGGCGTTTTTTATGACTAAAATAGTTGTGGTTTCTACAGCTCCAATA
TTCCCGACAAATAATGGGTACAAAAGTTCTGTATTAGGAAGAATTGATGAGTTATTAAATGAGGATAATGAGGTCGT
TTTGATTGAAATAAACCTTGAAAATGTTACGGAAAAGAAAGATGAATTAATACCAACAAGATTTAATAATATTCAAA
GATATGAAGTAAAAAAAATATCTAGATCATTTATTGCCGAGTTACAAATATTATTTGATATCAGAACTCGGTATGAA
CAATTATTTTCTTCTGCTGACATTAGAGATAACATAAAAAAGATAATTGATTTAGAAAAACCTTCTATTATTATTGC
TGAGTCTATATGGGCGTTGCAAGCATTGCCTATTGAAATTAGTGCGAGAATACACTGTGTTATTCATGATGTGGCAA
CTGATTTCTTTAAAGAAATGTTTGTATCTCATAATGAGGTTGTACGAAAAATTTTGTTTTTTAATGATTACCTAAAG
TTGAAAATTACTGAAGAAAATATTATCAAACGTTTGAGAGTTGAGCAATTTATCTTTCTGACAGAAGAAGATAAATG
TTGGTATAAAACAAGATACAATATTGATGAGGGTTGTTGTTCCTTAGCGAGCAATCATCTTTATGTAGAAAAGATTA

AGAGAACTATCAATTTCCAAACCCCTTTCCTGCTTATTCCCGGTAGCATTGAATTTTCACAAAATTTTTACGGCTTA
AATTGGTTTATAAAAAATATATATCCTGGATTAAATAGGAAAATAAGAATAGTTGTAACAGGAAAGGCATCAGATAA
AAAAATAAAGATGTTAAACTGTGGAGAGGAAATTACCTTTACGGGAGAGCTTGACTTTTCCACATATAATAAACTTA
GCTCAACATGCTTGTGTGTTATTGCACCGATTACAACGGGCACTGGAATTAAAATAAAAATATTAGAAGCTGTACAA
AAAGGTATTCCTGTACTTACAACAAAATTTGCTTCAAAAGGAATATGTTCCGATTTATGTTTTTATTGCGAGGAGGA
TACTGACACAAACTTTGTCAATTTAATTAACAGTTTTCTTGAAACGACATTAAGAGTCCAAGAATGAATTTATTGCT
TTTTTCAGTCCTTGCGTTTGGTTTAATATTGGCTTTGGCCCATAATAATAAAAGTGGAGATATTAACGCATACTTAA
TGTTTTTTCTCGTGGTCCTAATGGTATTAATATCAGGGCTGCGTATGAATGATAGTGATTATATCGAATACAGGAAA
ATGTATAATGAAGTGCCTATTTTATGTGACTTTAGTCTCGCATCTATAAGAGATATACATGGGGAGGTAGGCTATCT
ATTCTTATCATCAATCTTTAAAACTTTATGCTTGCCATTTCAATTATTTCTTTTTTTTATTGCTTTTTTATCACTCC
TGCTTACATATTTTTCATTCAGAAAAATAAGTTTAATACCGATACTATCGTTAGTTTTTTATTTAAGCCATGCTTTT
ATAGTTAGAGATTTGATTCAAATTAGGGCAGGATTAGCTGTTAGCATATCATTATATTCAATAATTAAATTTAAAGG
AAATAAAAGTATAATTACAGGAGTTTTATTTGCTTCTTTGATTCATTCTGGGGCGCTTATTATTGCTCTTTGTTATC
CTTTTTTCAAAAAAAAATACATAACATTAAAAATGATGTTGTTTTTATTTTTAGTGTCAATTATTTTTTCTTATTTG
AATGGGCTTAATTTATCGATACAACTCTTATCTCAATATAGTTTGCTTCCAACTGCAATTTCGAATTATGTTGGTTG
GGAAGAATATGATTATCGGGTGAGTATATTTACTAATCCGGTTTTTATTAAAGGTGTTTTTTTAATTGTCTTAATGC
ACAAATATGTACTTTCAGATATTAAAAATGAGAAAATTATAGTGCTTTATAACTTATATGTTTTAGGTGTATTAGCT
ATGGTTGCATTGAGTGGGATGGCTATTCTTTCAGGCCGTCTTTCATCCTTTCTGACACTAGGTGAAAGCATTTTAAT
TGTATATGCTCTGTTCTACAAAAGAAATACACCTCTGGCGTTTCTAATTTTTTCTTTTTTAACAATTGTGCAATTAG
GATATGATCTATTTATTTCTAATGTGCATCCTGAGCTTACTCTGATTATATTTGGGTGAATCTAAGTGAAAAATAAT
AAAATAGGCATACTTATCTCTAAAATACAAAATCTTGGACCTGTGAATGTAGTACGAGGATTGATAAAAGAAAATAA
AAAATATGCTTTTACTGTTTTTTGTTTAACAAATAGCGTAGATAAAAATATATATGATGAGTTATGCTGTTTAGGAG
CCAAGGTTATATTAATACCAGATGGTACTTGGTTCAGCAAAATTTTATTTGTGAGAAGTTTTTTAAAGGAACATCCA
CATAATATCTTACATTCACATGGGATCACGGCCGATATGTTTTCTTACTTTCTGAATGGCGTGAAAATATCTACTAT
TCACAATAGACTAGATGAGGATTATATCCCATTATTTGGCGCGGTTAAAGGGAATGCTATATATTATCTTCATCGTT
TTATATTACGAAGATTTAATCATATCGTTGCTTGCTCAGCAGCGGTCCAATCAAAACTGAAACAATCGAAAGTAAAA
ACTAAAATAACCACCATCCAGAATGGGATTGATATAACTAGGTTTAAGACACTTGAGTCTGATAAAAAAAAATTATT
GAGGGAAAAACACGGATTTGATAGTGAAAAAAGAATATTTATATATTGTGGCTCGTTATCATTAAGGAAAAATATTG
CTTACCTCTTGGAACACTTAGCCATCGAAGAAAATGATATATTTTTAATTCTAGGTGATGGTGAACTTTTTAGATAT
TGTAAGGATAAATATTCTAAAGATTTACGGTATATATTTATGGGGAAAGTTGAATGCCCTCTTGAATATTATCAATT
ATCAGATATTTTTGTTTCCGCTTCTTTATCGGAAGGGCTCCCCTTGGCACTATTAGAAGCTGCCTCTACTGGGTGCT
ATTTATATGTTAGCGATATAGAGCCCCATAGAGAAATTGCATCTCTATTAGGAGAGGAAAATATTTCTATGTTTAAA
ATTAAGGATGGATCATATAATTATTTGCAACCTAAAATAAAAAAAGCTGACTATAACGCTCTTTCTGACGATAAACT
TTACAATATATCCGATAAAAAAATGTCAAATCTTTATGACAAACTTTTTGTTTCTTTATTAGAGCAGAGGCACTAAT
ATAATGATTTATGTTTCGGTAATTTCTCATGGTCATTTCAAAACTCTTAAGGAATTAGGAGCAGTATCAAAATTAAA
TAATCACAGCAGAATTAAAGTTATCATCAAAGATAATTTAGGAGAGAGCGAGCTTTTGGATTTTTGTCAGGAAAACA
AAATAACTTATTTAAGGTCTAAAGAGAAAAAAGGATTTGGAGAGAATAATAATGAAGTTTTTTCCTCTATATCCTCC
TTAATTACTAAGGAAGATTTTTTTGTGGTTATGAATCCTGATATATATATTGAGTGCTCTGATCTATTAGATGTCGT
AGATGAGTGTGGTTCAGCGAATGTTAATCTAGCAACGATAAATTTATACAGGGATTTTGATAAAAAAACATATGATA

ACTCAGTAAGGAAATTTCCCTCGGCAATTGATTTTTTTATGTCATTTTTATTTAAGAAAAATGACTGTGTAGTAAAT
AAGAACAAAATAACGAAACCAACATATGTTGATTGGGCTGCAGGTTCTTTTCTAATATTTAATGCCTTCTTTTATTC
AAAACTCAACGGATTCAACGAAAAGTATTTTATGTATTGCGAAGATATTGATATATGTTGGCGAGCTAAAAAACACT
TCAATACTTCAGTTTTATACTATCCATGCTATGCAGCAATTCATTTGGCACAATTTAACAATCGTAGGATTTTTAGT
AGACATTTCATTTGGCATATAAAAAGTATTATCCTTTTTTTATTATATAAAAATGGTATGCTGCGTTCTAGTAAGTT
GCTTTAATGCTAATATTCTTTTAAGAGGTGAGAATGATACCTGTTATTTTGGCTGGTGGTTCGGGAAGTCGCTTGTG
GCCACTTTCACGAGAAAAGTTCCCCAAGCAGTTTTTAAAGTTGACTGGCAGTTTGACAATGTTGCAGTCAACATTGT
CACGTCTTAATAATTTAAATGCTGATGATTCAATAGTTATATGCAACGAAGAGCATAGATTTATTGTTGCAGAACAA
TTAAGAGAGTTAGGCAAACTTTCAAATAACATTATTCTTGAACCCAAAGGTCGTAATACAGCCCCTGCTATAACACT
CGCAGCATTAGCAGCAAAAAGAAAATTCGCTGATGAAGATCCATTGATTCTTATTTTAGCTGCAGATCACAACATCC
AAGACGAACATGTTTTCTGTGAGGCAATTAATAAGGCGTCATCTTTAGCTAGTTATGGAAAACTAGTGACTTTTGGT
ATCGTTCCATTCAAACCTGAAACTGGGTATGGCTATATTCGTCGCGGTGATGAAGTGCCTGTAGATGAGCAGCATGC
GGTGGCCTTTGAAGTGGCGCAGTTTGTCGAAAAACCGAATCTGGAAACCGCGCAGGCCTATGTGGCAAGCGGCGAAT
ATTACTGGAACAGCGGTATGTTCCTGTTCCGTGCCGGACGCTATCTCGAAGAACTGAAAAAGTATCGTCCGGATATT
CTCGATGCCTGTGAAAAAGCGATGAGCGCCGTCGATCCGGATCTCGATTTTATTCGTGTGGATGAAGAGGCGTTTCT
CGCTTGTCCGGAAGAGTCGGTGGATTACGCGGTCATGGAATGCACGGCAGATGCCGTTGTGGTGCCGATGGATGCGG
GCTGGAGCGATGTCGGTTCCTGGTCTTCATTATGGGAGATCAGCGCCCACACCGCCGAGGGCAACGTTTGCCACGGC
GATGTGATTAATCACAAAACTGAAAACAGCTATGTGTACGCCGAATCTGGCCTGGTCACCACCGTCGGGGTGAAAGA
TTTGGTGGTAGTGCAGACCAAAGATGCAGTGCTGATTGCCGACCGTAATGCGGTGCAGGATGTGAAGAAAGTGGTCG
AGCAGATCAAAGCTGATGGTCGCCATGAGCATCGGGTGCATCGCGAAGTGTATCGTCCGTGGGGCAAATATGACTCT
ATCGACGCGGGCGACCGCTACCAGGTGAAACGCATCACCGTGAAACCGGGCGAAGGTTTGTCGGTACAGATGCATTA
TCATCGCGCGGAACACTGGGTGGTTGTCGCGGGAACGGCAAAAGTCACTATCAACGGTGATATCAAACTGCTTGGTG
AAAACGAGTCCATTTATATTCCGCTGGGGGCGATGCACTGCCTGGAAAACCCGGGGAAAATAGATTTAGAATTAATT
GAAGTTCGCTCTGGTGCATATCTTGAAGAAGATGATGTTATTAGATGTTATGATCGCTATGGACGAAAGTAATATAT
AATAATTATTTCAGAATTAGAAATGATAATTATAAGTTTTCGTCTGGATAAACAATAGATAGTATGGGTTGGAAAAT
ATGAGTTCTTTAACTTGTTTTAAAGCTTACGACATTCGCGGGAAATTAGGTGAAGAACTGAATGAAGATATCGCCTG
GCGCATTGGTCGCGCCTATGGCGAATTTCTCAAACCGAAAACCATTGTGTTAGGCGGTGATGTCCGTCTCACCAGCG
AAACCTTAAAACTGGCGCTGGCAAAAGGTTTACAGGATGCGGGCGTCGATGTGCTGGATATTGGCATGTCCGGCACC
GAAGAGATTTATTTCGCCACGTTCCATCTCGGCGTGGATGGCGGCATTGAAGTTACCGCCAGCCATAATCCGATGGA
TTACAACGGCATGAAGCTGGTGCGCGAAGGGGCTCGCCCGATCAGCGGTGATACCGGACTGCGCGACGTCCAGCGTC
TGGCAGAAGCTAACGACTTTCCTCCCGTCGATGAAACCAAACGCGGTCGCTATCAGCAAATCAATCTGCGTGACGCT
TACGTTGATCACCTGTTCGGTTATATCAATGTCAAAAACCTTACGCCGCTCAAGCTGGTGATCAACTCCGGGAATGG
CGCAGCGGGTCCGGTGGTGGACGCTATCGAAGCCCGCTTTAAAGCCCTCGGCGCACCGGTGGAGTTAATCAAAGTGC
ATAACACGCCGGACGGCAATTTCCCCAACGGTATTCCTAACCCGTTGCTGCCGGAATGTCGCGACGACACCCGCAAT
GCGGTCATCAAACACGGCGCGGATATGGGCATTGCCTTTGATGGCGATTTTGACCGCTGTTTCCTGTTTGACGAAAA
AGGGCAGTTTATTGAGGGCTACTACATTGTCGGCCTGCTGGCAGAAGCGTTCCTCGAAAAAAATCCCGGCGCGAAGA
TCATCCACGATCCACGTCTCTCCTGGAACACCATTGATGTGGTGACGGCCGCGGGCGGCACGCCGGTGATGTCGAAA
ACAGGACACGCCTTTATTAAAGAACGTATGCGCAAGGAAGACGCCATCTACGGTGGCGAAATGAGCGCTCACCATTA
CTTCCGCGATTTCGCTTACTGTGACAGCGGCATGATCCCGTGGCTGCTGGTCGCCGAACTGGTGTGCCTGAAAGGAA

AAACGCTGGGCGAACTGGTGCGCGACCGGATGGCGGCGTTTCCGGCAAGCGGTGAGATCAACAGAAAACTGGCGCAC
CCTGTTGAGGCGATTAACCGCGTGGAACAGCATTTTAGCCGTGAGGTGCTGGCGGTGGATCGCACCGATGGCATCAG
CATGACCTTTGCCGACTGGCGCTTTAACCTGCGCTCTTCCAACACCGAACCGGTGGTGCGCCTGAATGTGGAATCTC
GCGGTGATGTTCAGGTTATGGTAATCCATACTCAAGAAATATTATCAATTTTGACGTCATAAAGAATAAGCCCTGAC
AAGTTAGGGCTTAATTAATATATATTTTTTTTGAATTGGGGATTTGTGGTAAGATTTTTAATATGTTATTTAATGTG
GTTGAATTAATGTTGACTGGAAAATAATAATGAGAACGAAAAAAGCATTACACAACTTTAAAGTTGATTTATTAATT
ACTTTTTTATTGGTTTTGCTAGGGTTTTATATTCGAACTGTTTTTGTTTCAAAAATGGGAAGTGATATTACTGGAGT
GATGTTACTATTCACACAGTTGACAGCATATCTCAATTTGGCAGAATTAGGTATTGGAATTGCAGCTGCCAGCGTAT
TATATAAACCGCTCAGCGAGAATGAATACAATAAAATAACTTACATAATATCTTTGCTCTCAGTCATATACAAATAT
ATATTTGTGTTTGTTTTGATTCTTGGCGTTGTTATAGGTATCTGTATTTATTACTTTATTGATTCTGTAAAGGTTGT
AAATGGCGTTTTTTTATATTGGGCTTTGTTCGTTTTTAATACATCGTTGACATATAGTTATGCTAAATACTCCACAT
TATTAACTGCTAATCAGCGGTACTCAGCAGTAAGAAAAATTCAAGGTGGCGGAAAAGTTATAATAATTGTATTTCAG
ATATTAATTTTGTGCTTTACGCAAAGTTTCATACTTTATTTGTTAGTTGAGACTTTAGGTATTTTTTCTCAATATTT
GATTTTTAAAAAAATAATTGGGAACGGAAATCAATATCTCAGTAATGAGGTTTTACTTATTGAAAGCGATAAACTTT
TGATAAAAAAAGAATTAAAAATAAGAATAAAAAATATGTTCTTCCATAAAATAGGTGCTGTGCTTGTCCTTAATACA
GACTACCTGCTTGTATCAAAGTTTCTGACATTAAGTTATGTGACAATTTTTGGCAGCTATATGATGGTATTTCAGAT
AGTAACTGTTTTGATGTCAAGTTTTGTTAATGCTATTACTGCAGGAATGGGTAATTACTTAATTAATAAAAGTAATT
TAGAAATTAAGGAAATTACACGTCAATTTTATGTGATATTTATCGCCTTTGCAACATTCATATCACTAAATATGTTT
TTTCTTGTTAATGATTTTATCGCAAAATGGATAGGTGTTAATTATACATTAAGTAACACCCTAGTTGCATTAATGAT
TGTTAACGTATTCATTAGTGTTGTCAGGGTACCTTCTGATATATTAAAAAACGCAAGTGGACATTTTGGTGATATTT
ATTATCCATTATTAGAAGGTGTGCTGAATATTACGATATCCATCATTTTGGCTATCATTATTGGATTACCTGGCATT
ATTATAGGGACAATAGTATCTAACTTAATAGTAATAATGCTTGCGAAACCATTATATCTTTACTCTAAGTTATTTAA
TCTTAGAAATCCGACGAGGGTTTATTTTGAATTTATTTCTCGGCCTATGTTATATTCATTATGTGTGATTGGGGTGA
GCTATTTATTGCGCGATGAAATATATTCATTTAAAGTAAGTACATGGTTGGATTTTATTAACAAGCTACTCTTAGTC
TCTACTCCTAGCATATTGGTAATATGTGCTATTTTCTCTACGGATAGTGACTTTAGATTATTTTTCAGAAAAATTAT
ATATGTGATTATGAAGAAATAAAAATTTCGAAAATGTATTAATCGAAATTATGCAACGAGCTTTATTTTTATAAATG
ATATGTGATCTTTTCGCGAATAGGAGTAAGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAG
AATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGGATAAAGCCGTAAGCATATAAGCATGGATAAGCTA
TTTATACTTTAATAAGTACTTTGTATACTTATTTGCGAACATTCCAGGCCGCGAGCATTCAGCGCGGTGATCACACC
TGACAGGAGTATGTAATGTCCAAGCAACAGATCGGCGTAGTCGGTATGGCAGTGATGGGACGCAACCTTGCGCTCAA
CATCGAAAGCCGTGGTTATACCGTCTCTATTTTCAACCGTTCCCGTGAGAAGACGGAAGAAGTGATTGCCGAAAATC
CAGGCAAGAAACTGGTTCCTTACTATACGGTGAAAGAGTTTGTCGAATCTCTGGAAACGCCTCGTCGCATCCTGTTA
ATGGTGAAAGCAGGTGCAGGCACGGATGCTGCTATTGATTCCCTCAAACCATATCTCGATAAAGGAGACATCATCAT
TGATGGTGGTAACACCTTCTTCCAGGACACTATTCGTCGTAATCGTGAGCTTTCAGCAGAGGGCTTTAACTTCATCG
GTACCGGTGTTTCTGGCGGTGAAGAGGGGGCGCTGAAAGGTCCTTCTATTATGCCTGGTGGCCAGAAAGAAGCCTAT
GAATTGGTAGCACCGATCCTGACCAAAATCGCCGCCGTAGCTGAAGACGGTGAACCATGCGTTACCTATATTGGTGC
CGATGGCGCAGGTCACTATGTGAAGATGGTTCACAACGGTATTGAATACGGCGATATGCAGCTGATTGCTGAAGCCT
ATTCTCTGCTTAAAGGTGGCCTGAACCTCACCAACGAAGAACTGGCGCAGACCTTTACCGAGTGGAATAACGGTGAA
CTGAGCAGTTACCTGATCGACATCACCAAAGATATCTTCACCAAAAAAGATGAAGACGGTAACTACCTGGTTGATGT

GATCCTGGATGAAGCGGCTAACAAAGGTACCGGTAAATGGACCAGCCAGAGCGCGCTGGATCTCGGCGAACCGCTGT
CGCTGATTACCGAGTCTGTGTTTGCACGTTATATCTCTTCTCTGAAAGATCAGCGTGTTGCCGCATCTAAAGTTCTC
TCTGGTCCGCAAGCACAGCCAGCAGGCGACAAGGCTGAGTTCATCGAAAAAGTTCGTCGTGCGCTGTATCTGGGCAA
AATCGTTTCTTACGCCCAGGGCTTCTCTCAGCTGCGTGCTGCGTCTGAAGAGTACAACTGGGATCTGAACTACGGCG
AAATCGCGAAGATTTTCCGTGCTGGCTGCATCATCCGTGCGCAGTTCCTGCAGAAAATCACCGATGCTTATGCCGAA
AATCCACAGATCGCTAACCTGTTGCTGGCTCCGTACTTCAAGCAAATTGCCGATGACTACCAGCAGGCGCTGCGTGA
TGTCGTTGCTTATGCAGTACAGAACGGTATTCCGGTTCCGACCTTCTCCGCAGCGGTTGCCTATTACGACAGCTACC
GTGCTGCTGTTCTGCCTGCGAACCTGATCCAGGCACAGCGTGACTATTTTGGTGCGCATACTTATAAGCGTATTGAT
AAAGAAGGTGTGTTCCATACCGAATGGCTGGATTAA

[0904] SEQ ID NO:20(CRM197序列实例)

[0905] GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDN
ENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSS
VEYINNWEQAKALSVELEINFETRGKRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEH
GPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKT
TAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNR
PAYSPGHKTQPFLHDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNKSKTHISVNG
RKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNGVHANLHVAFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDHTKVNSKLSLFF
EIKS

[0906] 本文所述的实施例旨在仅是示例性的,并且本领域技术人员将认识到或仅使用常规实验就能够确定本文所述的具体程序的许多等效方案。所有这类等效方案均被认为在本发明的范围内并且由以下权利要求书涵盖。

[0907] 本文引用的所有参考文献(包括专利申请、专利和出版物)均通过引用以其全文并入本文,并且其程度正如出于所有目的将每个单独的出版物或专利或专利申请具体地且单独地指明出于所有目的通过引用以其全文而并入。

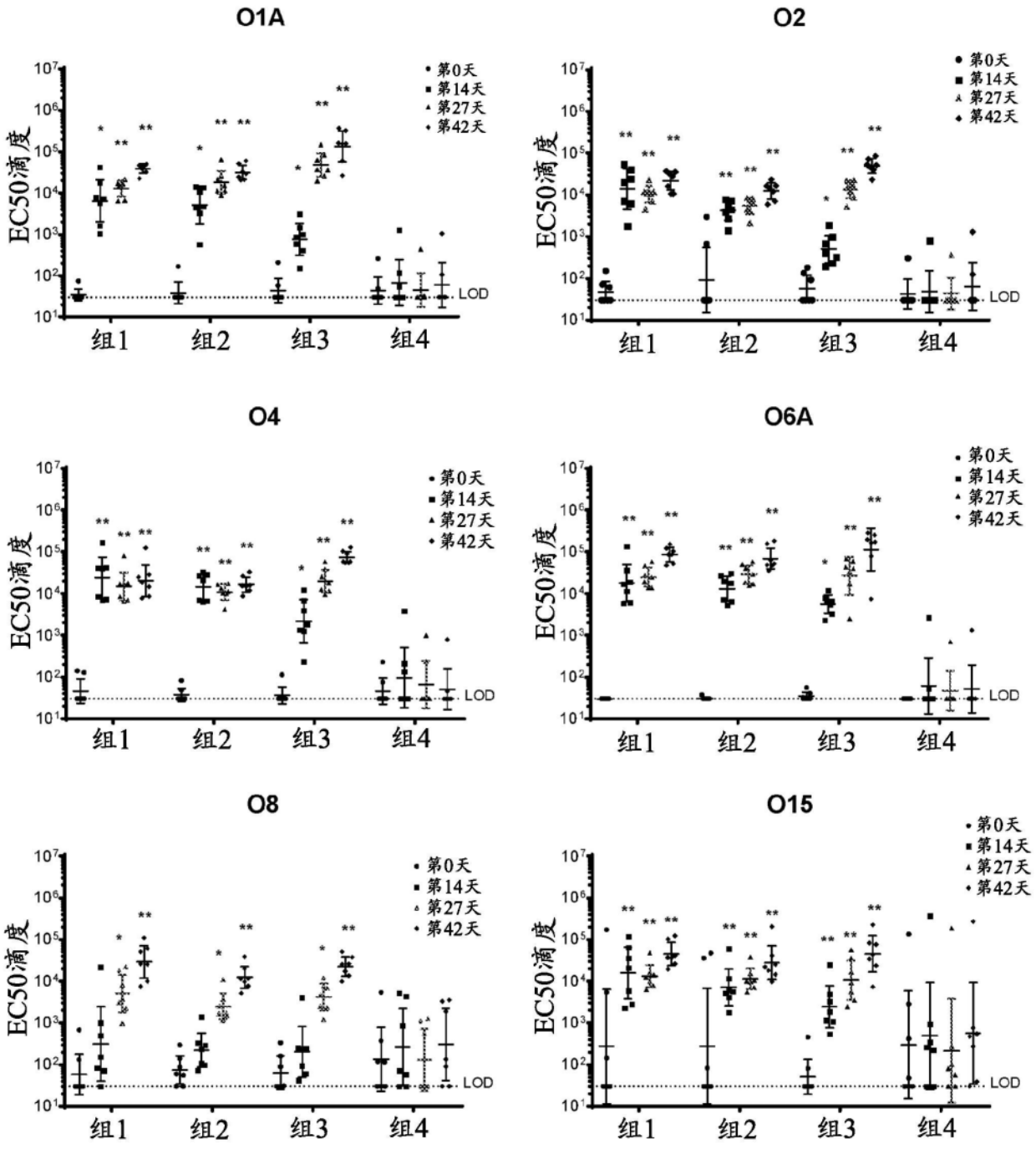


图1

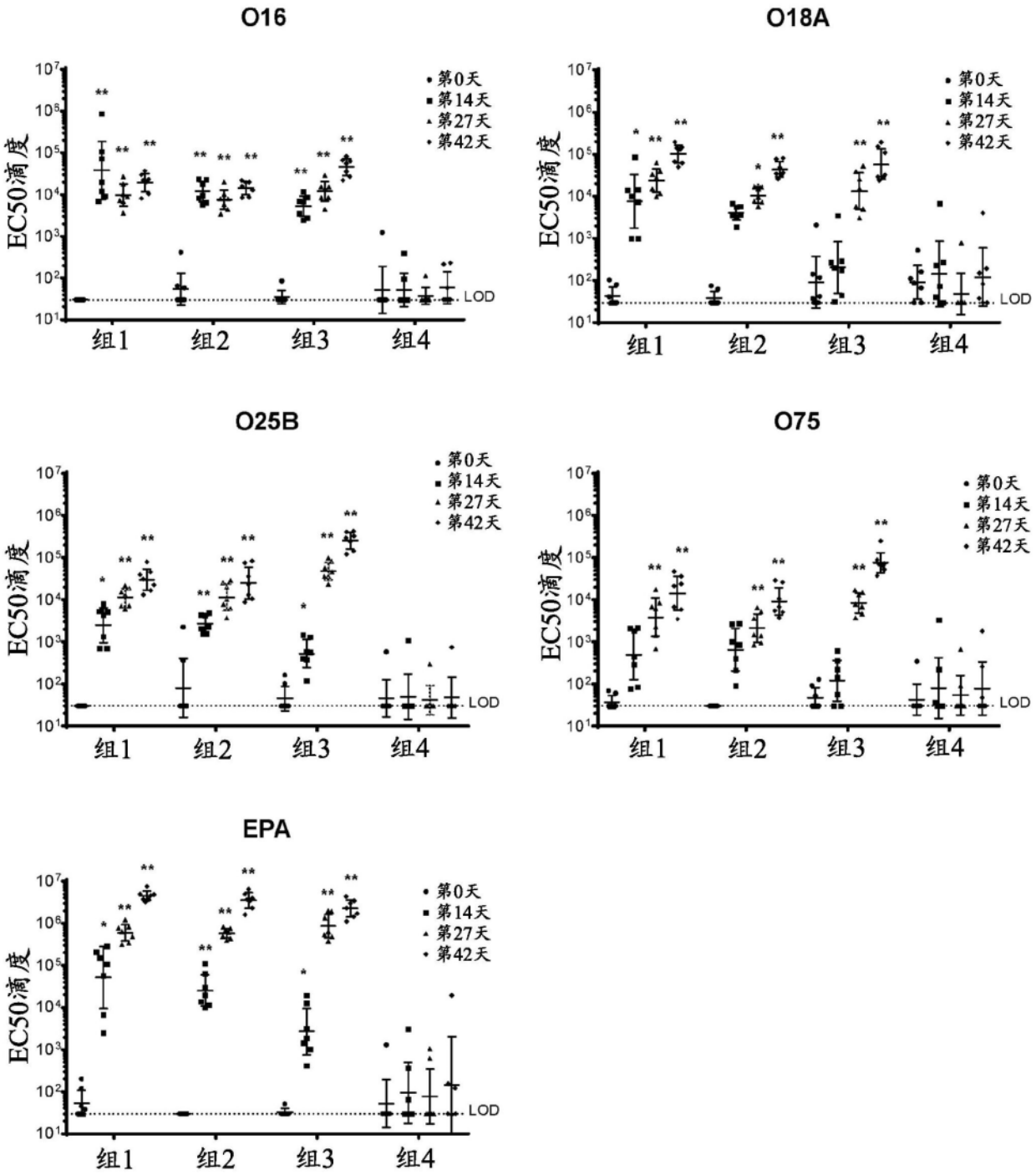


图1续

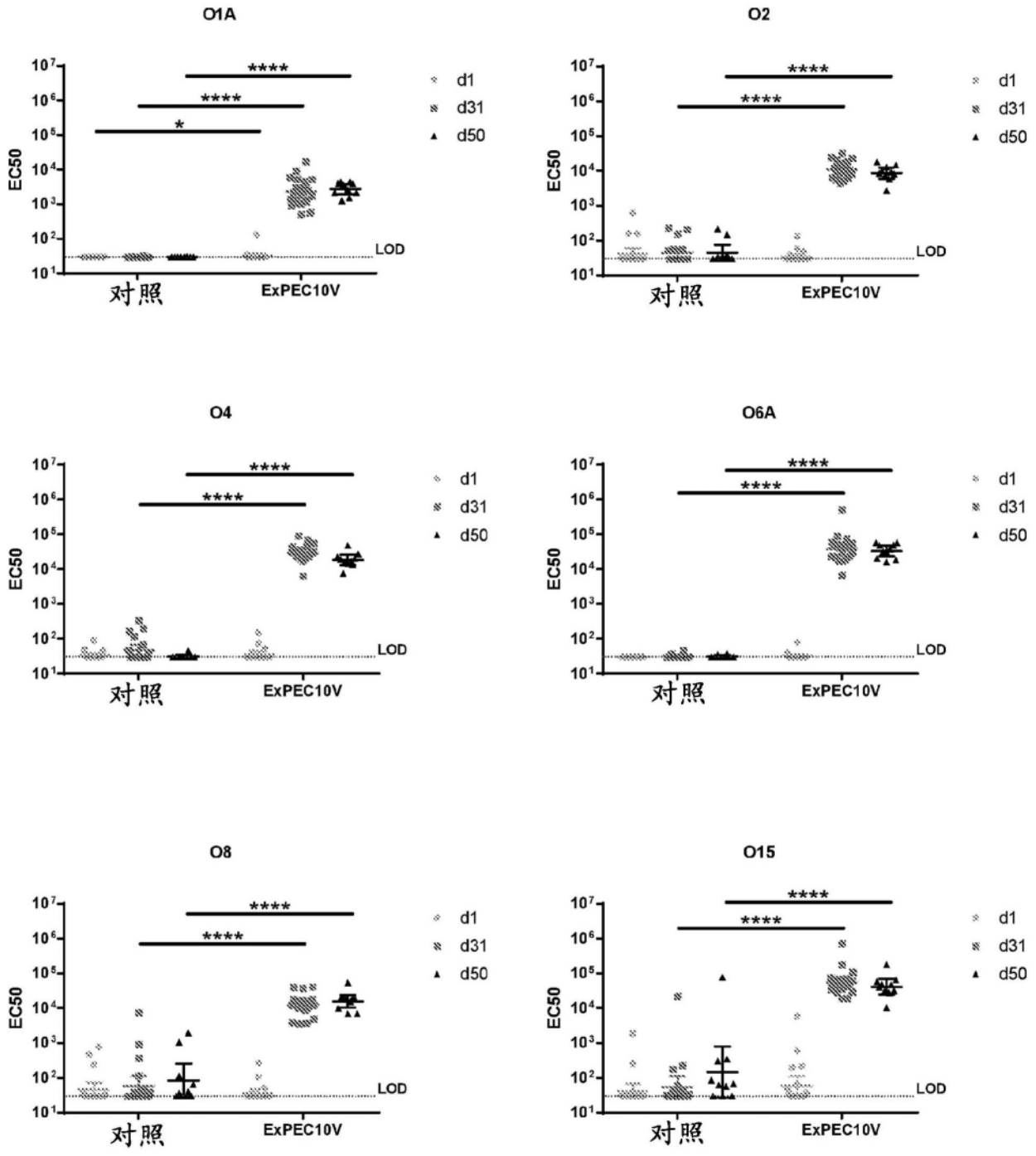


图2

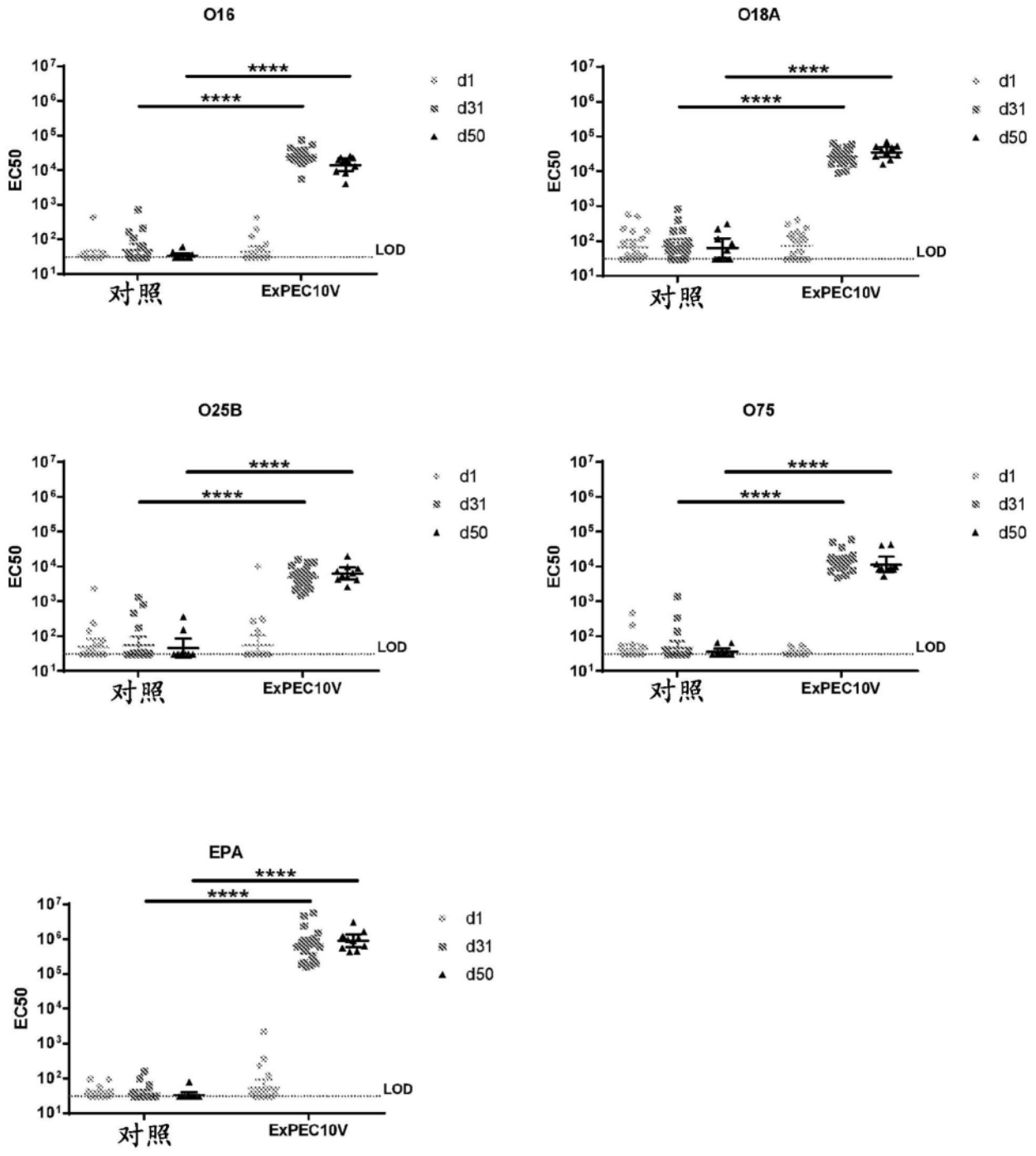


图2续

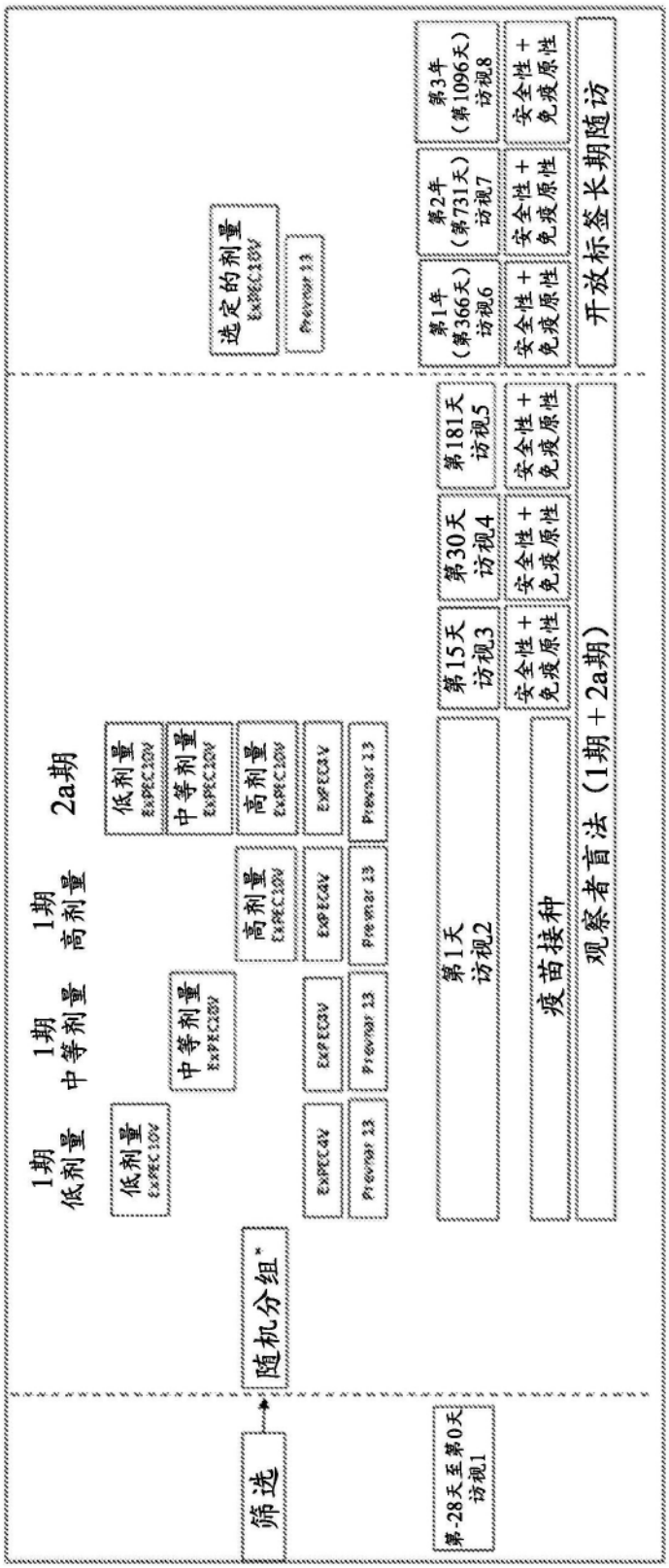

筛选
第-28天至第0天
访视1
随机分组*
1期
低剂量
1期
中等剂量
1期
高剂量
2a期
低剂量
中等剂量
高剂量
低剂量
中等剂量
高剂量
ExPEC10V
ExPEC4V
ExPEC3V
ExPEC2V
Prevnar 13
第1天
访视2
疫苗接种
观察者盲法（1期＋2a期）
第15天
访视3
第30天
访视4
第181天
访视5
安全性＋
免疫原性
选定的剂量
第1年
（第366天）
访视6
第2年
（第731天）
访视7
第3年
（第1096天）
访视8
开放标签长期随访

图3A

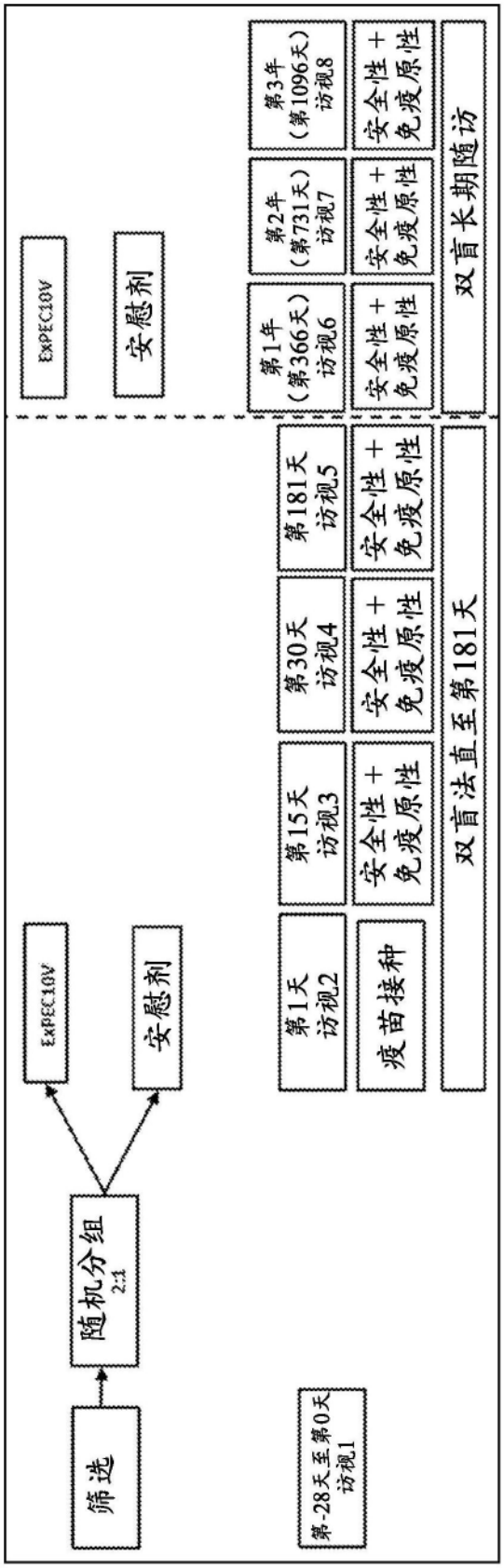

筛选
随机分组
2:1
ExPEC10V
安慰剂
ExPEC10V
安慰剂
第-28天至第0天
访视1
第1天
访视2
疫苗接种
第15天
访视3
安全性 +
免疫原性
第30天
访视4
安全性 +
免疫原性
第181天
访视5
安全性 +
免疫原性
双盲法直至第181天
第1年
（第366天）
访视6
安全性 +
免疫原性
第2年
（第731天）
访视7
安全性 +
免疫原性
第3年
（第1096天）
访视8
安全性 +
免疫原性
双盲长期随访

图3B

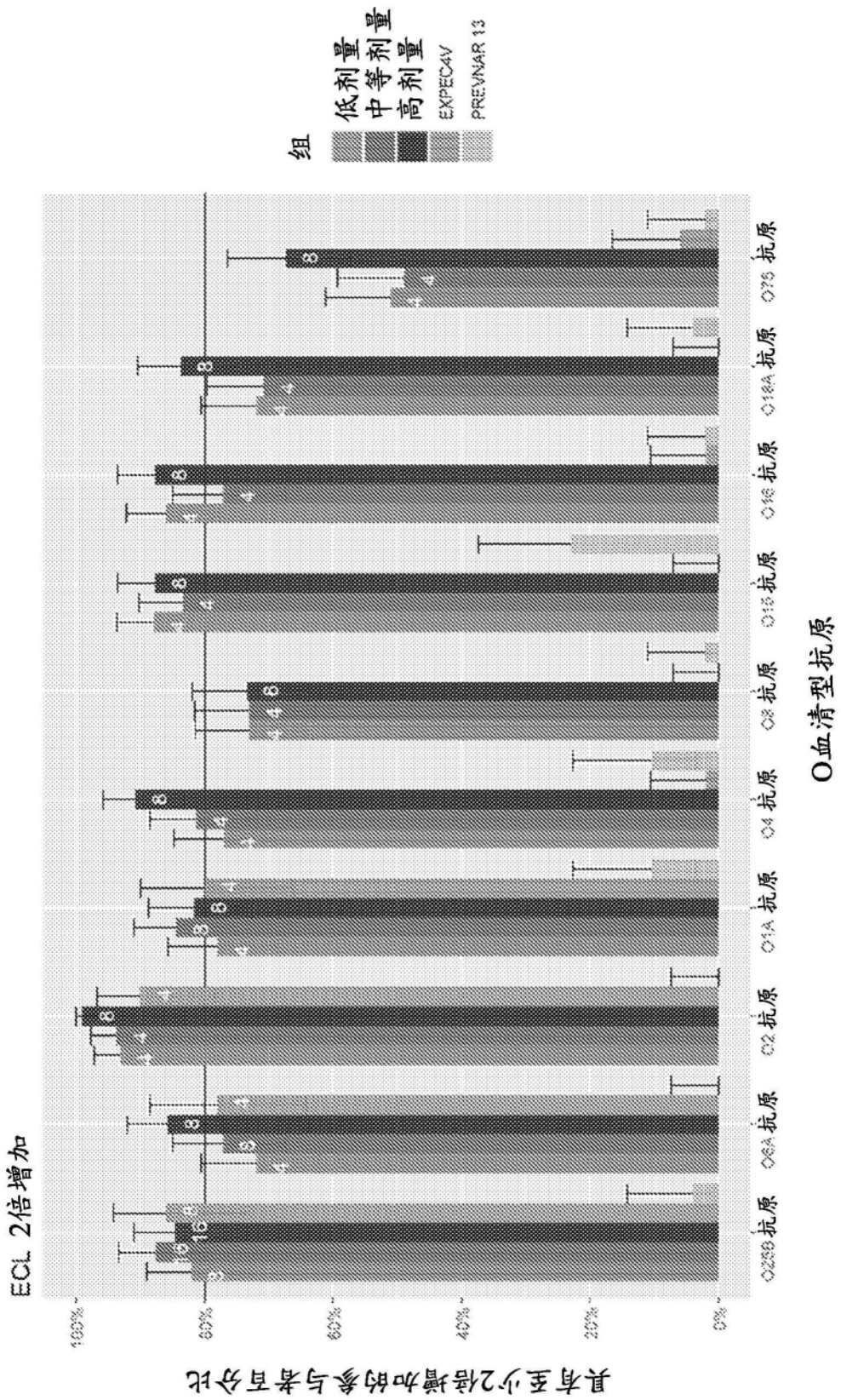

ECL 2倍增加
具有至少2倍增加的参与者百分比
100%
80%
60%
40%
20%
0%
O23B抗原
O6A抗原
O2抗原
O1A抗原
O4抗原
O8抗原
O15抗原
O18抗原
O16A抗原
O75抗原
O血清型抗原
组
低剂量
中等剂量
高剂量
EXPEC4V
PREVNAR 13

图4

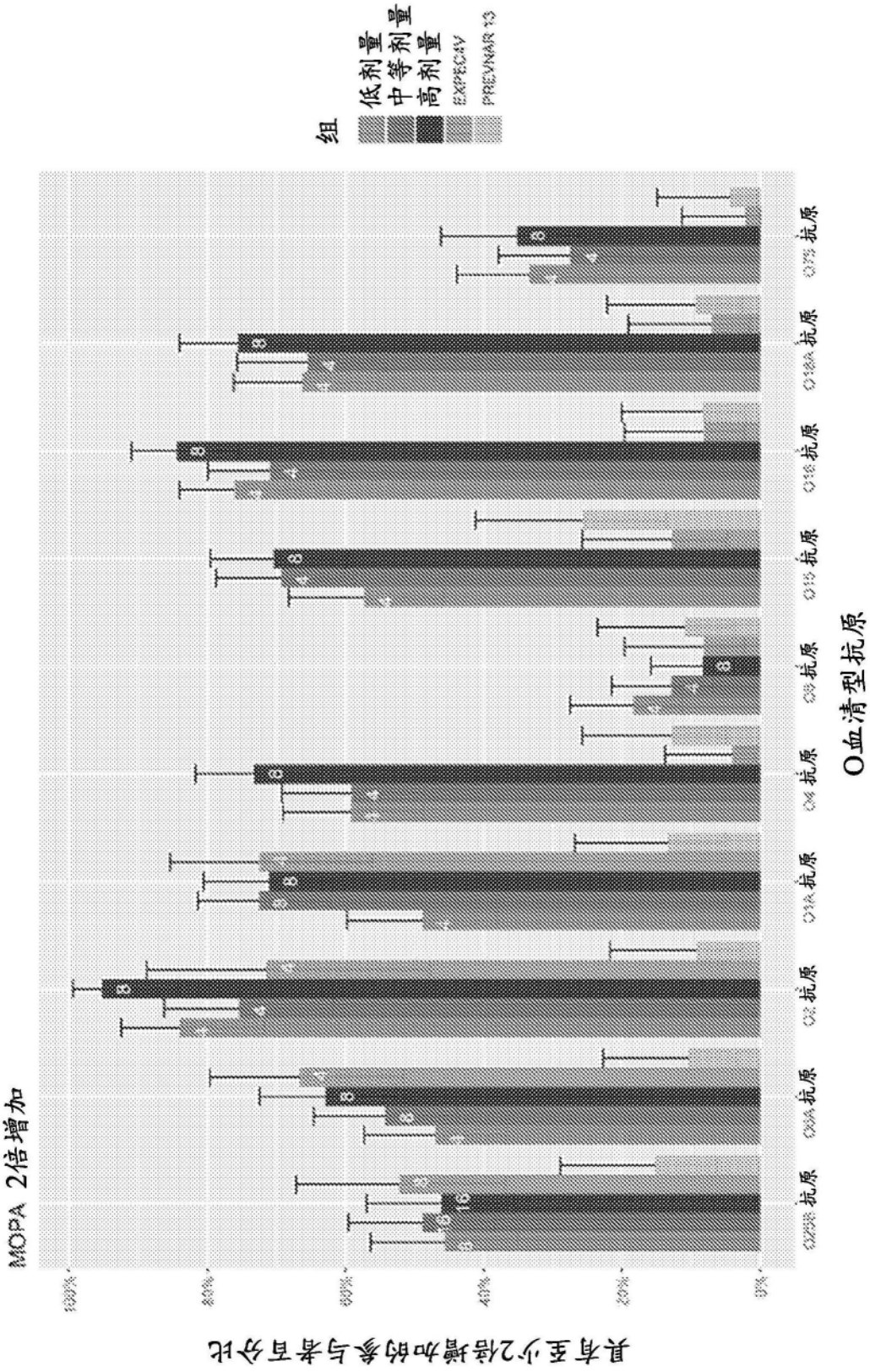

MOPA 2倍增加
O血清型抗原
组
低剂量
中等剂量
高剂量
EXPECAV
PREVNAR 13
O25B 抗原
O6A 抗原
O2 抗原
O1A 抗原
O4 抗原
O8 抗原
O15 抗原
O16 抗原
O18A 抗原
O75 抗原
100%
80%
60%
40%
20%
0%
具有至少2倍增加的象与者百分比

图5

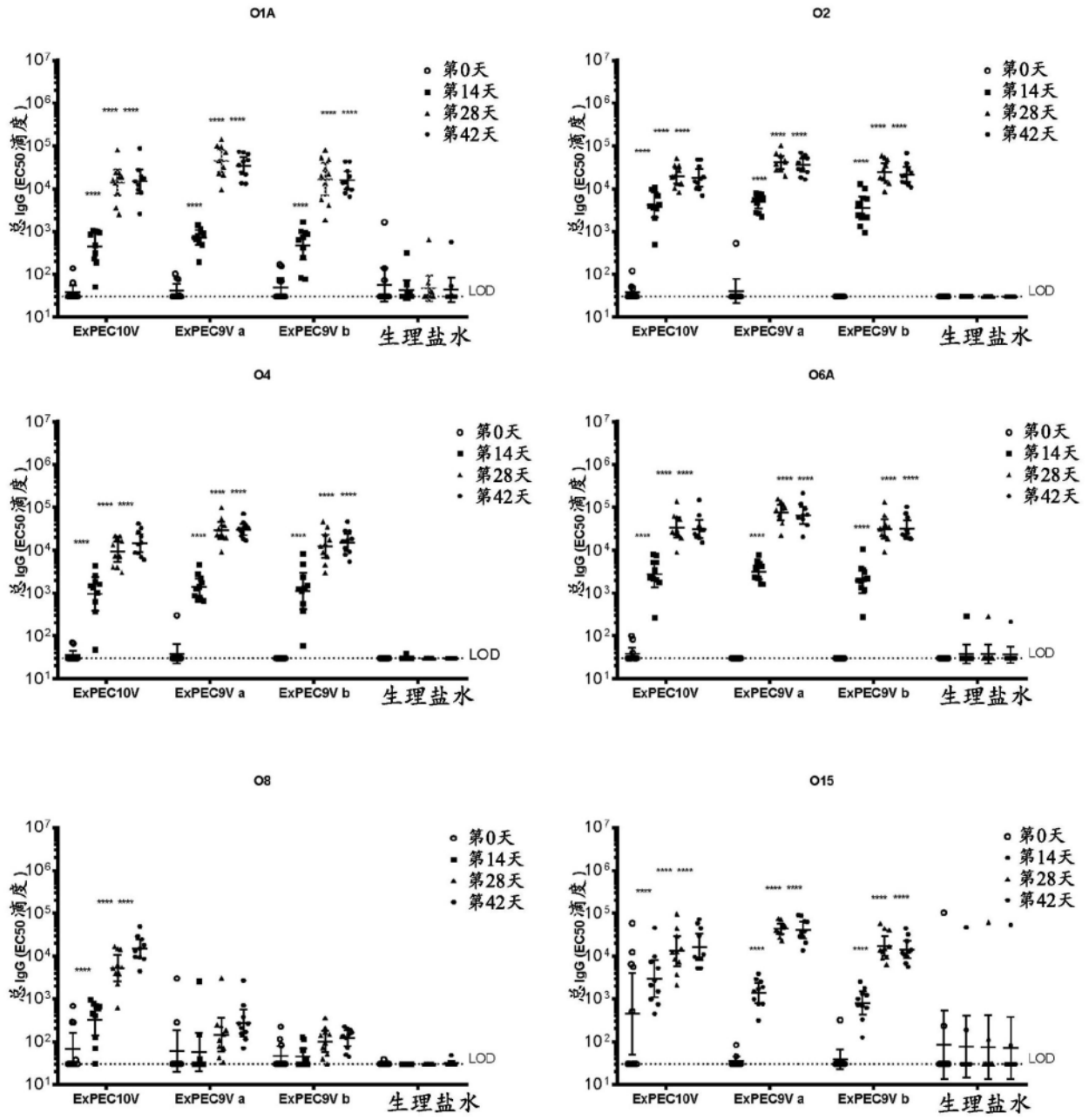

O1A
O2
O4
O6A
O8
O15
总 IgG (EC50 滴度)
第0天
第14天
第28天
第42天
LOD
ExPEC10V
ExPEC9V a
ExPEC9V b
生理盐水

图6

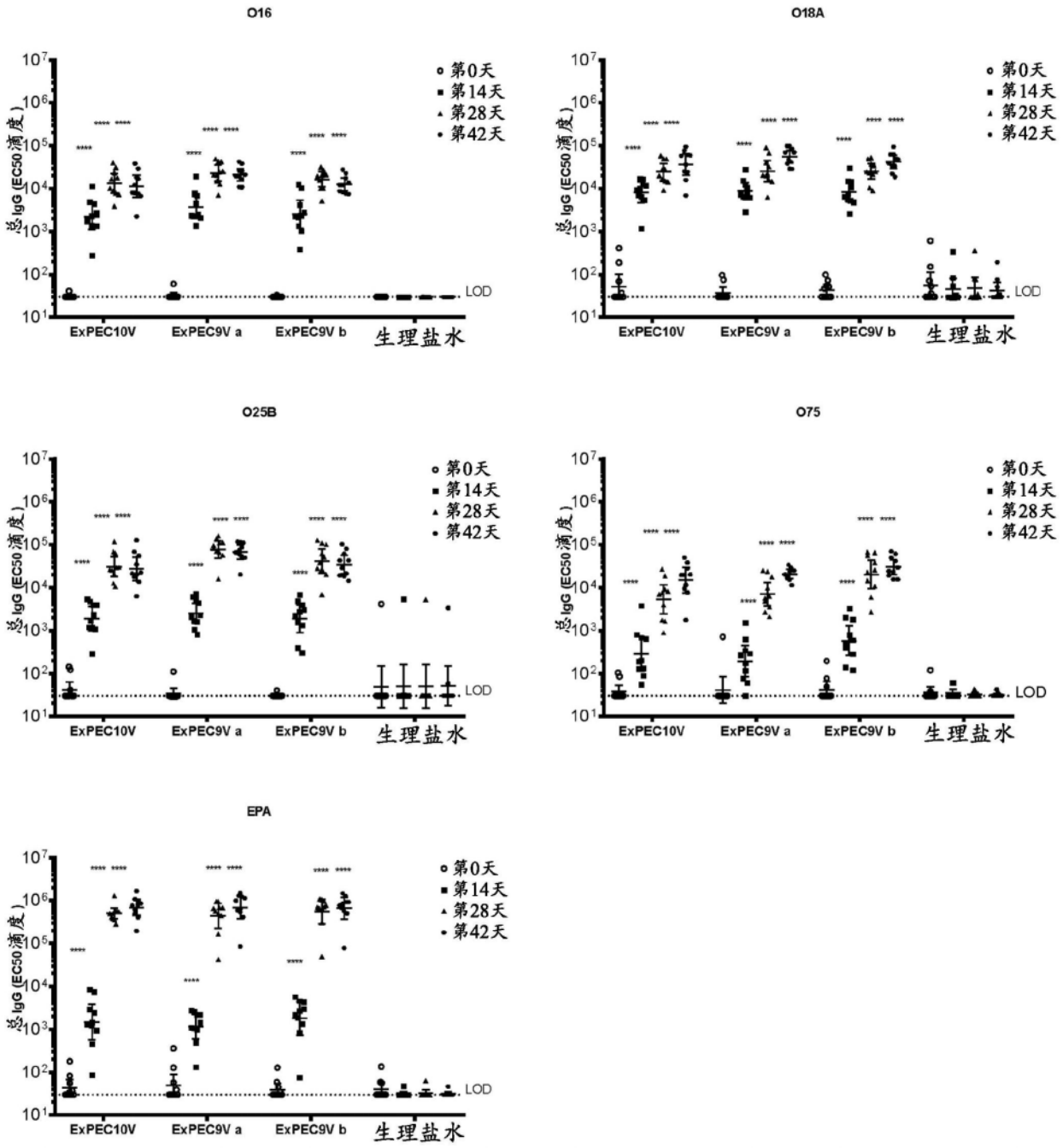

O16
O18A
O25B
O75
EPA
总IgG (EC50滴度)
第0天
第14天
第28天
第42天
LOD
ExPEC10V
ExPEC9V a
ExPEC9V b
生理盐水

图6续