

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091690 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.11.27

(51) Int. Cl. A61K 39/085 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.02.12

(54) ИММУНОГЕННАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ СТАФИЛОКОККОВЫЕ
АНТИГЕНЫ

(31) 1802339.0

(32) 2018.02.13

(33) GB

(86) PCT/EP2019/053463

(87) WO 2019/158537 2019.08.22

(71) Заявитель:
ГЛАКСОСМИТКЛАЙН
БАЙОЛОДЖИКАЛС СА (BE)

(72) Изобретатель:

Баньоли Фабио (IT), Гораж Карин
(BE)

(74) Представитель:

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

(57) Согласно изобретению предложена иммуногенная композиция, содержащая стафилококковые антигены, содержащие белковые антигены и конъюгаты капсульных полисахаридов, в частности, Hla, ClfA, SpA и конъюгаты капсульных полисахаридов. Также предложены адъювантные препараты. Данное изобретение может находить применение в предупреждении и лечении стафилококковых инфекций, в частности инфекции и заболевания, вызванного *S. aureus*.

A1

202091690

202091690

A1

PCT/EP2019/053463

МПК:

A61K 39/085 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)

ИММУНОГЕННАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ СТАФИЛОКОККОВЫЕ АНТИГЕНЫ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение относится к иммуногенным композициям для предупреждения и лечения стафилококковой инфекции и заболевания, в частности, инфекции и заболевания, вызванных *S. aureus*. Согласно изобретению предложена иммуногенная композиция, содержащая стафилококковые антигены, в частности, Hla, ClfA, SpA и конъюгаты капсульных полисахаридов. Также предложены адъювантные композиции, а также применения таких композиций в предупреждении и лечении стафилококковых инфекций.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

S. aureus представляет собой грамположительную сферическую бактерию, которая является ведущей причиной инфекций кровотока, нижних дыхательных путей, кожи и мягких тканей в США и Европе. Она также является преобладающей причиной инфекций костей во всем мире, и данные инфекции являются болезненными, ослабляющими и сложными для лечения.

Лечение против *S. aureus* становится все более и более сложным из-за развития устойчивости к антибиотикам многими штаммами *S. aureus*. Устойчивый к метициллину *S. aureus* (MRSA) является эндемичным в больницах, и ассоциированные с населением штаммы MRSA распространяются по всему миру, ставя важный глобальный вызов. MRSA обнаруживается при более чем половине всех инфекций населения и больничных инфекций. В последние годы наблюдали появление штаммов MRSA, которые также устойчивы к ванкомицину – антибиотику последней надежды, и которые являются по существу неизлечимыми.

В настоящее время нет разрешенной вакцины. Потребность в вакцине является особенно острой из-за проблемы с устойчивостью к антибиотикам и тем фактом, что инфекция *S. aureus* не дает иммунитет от будущей инфекции благодаря его хорошо развитым способностям к уклонению от иммунной системы. Свойства уклонения от иммунной системы *S. aureus*, в свою очередь, делают более сложной разработку эффективных вакцин. Механизмы уклонения от иммунной системы не понятны

полностью, но по меньшей мере частично обусловлены стафилококковым белком А (SpA) – поверхностной молекулой *S. aureus*, которая связывается с Fcγ иммуноглобулина (Ig) и с частью Fab рецепторов В-клеток V_H3-типа. Взаимодействие SpA с рецепторами В-клеток влияет на развитие В-клеток во время инфекции, мешая развитию адаптивного иммунного ответа. Связывание SpA с Fc Ig мешает опсонофагоцитирующему клиренсу стафилококков полиморфоядерными лейкоцитами.

Таким образом, имеется срочная потребность в вакцине для предупреждения стафилококкового заболевания. В клинических испытаниях анализировали несколько вакцин, включающих конъюгаты капсульных полисахаридов (CPS), индивидуальные белковые антигены и моноклональные антитела (mAb) к липотейхоевой кислоте. Однако все потерпели неудачу на разных стадиях разработки, и к настоящему времени на рынке нет вакцины против *S. aureus*.

Многокомпонентную вакцину, содержащую CPS, ClfA и MntC *S. aureus* (Anderson et al 2012, Hum Vaccine Immunother 8: 1585-1594) анализировали в клинических испытаниях PhI (фаза I) на человеке. Данная вакцина индуцировала в PhI опсонизирующие антитела против CP и ингибирующие антитела против ClfA, и затем была проанализирована в анализах эффективности PhIIb (фаза IIб) для профилактического применения у избранных пациентов со спондилодезом, но данное испытание PhIIb было остановлено из-за безрезультатности.

Однако до сих пор не было обнаружено вакцины против *S. aureus*, имеющей защитную эффективность в испытаниях PhIII (фаза III). Вакцину, содержащую конъюгаты капсульных полисахаридов типа 5 и типа 8 *S. aureus*, конъюгированных с экзопроотеином A *Pseudomonas* (StaphVAX – Nabi Biopharmaceuticals), анализировали в клинических испытаниях, где она продемонстрировала безопасность в PhI и II, но не смогла достигнуть требуемого ожидаемого результата в PhIII, как описано в WO 03/61558.

Аналогичным образом, вакцина на основе белка антигена IsdB (вакцина V710; Kuklin et al, Infect Immun, 2006, 74: 2215-23), не смогла соответствовать ожидаемым результатам эффективности в испытании PhIII, проведенном при кардиоторакальных инфекциях *S. aureus*.

Таким образом, существует постоянная потребность в эффективной вакцине против стафилококковой инфекции, в частности, инфекции *S. aureus*.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно настоящему изобретению предложена иммуногенная композиция, содержащая стафилококковые антигены. В одном аспекте данная иммуногенная композиция содержит два или более чем два из (а) антигена ClfA; (б) антигена Hla; (в) антигена SpA; и/или (г) стафилококкового капсульного полисахарида. Антиген ClfA, антиген Hla и антиген SpA предпочтительно представляют собой стафилококковые антигены, подходящим образом – антигены *S. aureus*.

В одном воплощении данная иммуногенная композиция содержит антиген ClfA; антиген Hla; антиген SpA; и стафилококковый капсульный полисахарид. Данный капсульный полисахарид подходящим образом может представлять собой капсульный полисахарид серотипа 5 и/или 8 *S. aureus*. В предпочтительном воплощении данная иммуногенная композиция содержит антиген ClfA; антиген Hla; антиген SpA; капсульный полисахарид из серотипа 5 *S. aureus* и капсульный полисахарид из серотипа 8 *S. aureus*.

В одном воплощении данный капсульный полисахарид конъюгирован с белком-носителем. Данный белок капсульного полисахарида может быть конъюгирован с одним из антигенов (а)-(в) выше. В предпочтительном воплощении данная композиция содержит капсульный полисахарид серотипа 5 *S. aureus*, конъюгированный с антигеном Hla, и/или капсульный полисахарид типа 8, конъюгированный с антигеном ClfA.

В одном воплощении антиген ClfA представляет собой белок ClfA, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 2, или его иммуногенный фрагмент.

Антиген ClfA может содержать по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из замены в положении P116 на S и замены в положении Y118 на A, в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 (или в эквивалентном положении в аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 2), возможно содержит любую из последовательностей SEQ ID NO: 5-7 или 32.

Антиген ClfA может содержать одну или более чем одну консенсусную последовательность, выбранную из: D/E-X-N-Z-S/T (SEQ ID NO: 28) и K-D/E-X-N-Z-S/T-K (SEQ ID NO: 29), где X и Z независимо представляют собой любую аминокислоту, отличную от пролина. Указанная консенсусная последовательность

может быть добавлена или ей может быть заменена одна или более чем одна аминокислота между аминокислотными остатками 313-342 в SEQ ID NO: 2, возможно заменяет аминокислоту в положении I337 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 2. В одном воплощении X представляет собой Q (глутамин), и Z представляет собой A (аланин) (например, K-D-Q-N-A-T-K, SEQ ID NO: 31).

В предпочтительном воплощении антиген ClfA содержит или состоит из последовательности SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 32.

В одном воплощении антиген Hla представляет собой белок Hla, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 3 или его иммуногенный фрагмент.

Антиген Hla может содержать аминокислотную замену в положении H35 SEQ ID NO: 3 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3. В одном воплощении указанная аминокислотная замена возможно представляет замену H на L.

Антиген Hla может содержать одну или более чем одну консенсусную последовательность, выбранную из: D/E-X-N-Z-S/T (SEQ ID NO: 28) и K-D/E-X-N-Z-S/T-K (SEQ ID NO: 29), где X и Z независимо представляют собой любую аминокислоту, отличную от пролина. Указанная консенсусная последовательность можно быть добавлена или ей может быть заменена одна или более чем одна аминокислота в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3 или в аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3. В одном воплощении указанная консенсусная последовательности заменяет аминокислоту в положении K131 в SEQ ID NO: 3 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3. В одном воплощении X представляет собой Q (глутамин), и Z представляет собой R (аргинин) (например, K-D-Q-N-R-T-K (SEQ ID NO: 30)).

В предпочтительном воплощении антиген Hla содержит или состоит из

последовательности SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12.

В одном воплощении антиген SpA представляет собой белок SpA, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 27, или его иммуногенный фрагмент.

Антиген SpA может содержать (а) одну или более чем одну аминокислотную замену в V_{H3} -связываемом субдомене домена E, D, A, B или C, которая нарушает или ослабляет связывание с V_{H3} , и (б) одну или более чем одну аминокислотную замену в связываемом Fc IgG субдомене домена E, D, A, B или C, которая нарушает или ослабляет связывание с Fc IgG.

В одном воплощении антиген SpA содержит (1) домен E с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 34 и 35 SEQ ID NO: 14 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 14; домен D с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 39 и 40 SEQ ID NO: 15 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 15; домен A с аминокислотной заменой в положениях 36 и 37 SEQ ID NO: 16 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 16; домен B с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 36 и 37 SEQ ID NO: 17 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 17, и/или домен C с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 36 и 37 SEQ ID NO: 18 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 18; и/или (2) содержит домен E с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 7 и 8 SEQ ID NO: 14 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 14; домен D с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 12 и 13 SEQ ID NO: 15 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%

или 99% идентичной SEQ ID NO: 15; домен А с аминокислотной заменой в положениях 9 и 10 SEQ ID NO: 16 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 16; домен В с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 9 и 10 SEQ ID NO: 17 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 17, и/или домен С с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 9 и 10 SEQ ID NO: 18 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 18. В одном воплощении указанные аминокислотные замены представляют собой замену лизина на глутамин и/или замену аланина на аспарагиновую кислоту. Типичными последовательностями являются SEQ ID NO: 19-23, 24 и 25.

В одном воплощении антиген SpA содержит домен D с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 4 и 5 SEQ ID NO: 15 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 15. Указанная аминокислотная замена подходящим образом может представлять собой замену глутамина на лизин и/или глутамина на аргинин, например, замену QQ на KR (например, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25).

В одном воплощении антиген SpA содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19-23, 26 или 27, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 19-23, 26 или 27. В предпочтительном воплощении антиген SpA содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

В одном воплощении иммуногенная композиция содержит (1) антиген ClfA, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 32; (2) антиген Hla, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12; (3) антиген SpA, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; (4) капсульный полисахарид серотипа 5 *S. aureus*, и (5) капсульный полисахарид серотипа 8 *S. aureus*. Антиген ClfA может быть конъюгирован с капсульным полисахаридом серотипа 8 *S. aureus*, и антиген Hla может быть конъюгирован с капсульным полисахаридом серотипа 5 *S. aureus*. Указанные

конъюгаты ClfA-CP8 и Hla-CP5 подходящим образом могут представлять собой биоконъюгаты.

В одном воплощении иммуногенная композиция содержит (1) антиген ClfA, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 32; (2) антиген Hla, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12; (3) антиген SpA, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; (4) капсульный полисахарид серотипа 5 *S. aureus*, конъюгированный с антигеном Hla, и (5) капсульный полисахарид серотипа 8 *S. aureus*, конъюгированный с антигеном ClfA. Предпочтительно указанные конъюгаты ClfA-CP8 и Hla-CP5 представляют собой биоконъюгаты. Данная иммуногенная композиция может дополнительно содержать адъювант, как раскрыто в данном описании.

В одном аспекте настоящего изобретения предложена вакцина, содержащая иммуногенную композицию по изобретению и фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен набор, содержащий (1) первый контейнер, содержащий иммуногенную композицию или вакцину по настоящему изобретению, и (2) второй контейнер, содержащий адъювант.

В одном аспекте настоящего изобретения предложена иммуногенная композиция или вакцина по изобретению для применения в способе предупреждения или лечения стафилококковой инфекции, например, инфекции *S. aureus*. В одном воплощении указанную иммуногенную композицию или вакцину вводят в комбинации с адъювантом.

В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенная композиция по изобретению содержит адъювант. В другом аспекте данная иммуногенная композиция предназначена для введения в комбинации с адъювантом. Данный адъювант может вводиться сопутствующе с иммуногенной композицией, например, он может быть смешан с иммуногенной композицией перед введением.

В одном воплощении данный адъювант содержит сапонин и агонист TLR4 (Толл-подобный рецептор 4), подходящим образом в липосомном образовании. В одном воплощении адъювант дополнительно содержит стерин. Данный сапонин может представлять собой фракцию иммунологически активного сапонины, полученного из коры *Quillaja saponaria* Molina, предпочтительно QS21. В одном воплощении агонист TLR4 представляет собой липополисахарид. Данный липополисахарид может

представлять собой производное липида А, предпочтительно 3D-MPL. Данный стерин может представлять собой холестерин. В одном воплощении адъювант содержит QS21 в количестве 25 мкг на человеческую дозу и/или 3D-MPL в количестве 25 мкг на человеческую дозу (например, AS01_E).

В одном аспекте в данном изобретении предложен способ предупреждения или лечения стафилококковой инфекции, например, инфекции *S. aureus*, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, иммуногенной композиции или вакцины по изобретению. Данный способ может дополнительно включать введение адъюванта указанному субъекту. Данный адъювант может вводиться сопутствующе с иммуногенной композицией, например, его можно смешивать с иммуногенной композицией перед введением.

В другом аспекте в данном изобретении предложен способ получения иммуногенной композиции или вакцины по любому из пунктов формулы изобретения, включающий стадии смешивания антигенов и, возможно, адъюванта с фармацевтически приемлемым эксципиентом.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен полинуклеотид, кодирующий антиген иммуногенной композиции по изобретению. Также предложены векторы, содержащие такой полинуклеотид. Также предложена клетка-хозяин, содержащая вектор или полинуклеотид по изобретению.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1. Специфичный для вакцины IgG у мышей. Титры антигенспецифичных IgG (против CP5 (1А), против CP8 (1Б), против H1a (1В), против ClfA (1Г) и против SpA (1Д)) у наивных мышей, иммунизированных вакциной без адъюванта и с адъювантом – Алюм/TLR7 или AS01_E. Каждый символ идентифицирует группу из 30 мышей, которых иммунизировали в сутки 1 и 29 10 мкг (незакрашенные символы) или 1 мкг (закрашенные символы) с AS01 (треугольники), Алюм/TLR7 (кружки) или без адъюванта (квадраты). Ордината: GMT (среднее геометрическое титра) с 95%-ным CI (доверительный интервал). Отборы крови осуществляли в разные моменты времени после первой и второй иммунизации. Проанализированные GMT титров IgG и моменты времени отборов крови приводятся по ординате и абсциссе соответственно. Пунктирная линия – LLOQ/2: половина нижнего предела количественного измерения. 30 индивидуальных сывороток BALB/c для каждого момента времени анализировали посредством Luminox.

Фиг. 2: величина и количество специфичных для вакцины ответов Т-клеток CD4 у мышей, индуцированных вакциной без адъюванта и с адъювантом – Алюм/TLR7 или AS01_E. Спленоциты от одиночных мышей, умерщвленных через 12 суток после второй иммунизации, стимулировали или не стимулировали белками вакцины *in vitro* (2А: SpA_{mut}, 1 мкг/мл; 2Б: Hla_{mut}, 10 мкг/мл; 2В: ClfA_{mut}, 10 мкг/мл), окрашивали и анализировали ICS (иммунохимическое окрашивание). Идентифицировали Т-клетки CD4⁺CD44^{high}, продуцирующие IL-2, TNF, IL-4/IL-13, IFN-γ или IL-17A. Верхний график: CD4⁺CD44^{high} больше или равно CYT⁺. Нижний график: CD4⁺CD44^{high} больше или равно IFN-γ. Ответ нестимулированных клеток вычитали из ответа стимулированных клеток. Величина: процентные доли Т-клеток CD4⁺CD44^{high}, продуцирующих по меньшей мере один из проанализированных цитокинов в ответ на стимуляцию белком вакцины. Качество: процентные доли Т-клеток CD4⁺CD44^{high}, продуцирующих по меньшей мере: IFN-γ, но не IL-4/IL-13. Двухфакторный ANOVA (дисперсионный анализ) % отношений среднего геометрического, показан р меньше 0,05: * вакцина (с адъювантом или без) относительно контрольной группы; * вакцина с адъювантом относительно вакцины без адъюванта; * вакцина с AS01_E относительно вакцины с алюмом/TLR7; * 10 мкг вакцины относительно 1 мкг вакцины.

Фиг. 3: специфичные для вакцины IgG у кроликов, подвергавшихся предварительному воздействию. Средние геометрические титров антител против CP5 (3А), против CP8 (3Б), против Hla (3В), против ClfA (3Г) и против SpA (3Д) у кроликов, подвергавшихся предварительному воздействию, которые получали две инъекции вакцины с адъювантом AS01_E или без него, или буфера. Pre: до дозы 1, 1wp1: 1 неделя после дозы 1, 2wp1: 2 недели после дозы 1, 4wp1: 4 недели после дозы 1, 2wp2: 2 недели после дозы 2, 4wp2: 4 недели после дозы 2, 5wp2: 5 недель после дозы 2. Пунктирная линия LLOQ2: половина нижней границы количественного измерения. Треугольники: доза 1 мкг; кружки: доза 10 мкг; квадраты: доза 50 мкг. Незакрашенные символы: без адъюванта, закрашенные символы: AS01_E. Контроль в виде буфера показан как закрашенные ромбы. Серая пунктирная линия показывает значения, обратные наименьшему разведению, использованному в данном анализе.

Фиг. 4А: вакцина индуцирует функциональные IgG, нейтрализующие *in vitro* активность Hla у мышей. Мышей (10 мышей/группу) иммунизировали вакциной в указанных дозировках без адъюванта или в присутствии либо адъюванта Алюм/TLR7,

либо AS01_E. Нейтрализующие титры объединенной сыворотки измеряли в каждый момент времени и выражали как значения медианы (красные и синие квадраты и звездочки) трех независимых исследований. Верхние и нижние значения столбика представляют максимальные и минимальные титры соответственно. Незакрашенные символы: доза 10 мкг; окрашенные символы: доза 1 мкг. Квадраты: без адъюванта; треугольники: адъювант AS01_E, кружки: адъювант Алюм/TLR7. Серая пунктирная линия показывает значения, обратные наименьшему разведению, использованному в данном анализе.

Фиг. 4Б: вакцина индуцирует функциональный IgG, нейтрализующий *in vitro* активность H1a у кроликов, подвергавшихся предварительному воздействию. Титры, нейтрализующие H1a, и проанализированные моменты времени отбора крови приводятся по ординате и абсциссе соответственно. Серая пунктирная линия показывает значения, обратные наименьшему разведению, использованному в данном анализе. Произвольный титр 3 был приписан неответающим на обработку. Треугольники: доза 1 мкг; кружки: доза 10 мкг; квадраты: доза 50 мкг. Незакрашенные символы: без адъюванта, окрашенные символы: AS01_E. Контроль в виде буфера показан как окрашенные ромбы.

Фиг. 5А: вакцина индуцирует функциональный IgG, нейтрализующий *in vitro* активность C1fA у мышей. Мышей (10 мышей/группу) иммунизировали вакциной в указанных дозировках без адъюванта или в присутствии либо адъюванта Алюм/TLR7, либо AS01_E в трех независимых экспериментах *in vivo*. Нейтрализующие титры объединенных сывороток трех экспериментов *in vivo* измеряли в каждый момент времени и выражали как значения медианы. Верхние и нижние значения столбика представляют максимальные и минимальные титры соответственно. Незакрашенные символы: доза 10 мкг; окрашенные символы: доза 1 мкг. Квадраты: без адъюванта; треугольники: адъювант AS01_E, кружки: адъювант Алюм/TLR7. Серая пунктирная линия показывает значения, обратные наименьшему разведению, использованному в данном анализе.

Фиг. 5Б: вакцина индуцирует функциональный IgG, нейтрализующий *in vitro* активность C1fA у кроликов, подвергавшихся предварительному воздействию. Нейтрализующие титры индивидуальных сывороток измеряли до вакцинации, в моменты времени 4wp1 и 2wp2. Только в момент времени 2wp2 некоторая нейтрализующая активность выражается в виде среднего геометрического

(GMT) с 95%-ми доверительными интервалами (CI). Серая пунктирная линия показывает значение, обратное наименьшему разведению, использованному в данном анализе. Произвольный титр 2 был приписан неответчающим на обработку. Треугольники: доза 10 мкг; кружки: доза 10 мкг; квадраты: доза 50 мкг. Незакрашенные символы: без адъюванта, закрашенные символы: AS01_E. Контроль в виде буфера показан в виде закрашенных ромбов.

Фиг. 6: вакцина индуцирует антитела с ОРК активностью против штаммов *S. aureus* серотипов 5 (Фиг. 6А) и 8 (Фиг. 6Б) у кроликов, подвергавшихся предварительному воздействию. Титры ОРК 12 индивидуальных сывороток измеряли до вакцинации и в момент времени 2wp2. GMT выражены с 95%-ными доверительными интервалами. Треугольники: без адъюванта. Кружки: адъювант AS01_E. Ромб: только буфер.

Фиг. 7: вакцинация увеличивает уровень антител против Hla с большей аффинностью у кроликов, подвергавшихся предварительному воздействию. Процент диссоциации антител, проанализированный в индивидуальных сыворотках до вакцинации, в моменты времени 2wp1 и в 2wp2. GMT выражены с 95%-ными доверительными интервалами. Треугольники: без адъюванта. Кружки: адъювант AS01_E. Ромб: только буфер.

Фиг. 8: вакцинация увеличивает уровень антител против SpA_{int} с большей аффинностью у кроликов, подвергавшихся предварительному воздействию. Процент диссоциации антител, проанализированный в индивидуальных сыворотках до вакцинации, в моменты времени 2wp1 и в 2wp2. GMT выражены с 95%-ными доверительными интервалами. Треугольники: без адъюванта. Кружки: адъювант AS01_E. Ромб: только буфер.

Фиг. 9: вакцинация увеличивает уровень антител против ClfA с большей аффинностью у кроликов, подвергавшихся предварительному воздействию. Процент диссоциации антител, проанализированный в индивидуальной сыворотке до вакцинации, в моменты времени 2wp1 и в 2wp2. GMT выражены с 95%-ными доверительными интервалами. Треугольники: без адъюванта. Кружки: адъювант AS01_E. Ромб: только буфер.

Фиг. 10: вакцинация увеличивает уровень антител против CP5 с большей аффинностью у кроликов, подвергавшихся предварительному воздействию. Процент диссоциации антител, проанализированный в индивидуальной сыворотке до

вакцинации, в моменты 2wp1 и в 2wp2. GMT выражены с 95%-ными доверительными интервалами. Треугольники: без адъюванта. Круги: адъювант AS01_E. Ромб: только буфер.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Терминология

Белок-носитель: белок, ковалентно присоединенный к антигену (например, сахаридному антигену), для создания конъюгата (например, биоконъюгата). Белок-носитель активирует иммунитет, опосредованный Т-клетками, в отношении антигена, с которым он конъюгирован.

Конъюгат: сахарид (такой как капсульный полисахарид), ковалентно связанный с белком-носителем.

Биоконъюгат: конъюгат, который продуцируется рекомбинантно, посредством экспрессии ферментов, требующихся для синтеза сахаридов, белка-носителя и ферментов, требующихся для конъюгирования в клетке-хозяине, с получением конъюгата, в котором данный сахарид является N-связанным с белком-носителем посредством N-связанного гликозилирования белка – добавления углеводных молекул к остатку аспарагина в полипептидной цепи белка-мишени посредством ферментативного действия.

Фраза «любая аминокислота, отличающаяся от пролина (pro, P)» относится к аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аланина (ala, A), аргинина (arg, R), аспарагина (asn, N), аспарагиновой кислоты (asp, D), цистеина (cys, C), глутамина (gln, Q), глутаминовой кислоты (glu, E), глицина (gly, G), гистидина (his, H), изолейцина (ile, I), лейцина (leu, L), лизина (lys, K), метионина (met, M), фенилаланина (phe, F), серина (ser, S), треонина (thr, T), триптофана (trp, W), тирозина (tyr, Y) и валина (val, V).

ClfA: фактор слипания A из *S. aureus*

Hla: альфа-гемолизин, также известный как альфа-токсин, из *S. aureus*

ClfA: стафилококковый белок A из *S. aureus*

CP: капсульный полисахарид

LPS: липополисахарид.

Восстанавливающий конец: восстанавливающий конец полисахарида представляет собой моносахарид со свободным аномерным углеродом, который участвует в гликозидной связи и, таким образом, способен превращаться в формы с

открытой цепью.

Термин «биоконъюгат» в том виде, в котором он здесь используется, относится к конъюгату между белком (например, белком-носителем) и антигеном (например, сахаридом), полученным в клетке-хозяине, где аппарат клетки-хозяина связывает данный антиген с белком (например, посредством N-связи).

Термин «эффективное количество» в том виде, в котором он здесь используется в контексте введения терапии (например, иммуногенной композиции или вакцины по изобретению) субъекту, относится к количеству терапевтического средства, которое имеет профилактический(кие) и/или терапевтический(кие) эффект(ты). В некоторых воплощениях термин «эффективное количество» относится к количеству терапевтического средства, которое является достаточным для достижения одного, двух, трех, четырех или более чем четырех из следующих эффектов: (1) уменьшение или купирование тяжести бактериальной инфекции или симптома, ассоциированного с ней; (2) уменьшение продолжительности бактериальной инфекции или симптома, ассоциированного с ней; (3) предупреждение прогрессирования бактериальной инфекции или симптома, ассоциированного с ней; (4) вызов регрессии бактериальной инфекции или симптома, ассоциированного с ней; (5) предупреждение развития или начала бактериальной инфекции или симптома, ассоциированного с ней; (6) предупреждение рецидива бактериальной инфекции или симптома, ассоциированного с ней; (7) уменьшение органной недостаточности, ассоциированной с бактериальной инфекцией; (8) снижение госпитализации субъекта, имеющего бактериальную инфекцию; (9) уменьшение продолжительности госпитализации субъекта, имеющего бактериальную инфекцию; (10) увеличение выживаемости субъекта с бактериальной инфекцией; (11) устранение бактериальной инфекции у субъекта; (12) ингибирование или уменьшение бактериальной репликации у субъекта; и/или (13) усиление или улучшение профилактического(ких) или терапевтического(ких) эффекта(тов) другой терапии.

Термин «субъект» в том виде, в котором он здесь используется, относится к животному, в частности, к млекопитающему, такому как примат (например, человек).

Термин «иммуногенный фрагмент» в том виде, в котором он здесь используется, представляет собой часть антигена, меньшую, чем целый антиген, которая способна вызывать гуморальный и/или клеточный иммунный ответ у животного-хозяина, например, человека, специфичный в отношении данного фрагмента. Фрагменты белка

могут быть получены с использованием методик, известных в данной области, например, рекомбинантно, протеолитическим расщеплением или химическим синтезом. Внутренние или концевые фрагменты полипептида могут быть получены удалением одного или более чем одного нуклеотида с одного конца (для терминального фрагмента) или с обоих концов (для внутреннего фрагмента) нуклеиновой кислоты, которая кодирует данный полипептид. Обычно фрагменты содержат по меньшей мере 10, 20, 30, 40 или 50 смежных аминокислот полноразмерной последовательности. Однако фрагменты также могут иметь 100 или более, 200 или более, 300 или более, или 400 или более аминокислот в длину. Фрагменты могут быть легко модифицированы добавлением или удалением 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 или 50 аминокислот либо с одного из N- и C-концов, либо с обоих.

Термин «консервативная аминокислотная замена» в том виде, в котором он здесь используется, включает замену нативного аминокислотного остатка ненативным остатком, таким образом, что имеется небольшое влияние или нет влияния на размер, полярность, заряд, гидрофобность или гидрофильность аминокислотного остатка в данном положении, и это не приводит к пониженной иммуногенности. Например, они могут представлять собой замены в пределах следующих групп: валин, глицин; глицин, аланин; валин, изолейцин, лейцин; аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота; аспарагин, глутамин; серин, треонин; лизин, аргинин; и фенилаланин, тирозин. Консервативные аминокислотные модификации по отношению к последовательности полипептида (и соответствующие модификации по отношению к кодирующим нуклеотидам) могут давать полипептиды, имеющие функциональные и химические характеристики, аналогичные характеристикам родительского полипептида.

Термин «делеция» в том виде, в котором он здесь используется, представляет собой удаление одного или более чем одного аминокислотного остатка из последовательности белка.

Термин «вставка» в том виде, в котором он здесь используется, представляет собой добавление одного или более чем одного ненативного аминокислотного остатка в последовательность белка.

Ссылка на «между аминокислотами...» (например, «между аминокислотами 313-342») в том виде, в котором она здесь используется, относится к числу аминокислот, отсчитываемому последовательно от N-конца аминокислотной последовательности, например, «между аминокислотами 313-342... SEQ ID NO: 2»

относится к любому положению в аминокислотной последовательности между 313-ой и 342-ой аминокислотой SEQ ID NO: 2.

«Идентичность последовательности» может рассчитываться по всей длине эталонной последовательности или по всей длине запрашиваемой последовательности. Средства выравнивания последовательностей включают Clustal Omega (www.ebi.ac.uk), MUSCLE (www.ebi.ac.uk) или T-coffee (www.tcoffee.org), но не ограничиваются ими. В одном аспекте используемым средством выравнивания последовательностей является Clustal Omega (www.ebi.ac.uk).

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Антиген SpA

SpA дикого типа (стафилококковый белок А) представляет собой поверхностный белок, заякоренный в клеточной стенке, который является решающим фактором вирулентности для легочных инфекций, септицемии и развития абсцесса, и экспрессируется большинством клинических изолятов *S. aureus*. SpA дикого типа связывается с Fc частью человеческого IgG, с V_H3-содержащими рецепторами В-клеток, с фактором фон Виллебранда на его домене A1 и с рецептором 1 TNF-α (фактор некроза опухолей-альфа). Взаимодействие SpA с рецепторами В-клеток воздействует на развитие В-клеток с эффектами на адаптивный и врожденный иммунные ответы, тогда как его связывание с Fcγ IgG препятствует опсонофагоцитарному клиренсу стафилококков полиморфоядерными лейкоцитами. N-концевая часть зрелого SpA состоит из четырех-пяти доменов связывания Ig из 56-61 остатков, которые сворачиваются в тройные спиральные тяжи, соединенные короткими линкерами, и обозначаются в порядке E, D, A, B и C. Данные домены демонстрируют порядка 80% идентичности на аминокислотном уровне, имеют от 56 до 61 остатка в длину и организуются в виде tandemных повторов. С-концевая область состоит из «Хг» - высокоповторного, но варибельного октапептида и «Хс» - домена, который соприкасается со структурой якоря SpA в клеточной стенке.

В штамме NCTC 8325 SpA представляет собой SAOUHSC_00069 и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (GI:88193885). В штамме Newman он представляет собой nwmn_0055 (GI:151220267). Полезным фрагментом SEQ ID NO: 4 являются аминокислоты 37-325 (SEQ ID NO: 13). Данный фрагмент содержит все пять Ig-связываемых доменов SpA (которые естественно расположены от N- к С-концу

в порядке E, D, A, B, C с последовательностями SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17 и 18, соответственно) и включает наиболее подверженный воздействию домен SpA. Он также уменьшает сходство данного антигена с человеческими белками. В других полезных фрагментах могут быть опущены 1, 2, 3 или 4 из природных доменов A, B, C, D и/или E для предотвращения избыточного размножения В-клеток, которое может происходить, если SpA функционирует в качестве суперантигена В-клеток. Другие полезные фрагменты могут включать только 1, 2, 3 или 4 из природных доменов A, B, C, D и/или E, например, содержать только домен SpA(A), но не B-E или содержать только домен SpA(D), но не A, B, C или E и т.д. Таким образом, антиген SpA, используемый в настоящем изобретении, может включать 1, 2, 3, 4 или 5 доменов, связываемых IgG.

В одном воплощении антиген SpA по изобретению может индуцировать образование антитела (например, при введении человеку), которое распознает SEQ ID NO: 13 и/или может содержать аминокислотную последовательность: (а) имеющую 50% или более идентичности (например, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более) относительно SEQ ID NO: 13; и/или (б) содержащую фрагмент из по меньшей мере «n» последовательных аминокислот SEQ ID NO: 13 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 13, где «n» равен 7 или более (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более). Данные антигены SpA включают варианты SEQ ID NO: 13. Предпочтительные фрагменты (б) содержат эпитоп из SEQ ID NO: 13 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 13. В других предпочтительных фрагментах отсутствует одна или более чем одна аминокислота (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) из С-конца и/или одна или более чем одна аминокислота (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более) из N-конца SEQ ID NO: 13 при сохранении по меньшей мере одного эпитопа SEQ ID NO: 13. Индивидуальные домены, связываемые IgG, могут быть полезными иммуногенами, сами по себе или в комбинации.

Если антиген включает только один тип домена SpA (например, только домен SpA(A), SpA(D) или SpA(E)), он может включать более чем одну копию данного домена, например, много доменов SpA(D) в одной полипептидной цепи. Он также

может включать один тип домена SpA и другого белка или полипептида. Таким образом, антиген по изобретению может представлять собой слитый белок, содержащий только один тип домена SpA, такой как домен SpA(D).

Антигены SpA, используемые в данном изобретении, могут быть мутировавшими относительно SEQ ID NO: 13, таким образом, что они имеют пониженную аффинность в отношении Fcγ части человеческого IgG и/или Fab части человеческих рецепторов В-клеток, содержащих V_{H3}. Это может достигнуть и оценить, например, следуя руководству в WO2011/005341, WO12/003474 и WO2015/144653. Таким образом, по меньшей мере один дипептид Gln-Gln в SpA дикого типа может быть мутировавшим (например, до Lys-Lys; другие возможные мутации включают Arg-Arg, Arg-Lys, Lys-Arg, Ala-Ala, Ser-Ser, Ser-Thr, Thr-Thr и т.д.) и/или по меньшей мере один дипептид Asp-Asp в SpA дикого типа может быть мутировавшим (например, до Ala-Ala; другие возможные мутации включают Lys-Lys, Arg-Arg, Lys-Arg, Arg-Lys, His-His, Val-Val и т.д.). Данные последовательности-мишени для мутации представляют собой остатки, соответствующие аминокислотам 43, 44, 70, 71, 96, 97, 104, 105, 131, 132, 162, 163, 189, 190, 220, 221, 247, 248, 278, 279, 305 и/или 306 SEQ ID NO: 4.

Индивидуальный домен в пределах данного антигена может быть мутирован в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислотах относительно SEQ ID NO: 4 (например, см. выше относительно последовательностей Gln-Gln и Asp-Asp, но также см. WO2011/005341, в которой раскрыты мутации в остатках 3 и/или 24 домена D, в остатке 46 и/или 53 домена A и т.д.). Такие мутации не должны устранять способность антигена к индуцированию образования антитела, которое распознает SEQ ID NO: 13, но будут уменьшать или устранять связывание антигена с IgG и/или другими человеческими белками (такими как белки человеческой крови), как отмечено выше. В одном воплощении мутантный антиген SpA имеет последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 13, мутировавшей в по меньшей мере 1, более конкретно по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и даже более конкретно 20 аминокислотах в аминокислотах, соответствующих положениям 43, 44, 70, 71, 96, 97, 104, 105, 131, 132, 162, 163, 189, 190, 220, 221, 247, 248, 278, 279, 305 и/или 306 SEQ ID NO: 4. Полезные замены для данных положений упоминаются выше. Например, домен E SpA может быть мутирован в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 43, 44, 70 и/или 71 SEQ ID NO: 1 (например, SEQ ID NO: 19). Домен D SpA может быть мутирован в положениях,

соответствующих аминокислотным остаткам 96, 97, 104, 105, 131 и/или 132 SEQ ID NO: 4 (например, SEQ ID NO: 20 или 24). Домен А SpA может быть мутирован в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 162, 163, 189 и/или 190 SEQ ID NO: 4 (например, SEQ ID NO: 21). Домен В SpA может быть мутирован в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 220, 221, 247 и/или 248 SEQ ID NO: 4 (например, SEQ ID NO: 22). Домен С SpA может быть мутирован в положениях, соответствующих аминокислотным остаткам 278, 279, 305 и/или 306 SEQ ID NO: 4 (например, SEQ ID NO: 23). Полагают, что мутации в положениях, соответствующих положениям 43, 44, 96, 97, 104, 105, 162, 163, 220, 221, 278 и/или 279 SEQ ID NO: 4, уменьшают или устраняют связывание с Fc γ частью человеческого IgG, тогда как мутации в положениях, соответствующих положениям 70, 71, 131, 132, 189, 190, 247, 248, 305 и/или 306 SEQ ID NO: 4, уменьшают или устраняют связывание с Fab частью человеческих рецепторов В-клеток, содержащих V_H3.

Таким образом, антиген SpA предпочтительно содержит (а) одну или более чем одну аминокислотную замену в связывающем V_H3 субдомене домена Е, D, А, В или С SpA, которая нарушает или уменьшает связывание с V_H3, и (б) одну или более чем одну аминокислотную замену в связывающем Fc IgG субдомене домена Е, D, А, В или С SpA, которая нарушает или уменьшает связывание с Fc IgG. Границы доменов Е/Д, D/А, А/В и В/С могут быть основаны на доменах, описанных в Kim et al, 2014. Vaccine 32: 464-469.

В одном воплощении антиген SpA содержит домен Е с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 7 и 8 SEQ ID NO: 14 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 14; домен D с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 12 и 13 SEQ ID NO: 15 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 15; домен А с аминокислотной заменой в положениях 9 и 10 SEQ ID NO: 16 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 16; домен В с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 9 и 10 SEQ ID NO: 17 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%

или 99% идентичной SEQ ID NO: 17, и/или домен С с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 9 и 10 SEQ ID NO: 18 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 18. Предпочтительно указанная аминокислотная замена представляет собой замену глутамина лизином, как например в SEQ ID NO: 19-24. В предпочтительном воплощении антиген SpA дополнительно содержит домен D с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 4 и 5 SEQ ID NO: 15, например, замену глутамина на аргинин или лизин, например, KR (например, SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25).

В одном воплощении антиген SpA содержит домен E с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 34 и 35 SEQ ID NO: 14 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 14; домен D с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 39 и 40 SEQ ID NO: 15 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 15; домен A с аминокислотной заменой в положениях 36 и 37 SEQ ID NO: 16 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 16; домен B с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 36 и 37 SEQ ID NO: 17 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 17; и/или домен С с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 36 и 37 SEQ ID NO: 18 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 18. Предпочтительно указанная аминокислотная замена представляет собой замену аспарагиновой кислоты на аланин, как например в SEQ ID NO: 19-24.

Типичные антигены SpA по изобретению могут содержать или состоять из последовательности SEQ ID NO: 26 или, более предпочтительно, SEQ ID NO: 27. Другие типичные антигены SpA могут иметь 50% или более идентичности (например, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или более) с SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 27; и/или могут содержать

фрагмент из по меньшей мере 'n' последовательных аминокислот SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 27, где 'n' равен 7 или более (например, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или более).

Антиген ClfA

Прилипание бактерий к компонентам внеклеточного матрикса хозяина представляет собой критическую исходную фазу в бактериальной инфекции. Фактор слипания А (ClfA) представляет собой важный адгезин *S. aureus*, который требуется для вирулентности и помогает бактериям ускользать от механизмов защиты хозяина. Он связывается с фибриногеном в ЕСМ (внеклеточный матрикс), способствуя прилипанию и заселению тканей хозяина и дополнительно вызывая агрегацию клеток и покрытие бактериальных клеток фибриногеном, что стимулирует ускользание от иммунитета посредством ухудшения отложения опсонинов на бактериях.

ClfA присутствует почти во всех штаммах *S. aureus*. Он является важным фактором вирулентности, способствующим патогенезу септического артрита и эндокардита. ClfA связывается с С-концом γ -цепи фибриногена и, посредством этого, способен индуцировать агрегацию бактерий в растворе фибриногена. Экспрессия ClfA на *S. aureus* затрудняет фагоцитоз как макрофагами, так и нейтрофилами. В нейтрофилах это обусловлено как фибриноген-зависимым, и фибриноген-независимым механизмом. В отличие от этого, тромбоциты активируются бактериями, экспрессирующими ClfA, через его взаимодействие с GPIIb/IIIa, что приводит к агрегации. Это эффективнее всего осуществляется при наличии фибриногена, но также имеется фибриноген-независимый путь активации тромбоцитов.

ClfA содержит N-концевой домен А из 520 аминокислот (область связывания фибриногена), который содержит три отдельно свернутых субдомена N1, N2 и N3. После домена А следует область серин-аспартатных дипептидных повторов и область, охватывающая клеточную стенку и мембрану, которая содержит мотив LPDTG для закоривания в клеточной стенке, стимулируемого сортазой. Аминокислотная последовательность домена А (субдомены N1-3) показана в SEQ ID NO: 1. Аминокислотная последовательность субдоменов N2N3 домена А показана в SEQ ID NO: 2.

В одном воплощении антиген ClfA по изобретению содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, или представляет собой

иммуногенный фрагмент и/или вариант SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 (например, SEQ ID NO: 5-7), или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В одном воплощении антиген ClfA по изобретению может содержать иммуногенный фрагмент SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 5-8, содержащий по меньшей мере примерно 15, по меньшей мере примерно 20, по меньшей мере примерно 40, по меньшей мере примерно 60, по меньшей мере примерно 100, по меньшей мере примерно 300 или по меньшей мере примерно 400 смежных аминокислотных остатков полноразмерной последовательности, где указанный полипептид способен индуцировать иммунный ответ, специфичный в отношении указанной аминокислотной последовательности.

В некоторых воплощениях антиген ClfA по изобретению может содержать (или состоит из) субдомены N1, N2 и N3 ClfA (SEQ ID NO: 1) или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 1. В других воплощениях модифицированный антиген ClfA по изобретению может содержать (или состоит из) субдоменов N2 и N3 (SEQ ID NO: 2) или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 2.

Согласно настоящему изобретению, таким образом, предложен антиген ClfA, содержащий (или состоящий из) аминокислотную последовательности SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 2 (например, SEQ ID NO: 5). В одном воплощении данный антиген ClfA содержит одну или более чем одну консенсусную последовательность фермента гликозилтрансферазы, например, PglB, выбранную из: D/E-X-N-Z-S/T (SEQ ID NO: 28) и K-D/E-X-N-Z-S/T-K (SEQ ID NO: 29), где X и Z представляют собой независимо любую аминокислоту, отличную от пролина. В одном воплощении данная консенсусная последовательность представляет собой K-D/E-X-N-Z-S/T-K (SEQ ID NO: 28), где X представляет собой Q (глутамин), и Z представляет собой R (аргинин), например, K-D-Q-N-R-T-K (SEQ ID NO: 30). В предпочтительном воплощении данная консенсусная последовательность представляет собой K-D/E-X-N-Z-S/T-K (SEQ ID NO: 29), где X представляет собой Q (глутамин), и Z представляет собой A (аланин), например, K-D-Q-N-A-T-K (SEQ ID

NO: 31). Антиген ClfA может быть дополнительно модифицирован добавлением N-концевого серина в целях клонирования, например SEQ ID NO: 7. Антиген ClfA может быть дополнительно модифицирован так, чтобы содержать мутации, которые отменяют связывание с фибриногеном, как описано ниже, например, SEQ ID NO: 5-7.

В одном воплощении антиген ClfA по изобретению содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 2, которая представляет собой вариант SEQ ID NO: 2, который был модифицирован делецией и/или присоединением, и/или заменой одной или более чем одной аминокислоты (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислот). Аминокислотная замена может быть консервативной или неконсервативной. В одном аспекте аминокислотная замена является консервативной.

Замены, делеции, присоединения или их любая комбинация могут быть объединены в одном варианте, при условии, что данный вариант представляет собой иммуногенный полипептид. В одном воплощении антиген ClfA по настоящему изобретению может происходить от варианта, в котором от 1 до 10, от 5 до 10, от 1 до 5, от 1 до 3, от 1 до 2 или 1 аминокислота подвергается замене, делеции или присоединению в любой комбинации. Например, антиген ClfA по изобретению может происходить из аминокислотной последовательности, которая представляет собой вариант SEQ ID NO: 2, в котором она содержит дополнительный N-концевой серин (например, SEQ ID NO: 7).

В одном воплощении настоящее изобретение включает фрагменты и/или варианты, которые содержат эпитоп В-клетки или Т-клетки. Такие эпитопы можно прогнозировать с использованием комбинации прогнозирования 2D-структуры (двухмерной структуры), например, с использованием программы PSIPRED (от David Jones, Brunel Bioinformatics Group, Dept. Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, Великобритания), и антигенного индекса, рассчитанного на основе способа, описанного Jameson and Wolf (CABIOS 4:181-186 [1988]).

В одном воплощении настоящего изобретения одна или более чем одна аминокислота (например, 1-7 аминокислот, например, одна аминокислота) аминокислотной последовательности ClfA (например, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность ClfA, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 2) была заменена консенсусной последовательностью D/E-X-

N-Z-S/T (SEQ ID NO: 28) или K-D/E-X-N-Z-S/T-K (SEQ ID NO: 29) (например, K-D-Q-N-A-T-K (SEQ ID NO: 31)). Например, одна аминокислота в аминокислотной последовательности ClfA (например, SEQ ID NO: 2 или 5) может быть заменена консенсусной последовательностью D/E-X-N-Z-S/T (SEQ ID NO: 28) или K-D/E-X-N-Z-S/T-K (SEQ ID NO: 29) (например, K-D-Q-N-A-T-K (SEQ ID NO: 31)). В качестве альтернативы, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот в аминокислотной последовательности ClfA (например, SEQ ID NO: 2 или аминокислотной последовательности ClfA, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 2) могут быть заменены консенсусной последовательностью D/E-X-N-Z-S/T (SEQ ID NO: 28) или K-D/E-X-N-Z-S/T-K (SEQ ID NO: 29) (например, K-D-Q-N-A-T-K (SEQ ID NO: 31)).

В одном воплощении консенсусная последовательность была добавлена или заменяла один или более чем один аминокислотный остаток 313-340 (например, вместо одного или более чем одного аминокислотного остатка 330-340 или вместо аминокислотного остатка Q327, D329, P331 или I337, предпочтительно I337) в SEQ ID NO: 2, или в эквивалентном положении в аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 2 (например, SEQ ID NO: 5-7).

Введение консенсусной(ных) последовательности(тей), выбранной(ных) из: D/E-X-N-Z-S/T (SEQ ID NO: 28) и K-D/E-X-N-Z-S/T-K (SEQ ID NO: 29) обеспечивает гликозилирование антигена ClfA. Таким образом, согласно настоящему изобретению также предложен антиген ClfA по изобретению, где данный антиген ClfA является гликозилированным.

Поскольку активность связывания фибриногена ClfA требуется для того, чтобы он действовал как фактор вирулентности, антиген ClfA может быть модифицирован для уменьшения или устранения активности связывания фибриногена для того, чтобы его можно было вводить *in vivo*. Такой модифицированный антиген ClfA может иметь одну из мутаций, описанных в WO2011/007004, например, мутации в одной или предпочтительно в обеих аминокислотах, соответствующих остаткам P116 и Y118 SEQ ID NO: 2, например, P116S и/или Y118A. Типичными последовательностями являются последовательности SEQ ID NO: 5-7. В одном воплощении в одном аспекте антиген ClfA по изобретению содержит (или состоит из) аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или

100% идентичной SEQ ID NO: 2, причем указанная аминокислотная последовательность содержит: аминокислотные замены в положении P116 на S и в положении Y118 на A, например, SEQ ID NO: 5-7 или 32.

В одном воплощении дополнительный аминокислотный остаток (например, серин или аланин) добавляют на N-конец зрелого антигена, как например в SEQ ID NO: 7. Такой остаток имеет преимущество в том, что он приводит к более эффективному расщеплению лидерной последовательности.

В одном аспекте антиген ClfA по изобретению содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности SEQ ID NO: 2 (или состоит из нее), причем указанная аминокислотная последовательность содержит: аминокислотные замены в положении P116 на S и в положении Y118 на A, консенсусную последовательность K-D/E-X-N-Z-S/T-K (SEQ ID NO: 29), в которой X и Z представляют собой независимо любую аминокислоту, отличную от пролина (предпочтительно K-D-Q-N-A-T-K (SEQ ID NO: 31), например, SEQ ID NO: 6), возможно с дополнительным остатком серина на N-конце (например, SEQ ID NO: 7). В одном воплощении антиген ClfA по изобретению имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 97%, 98%, 99% или 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO 1, 2 или 5-7. В другом воплощении антиген ClfA по изобретению имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO 1, 2 или 5-7.

Антиген Hla

Hla является важным секретируемым стафилококковым токсином. Он создает в мембране человеческих эритроцитов и других клеток пору, проникающую через липидный бислой, что приводит к лизису клеток.

В одном воплощении антиген Hla по настоящему изобретению содержит (или состоит из) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3.

В одном воплощении антиген Hla содержит аминокислотные замены в положениях H48 и G122 SEQ ID NO: 3 или в эквивалентных положениях в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3, где указанные замены

представляют собой, соответственно, замену Н на С и замену G на C (например, H48C и G122C, например, SEQ ID NO: 10-12). Указанные замены служат для введения дисульфидного мостика в антиген H1a, который может улучшать стабильность и выход белка при рекомбинантном продуцировании.

Следовательно, антиген H1a по изобретению может демонстрировать пониженную тенденцию к агрегации по сравнению с H1a, не имеющим дисульфидных мостиков, например, дикого типа или детоксицированным H1a (например, H1a H35L, например, SEQ ID NO: 8). Например, подходящим модифицированным антигеном H1a по изобретению может быть антиген, который демонстрирует меньшую агрегацию, чем H1a дикого типа или H1a H35L (например, при выявлении на вестерн-блотах или измерении посредством хроматографических методик, например, IMAC (аффинная хроматография на иммобилизованных ионах металла) или гель-фильтрация), как описано в Примерах. Например, подходящий модифицированный антиген H1a может демонстрировать уровни агрегации (при определении с использованием любого из описанных здесь способов) 0%, 0,0005%; 0,001%; 0,005%; 0,01%; 0,05%; 0,1%; 0,5%; 1% или 5%; примерно 0%; 0,0005%; 0,001%; 0,005%; 0,01%; 0,05%; 0,1%; 0,5%; 1% или 5%; меньше, чем 0,0005%; 0,001%; 0,005%; 0,01%; 0,05%; 0,1%; 0,5%; 1% или 5%; меньше 10%, меньше 20%, меньше 30%, меньше 40%, меньше 50%, меньше 60%, меньше 70%, меньше 80% или меньше 90% от уровня H1a дикого типа, детоксицированного (например, H1aH35L) или другого поперечно сшитого H1a. Например, при использовании гель-фильтрации или IMAC пик, представляющий мономерный H1a, может быть выше, чем у H1a дикого типа или H1a H35L или другого H1a, который не был модифицирован для уменьшения сшивания, и/или пик, представляющий агрегированный H1a, может быть ниже.

Антиген H1a по изобретению может быть получен с большим общим выходом, чем H1a, не имеющий дисульфидных мостиков, например, H1a дикого типа или детоксицированный H1a (например, H1a H35L, например, SEQ ID NO: 8). Когда общий выход не больше, модифицированный антиген H1a может быть получен с большим выходом мономера H1a, чем H1a, не имеющий дисульфидных мостиков, например, H1a дикого типа или детоксицированный H1a (например, H1a H35L, например, SEQ ID NO: 8). Например, выход модифицированного антигена H1a может быть повышен на 10%, 20%, 30% , 40% , 50% , 60%, 70%, 80%, 90%, 110%, 120%, 150%, 200% или более, или примерно 10%, 20%, 30% , 40% , 50% , 60%, 70% , 80% 90%, 110%, 120%, 150%, 200%

или более по сравнению с выходом Hla дикого, детоксицированного Hla (например, Hla H35L), или другого сшитого Hla. Выход белка может быть определен, как описано ниже.

В одном воплощении антиген Hla по изобретению может представлять собой иммуногенный фрагмент и/или вариант SEQ ID NO: 3, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 3. В одном воплощении антиген Hla по изобретению может содержать иммуногенный фрагмент SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 3, содержащие по меньшей мере примерно 15, по меньшей мере примерно 20, по меньшей мере примерно 40 или по меньшей мере примерно 60 смежных аминокислотных остатков полноразмерной последовательности, где указанный полипептид способен индуцировать специфичный иммунный ответ в отношении указанной аминокислотной последовательности.

В одном воплощении антиген Hla по изобретению может происходить из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3, которая является вариантом SEQ ID NO: 3, который был модифицирован посредством делеции и/или присоединения, и/или замены одной или более чем одной аминокислоты (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислот). Аминокислотная замена может быть консервативной или неконсервативной. В одном аспекте аминокислотная замена является консервативной. Замены, делеции, присоединения или их любую комбинацию можно объединять в одном варианте, при условии, что данный вариант является иммуногенным полипептидом. В одном воплощении модифицированный антиген Hla по настоящему изобретению может быть получен из варианта, в котором осуществляется замена, делеция или присоединение от 1 до 10, от 5 до 10, от 1 до 5, от 1 до 3, от 1 до 2 или 1 аминокислоты в любой комбинации. Например, модифицированный антиген Hla по изобретению может происходить из аминокислотной последовательности, которая является вариантом любой из SEQ ID NO: 3 или 8-11 в том, что она имеет одну или две дополнительные аминокислоты на N-конце, например, исходный N-концевой S (например, SEQ ID NO: 12). Данный модифицированный антиген Hla может дополнительно или альтернативно иметь одну

или более чем одну дополнительную аминокислоту на С-конце, например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислот. Такие дополнительные аминокислоты могут включать пептидную метку для помощи в очистке и включают, например, GSHRHR (например, SEQ ID NO: 12).

В одном воплощении настоящее изобретение включает фрагменты и/или варианты, которые содержат эпитоп В-клетки или Т-клетки. Такие эпитопы могут прогнозироваться с использованием комбинации прогнозирования 2D-структуры, например, с использованием программы PSIPRED (от David Jones, Brunel Bioinformatics Group, Dept. Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, Великобритания), и антигенного индекса, рассчитанного на основе способа, описанного Jameson and Wolf (CABIOS 4:181-186 [1988]).

Поскольку Hla представляет собой токсин, он должен быть детоксицирован (т.е. сделан нетоксичным для млекопитающего, например, человека, при предоставлении в подходящей дозировке для защиты) перед тем, как его можно вводить *in vivo*. Клеточную литическую активность Hla можно уменьшать посредством мутации аминокислотных остатков, участвующих в образовании поры, как описано в Menzies and Kernodle (Menzies and Kernodle, 1994, Infect Immun 62, 1843-1847). Антиген Hla по изобретению может быть детоксицирован генетически (т.е. посредством мутации). Дополнительно и/или альтернативно, антиген Hla может быть детоксицирован посредством конъюгирования, например, с капсульным полисахаридом *S. aureus*. Генетически детоксицированные последовательности могут устранять нежелательные активности, такие как способность к образованию поры, проникающей через липидный бислой, проницаемость мембраны, лизис клеток и цитолитическая активность против человеческих эритроцитов и других клеток, для того, чтобы уменьшать токсичность при сохранении способности индуцировать защитные и/или нейтрализующие антитела против Hla после введения человеку. Например, как здесь описано, антиген Hla может быть изменен таким образом, что он становится биологически неактивным, при этом сохраняя свои иммуногенные эпитопы.

Антигены Hla по изобретению могут быть генетически детоксицированы посредством одной или более чем одной точечной мутации. Например, остатки, участвующие в образовании поры, ассоциировали с литической активностью Hla. В одном аспекте модифицированные антигены Hla по изобретению могут быть детоксицированы посредством аминокислотных замен, как описано в Menzies and

Kernodle (Menzies and Kernodle, 1994, Infect Immun 62, 1843-1847), например, замены H35, H48, H114 и/или H259 другой аминокислотой, такой как лизин. Например, модифицированные антигены Hla по изобретению могут содержать по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из H35L, H114L или H259L, со ссылкой на аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (или эквивалентное положение в аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3). Предпочтительно модифицированный антиген Hla содержит замену H35L (например, SEQ ID NO: 8-12).

Номера аминокислот, на которые дается здесь ссылка, соответствуют аминокислотам в SEQ ID NO: 3, и, как описано выше, специалист в данной области может определять эквивалентные положения аминокислот в аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3, посредством выравнивания.

Гемолитическую активность антигена Hla по изобретению можно анализировать и характеризовать способами, описанными, например, в Menzies and Kernodle, 1994, Infect Immun 62, 1843-1847. Для измерения гемолитической (например, цитолитической) активности модифицированного антигена Hla относительно Hla дикого типа можно использовать анализ гемолиза *in vitro*. Для измерения способности антисыворотки, полученной против модифицированного антигена Hla по изобретению, ингибировать гемолиз Hla и (обычно) сравнения антисыворотки против модифицированного Hla с антисывороткой против Hla дикого типа можно использовать анализ ингибирования гемолиза. Например, подходящим модифицированным антигеном Hla по изобретению может быть антиген, который демонстрирует меньшую гемолитическую активность, чем Hla дикого типа (например, измеренную посредством анализа гемолиза *in vitro*). Например, подходящий модифицированный антиген Hla может иметь удельную активность (при определении с использованием анализа гемолиза *in vitro*) примерно (со ссылкой на каждое из следующих значений независимо) 0%, 0,0005%, 0,001%, 0,005%, 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 5% или меньше 10% удельной активности Hla дикого типа. Подходящим модифицированным антигеном Hla по изобретению может быть антиген, который, после введения хозяину, вызывает продукцию хозяином антител, которые ингибируют гемолиз посредством Hla дикого типа (например, посредством анализа ингибирования гемолиза), является иммуногенным (например, индуцирует продукцию антител против

Нла дикого типа) и/или защитным (например, индуцирует иммунный ответ, который защищает хозяина против инфекции или ограничивает уже существующую инфекцию). Можно использовать анализы, как описано в Примерах.

В одном воплощении изобретения одна или более чем одна аминокислота (например, 1-7 аминокислот, например, одна аминокислота) аминокислотной последовательности модифицированного Нла (например, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или аминокислотной последовательности Нла, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичная SEQ ID NO: 3, например, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 10) была заменена консенсусной последовательностью D/E-X-N-Z-S/T (SEQ ID NO: 28) или K-D/E-X-N-Z-S/T-K (SEQ ID NO: 29) (например, K-D-Q-N-R-T-K (SEQ ID NO: 30)) для фермента гликозилтрансферазы, например, PglB. Например, одна аминокислота в аминокислотной последовательности Нла (например, SEQ ID NO: 3) может быть заменена консенсусной последовательностью D/E-X-N-Z-S/T (SEQ ID NO: 28) или K-D/E-X-N-Z-S/T-K (SEQ ID NO: 29) (например, K-D-Q-N-R-T-K (SEQ ID NO: 30)) (например, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11-12). В качестве альтернативы, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот в аминокислотной последовательности Нла (например, SEQ ID NO: 3 или аминокислотной последовательности Нла, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3) могут быть заменены консенсусной последовательностью D/E-X-N-Z-S/T (SEQ ID NO: 28) или K-D/E-X-N-Z-S/T-K (SEQ ID NO: 29) (например, K-D-Q-N-R-T-K (SEQ ID NO: 30)).

В одном воплощении консенсусная(ные) последовательность(ти), выбранная(ные) из D/E-X-N-Z-S/T (SEQ ID NO: 28) и K-D/E-X-N-Z-S/T-K (SEQ ID NO: 29) (например, K-D-Q-N-R-T-K (SEQ ID NO: 30)), добавляют или ей(ими) заменяют в положении, соответствующем аминокислоте K131 в SEQ ID NO: 3 или в эквивалентном положении в аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 1 (например, SEQ ID NO: 9 и 11-12). В предпочтительном воплощении указанной консенсусной последовательностью заменяют аминокислоту, соответствующую K131 в SEQ ID NO: 3.

Введение консенсусной(ных) последовательности(тей), выбранной(ных) из: D/E-X-N-Z-S/T (SEQ ID NO: 28) и K-D/E-X-N-Z-S/T-K (SEQ ID NO: 29) обеспечивает гликозилирование антигена Нла. Таким образом, согласно настоящему изобретению

также предложен антиген H1a по изобретению, который является гликозилированным. В конкретных воплощениях консенсусные последовательности вводят в конкретные области аминокислотной последовательности H1a, например, поверхностные структуры белка, на N- или C-концах белка и/или в петли, которые стабилизируются дисульфидными мостиками. В одном аспекте настоящего изобретения положение консенсусной(ных) последовательности(тей) обеспечивает улучшенное гликозилирование, например, повышенный выход.

Введение таких сайтов гликозилирования может осуществляться, например, добавлением новых аминокислот в первичную структуру антигена (т.е. сайты гликозилирования добавляют полностью или частично) или мутированием, существующих аминокислот в антигене для того, чтобы получать сайты гликозилирования (т.е. аминокислоты не добавляют в антиген, но избранные аминокислоты антигена мутируют таким образом, чтобы образовать сайты гликозилирования). Специалистам в данной области будет понятно то, что аминокислотная последовательность антигена может быть легко модифицирована с использованием подходов, известных в данной области, например, подходов генной инженерии, которые включают модификацию последовательности, кодирующей антиген.

В одном воплощении антиген H1a может быть дополнительно модифицирован в том, что данная аминокислотная последовательность содержит одну или более чем одну консенсусную последовательность, выбранную из: D/E-X-N-Z-S/T (SEQ ID NO: 28) и K-D/E-X-N-Z-S/T-K (SEQ ID NO: 29), где X и Z независимо представляют собой любую аминокислоту, отличную от пролина (например, SEQ ID NO: 30). Данные последовательности могут быть модифицированы вставкой N-концевого серина и/или аланина в целях клонирования, как здесь описано. Данные последовательности могут быть дополнительно модифицированы так, чтобы содержать детоксицирующие мутации, как например любую одну или все из детоксицирующих мутаций, описанных в данном документе. Предпочтительной детоксицирующей мутацией является H35L в SEQ ID NO: 3.

Таким образом, в одном воплощении в настоящем изобретении предложен антиген H1a, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую одну или более чем одну консенсусную последовательность, выбранную из: D/E-X-N-Z-S/T (SEQ ID NO: 28) и K-D/E-X-N-Z-S/T-K (SEQ ID NO: 29), где X и Z независимо представляют

собой любую аминокислоту, отличную от пролина, которая была введена рекомбинантно в аминокислотную последовательность Hla SEQ ID NO: 3 или в аминокислотную последовательность Hla, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 3 (например, SEQ ID NO: 9 или 10).

В предпочтительном воплощении антиген Hla по изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 (или состоит из нее). В одном воплощении модифицированный антиген Hla по изобретению содержит аминокислотную последовательность любую из SEQ ID NO: 3 или 8-11 с N-концевым серином и/или аланином (т.е. остатки S добавляются на N-конец) (или состоит из нее). В одном воплощении модифицированный антиген Hla по изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 (или состоит из нее).

В одном воплощении антиген Hla по изобретению дополнительно содержит «пептидную метку» или «метку», т.е. последовательность аминокислот, которая обеспечивает выделение и/или идентификацию модифицированного антигена Hla. Например, добавление метки к модифицированному антигену Hla по изобретению может быть полезным в очистке данного антигена и, следовательно, очистке конъюгатных вакцин, содержащих меченый модифицированный антиген Hla. Типичные метки, которые можно здесь использовать, включают, без ограничения, гистиридиновые (HIS) метки. В одном воплощении данная метка представляет собой гексагистиридиновую метку. В другом воплощении данная метка представляет собой метку HR, например, метку HRHR. В некоторых воплощениях используемые здесь метки являются удаляемыми, например, удаляемыми химическими агентами или ферментативными способами, как только они больше не нужны, например, после того, как антиген был очищен. Возможно, пептидная метка находится на С-конце аминокислотной последовательности. Возможно, пептидная метка содержит шесть остатков гистидина на С-конце аминокислотной последовательности. Возможно, пептидная метка содержит четыре остатка HR (HRHR) на С-конце аминокислотной последовательности. Данная пептидная метка может содержать, или ей может предшествовать один, два или более чем два дополнительных аминокислотных остатка, например, остатки аланина, серина и/или глицина, например, GS. В одном аспекте модифицированный антиген Hla по изобретению содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%,

97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности SEQ ID NO: 3 (или состоит из нее), причем указанная аминокислотная последовательность содержит консенсусную последовательность D/E-X-N-Z-S/T (SEQ ID NO: 28), в которой X и Z независимо представляют собой любую аминокислоту, отличную от пролина (например, K-D/E-X-N-Z-S/T-K (SEQ ID NO: 29) или K-D-Q-N-R-T-K (SEQ ID NO: 30)), по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из H35L, H48C и G122C, и пептидную метку GSHRHR на С-конце аминокислотной последовательности. Возможно, модифицированный антиген Hla по изобретению имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 3 или 9-12.

В одном воплощении на N-конец зрелого белка добавляется остаток серина и/или аланина, например, SA или S, предпочтительно S (например, SEQ ID NO: 12). Такой остаток или остатки имеют преимущество в том, что приводят к более эффективному расщеплению лидерной последовательности.

В одном аспекте антиген Hla по изобретению содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности SEQ ID NO: 3 (или состоит из нее), причем указанная аминокислотная последовательность содержит аминокислотные замены в положении G122 на C, в положении H48 на C и в положении H35 на L, аминокислоту, соответствующую K131 в SEQ ID NO: 3, замененную на K-D-Q-N-R-T-K (SEQ ID NO: 30)), метку HRHR (SEQ ID NO: 32) на С-конце аминокислотной последовательности (например, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12).

В предпочтительном воплощении указанный антиген Hla содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 (или состоит из нее). В предпочтительном воплощении указанный антиген Hla содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 (или состоит из нее).

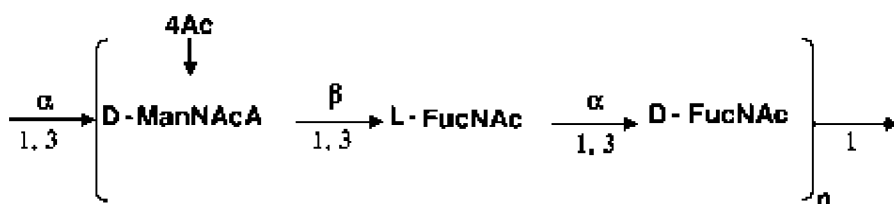
Полисахаридные антигены

75% штаммов *S. aureus* экспрессируют капсульный полисахарид либо типа 5, либо типа 8, таким образом, вакцина, содержащая CP5 и CP8, могла бы потенциально давать защиту против большинства циркулирующих штаммов *S. aureus*.

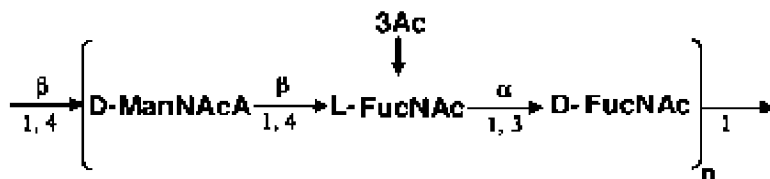
Композиции по изобретению, таким образом, содержат бактериальный капсульный сахарид из *S. aureus*. Данный бактериальный капсульный сахарид из *S. aureus* может быть выбран из капсульного сахара серотипа 5 или 8 *S. aureus*.

В одном воплощении настоящего изобретения антиген представляет собой повторяющееся звено бактериального капсульного сахара из *S. aureus*. В одном воплощении настоящего изобретения антиген содержит повторяющееся звено бактериального капсульного сахара из *S. aureus* серотипа 5 или 8.

В одном воплощении настоящего изобретения антиген содержит повторяющееся звено бактериального капсульного сахара из серотипа 8 *S. aureus*. В данном воплощении данный антиген содержит:



В одном воплощении настоящего изобретения антиген содержит повторяющееся звено бактериального капсульного сахара из *Staphylococcus aureus* серотипа 5. В данном воплощении изобретения данный антиген содержит:



В одном воплощении данный антиген представляет собой полисахарид. В одном воплощении данный антиген содержит два или более чем два моносахарида, например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20 или больше моносахаридов. В одном воплощении данный антиген представляет собой полисахарид, содержащий не больше, чем 20, 15, 12, 10, 9 или 8 моносахаридов.

В одном воплощении указанный капсульный полисахаридный антиген конъюгирован с белком-носителем. Конъюгаты по изобретению описываются ниже.

Конъюгаты

Согласно настоящему изобретению также предложен конъюгат (например, биоконъюгат), содержащий капсульный сахарид (или состоящий из него), как здесь описано, связанный, например ковалентно связанный, с белком-носителем. В одном воплощении белок-носитель представляет собой белок Hla по изобретению. В одном воплощении данный белок представляет собой белок ClfA по изобретению.

В одном воплощении белок-носитель ковалентно связывается с полисахаридным

антигеном через химическую связь, получаемую с использованием способа химического конъюгирования (т.е. конъюгат продуцируется химическим конъюгированием).

В одном воплощении способ химического конъюгирования выбран из группы, состоящей из карбодиимидной химии, восстановительного аминирования, химии цианилирования (например, химии CDAP), малеимидной химии, гидразидной химии, химии сложных эфиров и N-гидроксисукцинимидной химии. Конъюгаты могут быть получены способами прямого восстановительного аминирования, как описано в US200710184072 (Hausdorff), US 4365170 (Jennings) и US 4673574 (Anderson). Другие способы описываются в EP-0-161-188, EP-208375 и EP-0-477508. В качестве альтернативы, способ конъюгирования может полагаться на активацию сахара 1-циано-4-диметиламинопиридиния тетрафторборатом (CDAP) с образованием цианатного сложного эфира. Такие конъюгаты описываются в опубликованной заявке PCT WO 93/15760 Uniformed Services University, WO 95/08348 и WO 96/29094. См. также Chu C. et al Infect. Immunity, 1983 245 256.

В общем, для связывания/конъюгирования можно использовать следующие типы химических групп на модифицированном белке ClfA:

А) карбоксильную (например, через аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту). В одном воплощении данная группа связывается с аминокруппами на сахарах непосредственно или с аминокруппой на линкере с карбодиимидной химией, например, с EDAC;

Б) аминокруппу (например, через лизин). В одном воплощении данная группа связывается с карбоксильными группами на сахарах непосредственно или с карбоксильной группой на линкере с карбодиимидной химией, например, с EDAC. В другом воплощении данная группа связывается с гидроксильными группами, активированными CDAP или CNBr, на сахарах непосредственно или с такими группами на линкере; с сахарами или линкерами, имеющими альдегидную группу; с сахарами или линкерами, имеющими группу сложного эфира сукцинимид;

В) сульфгидрильную (например, через цистеин). В одном воплощении данная группа связывается с бром- или хлорацетилованным сахаром или линкером с малеимидной химией. В одном воплощении данная группа активируется/модифицируется с использованием бисдиазобензида;

Г) гидроксильная группа (например, через тирозин). В одном воплощении

данная группа активируется/модифицируется с использованием бисдиазобензида;

Д) имидазолильная группа (например, через гистидин). В одном воплощении данная группа активируется/модифицируется с использованием бисдиазобензида;

Е) гуанидильная группа (например, через аргинин);

Ж) индолильная группа (например, через триптофан).

На сахаридах, в общем, можно использовать следующие группы для связывания: OH, COOH или NH₂. Альдегидные группы могут быть получены после разных обработок, таких как: обработка периодатом, кислотный гидролиз, обработка пероксидом водорода и т.д.

Методы прямого связывания:

Сахарид-OH + CNBr или CDAP ----> цианатный сложный эфир + NH₂-Белок ---
-> конъюгат

Сахарид-альдегид + NH₂-Белок ----> основание Шиффа + NaCNBH₃ ---->
конъюгат

Сахарид-COOH + NH₂-Белок + EDAC ----> конъюгат

Сахарид-NH₂ + COOH-Белок + EDAC ----> конъюгат

Методы непрямого связывания через спейсер (линкер):

Сахарид-OH + CNBr или CDAP ----> цианатный сложный эфир + NH₂----NH₂ ----
> сахарид----NH₂ + COOH-Белок + EDAC ----> конъюгат

Сахарид-OH + CNBr или CDAP ----> цианатный сложный эфир + NH₂----SH ----
> сахарид----SH + SH-Белок (нативный белок с экспонированным цистеином или полученный после модификации аминогрупп белка, например, посредством SPDP) ----
> сахарид-S-S-белок

Сахарид-OH + CNBr или CDAP ----> цианатный сложный эфир + NH₂----SH -----
> сахарид----SH + малеимид-белок (модификация аминогрупп) ----> конъюгат

Сахарид-OH + CNBr или CDAP ----> цианатный сложный эфир + NH₂----SH ---->
Сахарид-SH + галогенацетилованный белок ----> Конъюгат

Сахарид-COOH + EDAC + NH₂----NH₂ ----> сахарид-----NH₂ + EDAC + COOH-
Белок ----> конъюгат

Сахарид-COOH + EDAC + NH₂----SH -----> сахарид----SH + SH-Белок (нативный белок с экспонированным цистеином или полученный после модификации аминогрупп белка, например, посредством SPDP) -----> сахарид-S-S-Белок

Сахарид-COOH + EDAC + NH₂----SH -----> сахарид----SH + малеимид-Белок
(модификация аминогрупп) -----> конъюгат

Сахарид-COOH + EDAC + NH₂----SH ---> Сахарид-SH +
галогенацетилованный белок ----> Конъюгат

Сахарид-альдегид + NH₂-----NH₂ -----> сахарид---NH₂ + EDAC + COOH-Белок ---
-> конъюгат

Примечание: вместо EDAC выше можно использовать любой подходящий карбодиимид.

В одном воплощении антиген непосредственно связывается с белком-носителем.

В одном воплощении антиген присоединяется к белку-носителю через линкер. Возможно, данный линкер выбирают из группы, состоящей из линкеров с 4-12 атомами углерода, бифункциональных линкеров, линкеров, содержащих 1 или 2 реакционноспособные группы на конце, В-пропионамидо, нитрофенил-этиламина, галогенацилгалогенидов, 6-аминокапроновой кислоты и ADH. Активированный сахарид, таким образом, может быть связан непосредственно или через спейсерную (линкерную) группу с аминогруппой на белке-носителе. Например, спейсер мог бы представлять собой цистамин или цистеамин, с получением тиолированного полисахарида, который мог бы быть связан с носителем через тиоэфирную связь, полученную после реакции с белком-носителем, активированным малеимидом (например, с использованием GMBS (N-гидроксисукцинимидиловый сложный эфир 4-малеимидомасляной кислоты), или с галогенацетилованным белком-носителем (например, с использованием SIAB (сукцинимидил(4-йодацетил)аминобензоат), или SIA (сукцинимидилйодацетат), или SBAP (сукцинимидил-3-(бромацетамид)пропионат)). В одном воплощении цианатный сложный эфир (возможно полученный посредством химии CDAP) связывается с гександиамин или ADH (дигидразид адипиновой кислоты), и аминодериватизированный сахарид конъюгируют с белком-носителем с использованием карбодиимидной химии (например, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDAC или EDC)) через карбоксильную группу на белке-носителе. Такие конъюгаты описываются в опубликованной заявке PCT WO 93/15760 Uniformed Services University, WO 95/08348 и WO 96/29094.

В одном воплощении аминокислотный остаток на белке-носителе, с которым связывается антиген, не является остатком аспарагина и в данном случае конъюгат

типично продуцируется химическим конъюгированием. В одном воплощении аминокислотный остаток на белке-носителе, с которым связывается антиген, выбран из группы, состоящей из: Ala, Arg, Asp, Cys, Gly, Glu, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr и Val. Возможно, данная аминокислота представляет собой: аминокислоту, содержащую концевую аминогруппу, лизин, аргинин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, цистеин, тирозин, гистидин или триптофан. Возможно, антиген ковалентно связывается с аминокислотой на белке-носителе, выбранном из: аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, лизина, цистеина, тирозина, гистидина, аргинина или триптофана.

В одном воплощении данный антиген связывается с аминокислотой на белке-носителе, выбранной из аспарагина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, лизина, цистеина, тирозина, гистидина, аргинина или триптофана (например, с аспарагином). В одном воплощении аминокислотный остаток на белке-носителе, с которым связывается антиген, представляет собой остаток аспарагина. В одном воплощении аминокислотный остаток на белке-носителе, с которым связывается антиген, является частью консенсусной последовательности D/E-X-N-Z-S/T (SEQ ID NO: 28) и K-D/E-X-N-Z-S/T-K (SEQ ID NO: 29) (например, аспарагин в консенсусной последовательности D/E-X-N-Z-S/T (SEQ ID NO: 28) и K-D/E-X-N-Z-S/T-K (SEQ ID NO: 29)).

Согласно данному изобретению предложен биоконъюгат, содержащий белок ClfA или Hla, как здесь описано, связанный с капсульным сахаридом *Staphylococcus aureus* (например, с капсульным полисахаридом). В конкретном воплощении данный биоконъюгат содержит белок ClfA или Hla, как здесь описано, и антиген, выбранный из капсульного сахара (например, капсульного полисахарида) серотипа CP5 или CP8 *Staphylococcus aureus*. В одном воплощении данный биоконъюгат содержит антиген ClfA по изобретению и антиген из капсульного сахара (например, капсульного полисахарида) серотипа CP8 *Staphylococcus aureus*. В одном воплощении данный биоконъюгат содержит антиген Hla по изобретению и антиген из капсульного сахара (например, капсульного полисахарида) серотипа CP5 *Staphylococcus aureus*.

Способы получения биоконъюгатов с использованием клеток-хозяев описываются, например, в WO 2003/074687, WO 2006/119987 и WO2011/138361.

Биоконъюгаты могут быть получены в клетке-хозяине, содержащей: одну или более чем одну нуклеиновую кислоту, которая кодирует гликозилтрансферазу(зы);

нуклеиновую кислоту, которая кодирует олигосахарилтрансферазу; нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид по изобретению; и возможно нуклеиновую кислоту, которая кодирует полимеразу (например, *wzy*).

Клетки-хозяева, которых можно использовать для получения биоконъюгатов по изобретению, включают археи, прокариотические клетки-хозяева и эукариотические клетки-хозяева. Типичные прокариотические клетки-хозяева для применения в продукции биоконъюгатов по изобретению включают, без ограничения, виды *Escherichia*, виды *Shigella*, виды *Klebsiella*, виды *Xanthomonas*, виды *Salmonella*, виды *Yersinia*, виды *Lactococcus*, виды *Lactobacillus*, виды *Pseudomonas*, виды *Corynebacterium*, виды *Streptomyces*, виды *Streptococcus*, виды *Staphylococcus*, виды *Bacillus* и виды *Clostridium*. В конкретном воплощении клеткой-хозяином является *E. coli*.

В одном воплощении клетки-хозяева, используемые для получения биоконъюгатов по изобретению, генетически модифицируют так, чтобы они содержали гетерологичные нуклеиновые кислоты, например, гетерологичные нуклеиновые кислоты, которые кодируют один или более чем один белок-носитель, и/или гетерологичные нуклеиновые кислоты, которые кодируют один или более чем один белок, например, гены, кодирующие один или более чем один белок. В конкретном воплощении в клетки-хозяева могут быть введены гетерологичные нуклеиновые кислоты, которые кодируют белки, участвующие в путях гликозилирования (например, прокариотические и/или эукариотические пути гликозилирования). Такие нуклеиновые кислоты могут кодировать белки, включающие, без ограничения, олигосахарилтрансферазы, эпимеразы, флиппазы, полимеразы и/или гликозилтрансферазы. Гетерологичные нуклеиновые кислоты (например, нуклеиновые кислоты, которые кодируют белки-носители и/или нуклеиновые кислоты, которые кодируют другие белки, например, белки, участвующие в гликозилировании) могут быть введены в клетки-хозяева с использованием таких способов, как электропорация, химическая трансформация посредством теплового шока, естественная трансформация, фаговая трансдукция и конъюгирование. В конкретных воплощениях гетерологичные нуклеиновые кислоты вводят в клетки-хозяева с использованием плазмиды, например, данные гетерологичные нуклеиновые кислоты экспрессируются в клетках-хозяевах посредством плазмиды (например, экспрессионного вектора). В другом конкретном воплощении гетерологичные нуклеиновые кислоты вводятся в клетки-хозяева с

использованием способа вставки, описанного в международной патентной заявке № РСТ/ЕР2013/068737 (опубликованной как WO 14/037585).

В клетки-хозяева могут быть введены дополнительные модификации (например, с использованием методик генной инженерии). Например, нуклеиновые кислоты клетки-хозяина (например, гены), которые кодируют белки, которые образуют часть возможно конкурирующего или мешающего пути гликозилирования (например, конкурируют или мешают одному или более чем одному гетерологичному гену, участвующему в гликозилировании, которые рекомбинантно вводятся в клетку-хозяина), могут быть удалены или модифицированы на фоне (генома) клетки-хозяина способом, который делает их неактивными/нефункциональными (т.е. нуклеиновые кислоты клетки-хозяина, которые удаляются/модифицируются, не кодируют функциональный белок или не кодируют белок, каким бы он ни был). При удалении нуклеиновых кислот из генома клеток-хозяев они могут быть заменены требуемой последовательностью, например последовательностью, которая является полезной для продуцирования гликопротеина.

Типичные гены, которые могут быть удалены в клетках-хозяевах (и, в некоторых случаях, заменены другими требуемыми последовательностями нуклеиновых кислот), включают гены клеток-хозяев, участвующие в биосинтезе гликолипидов, такие как *waaL* (см., например, Feldman et al. 2005, PNAS USA 102:3016-3021), кластер биосинтеза ядра липида А (*waa*), галактозный кластер (*gal*), арабинозный кластер (*ara*), кластер кислот толстой кишки (*wc*), кластер капсульных полисахаридов, гены биосинтеза ундекапrenoла-пирофосфата (например, *uppS* (ундекапренилпирофосфатсинтаза), *uppP* (ундекапренилдифосфатаза)), гены рециклирования Und-P, метаболических ферментов, участвующих в биосинтезе сахаров, активированных нуклеотидами, кластер общего антигена энтеробактерий и кластеры модификации О-антигена профага, подобные кластеру *gtrABS*.

Такая модифицированная прокариотическая клетка-хозяин содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие ферменты, способные продуцировать биоконъюгат, содержащий антиген, например, сахаридный антиген, присоединенный к полипептиду по изобретению. Такие клетки-хозяева могут экспрессировать в естественных условиях нуклеиновые кислоты, специфичные в отношении продукции сахаридного антигена, или могут быть получены клетки-хозяева для экспрессии таких нуклеиновых кислот, т.е. в некоторых воплощениях указанные нуклеиновые кислоты

являются гетерологичными по отношению к клеткам-хозяевам. Одна или более чем одна из указанных нуклеиновых кислот, специфичных в отношении продукции сахаридного антигена, может быть гетерологичной по отношению к клетке-хозяину и интегрированной в геном клетки-хозяина. Клетки-хозяева могут содержать нуклеиновые кислоты, кодирующие дополнительные ферменты, активные в N-гликозилировании белков, например, клетки-хозяева дополнительно содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую олигосахарилтрансферазу и/или одну или более чем одну нуклеиновую кислоту, кодирующую другие гликозилтрансферазы.

Последовательности нуклеиновых кислот, содержащие генные кластеры капсульных полисахаридов, могут быть вставлены в клетки-хозяева. Например, генный кластер капсульного полисахарида, вставленный в клетку-хозяина, может представлять собой генный кластер капсульного полисахарида из штамма стафилококка (например, *S. aureus*), как описано ниже.

Клетки-хозяева содержат и/или могут быть модифицированы для содержания нуклеиновых кислот, которые кодируют генетический аппарат (например, гликозилтрансферазы, флиппазы, полимеразы и/или олигосахарилтрансферазы), способный продуцировать гибридные полисахариды, а также генетический аппарат, способный связывать антигены с полипептидом по изобретению.

Капсульные полисахариды *S. aureus* собираются на липиде-носителе бактериальной мембраны – ундекапренилпирофосфате – посредством консервативного пути, который имеет гомологию с зависимым от полимеразы путем синтеза O полисахаридов у грамотрицательных бактерий. Сборка O антигена инициируется переносом сахарофосфата от DP-донора на ундекапренилфосфат. Связанный с липидом O антиген собирается на цитоплазматической стороне внутренней мембраны последовательным действием разных гликозилтрансфераз. Данный гликолипид затем перемещается по типу «флип-флоп» в периплазматическое пространство и полимеризуется. Посредством замены O антигенлигазы WaaL на олигосахарилтрансферазу PglB полимеризованный O антиген может быть перенесен на белок-носитель, а не на ядро липида A.

Клетки-хозяева дополнительно содержат нуклеиновые кислоты, которые кодируют гликозилтрансферазы, которые продуцируют повторяющееся звено полисахарида. Предпочтительно указанное повторяющееся звено не содержит гексозу на восстанавливающем конце, и указанное повторяющееся звено полисахарида

происходит из повторяющегося звена донорного полисахарида, который содержит гексозу на восстанавливаемом конце.

Клетки-хозяева могут содержать нуклеиновую кислоту, которая кодирует гликозилтрансферазу, которая собирает гексозное моносахаридное производное на ундекапренилпирофосфате (Und-PP). В одном аспекте гликозилтрансфераза, которая собирает гексозное моносахаридное производное на Und-PP, является гетерологичной по отношению к клетке-хозяину и/или гетерологичной по отношению к одному или более чем одному гену, который кодирует гликозилтрансферазу(зы). Указанная гликозилтрансфераза может происходить из, например, видов *Escherichia*, видов *Shigella*, видов *Klebsiella*, видов *Xanthomonas*, видов *Salmonella*, видов *Yersinia*, видов *Aeromonas*, видов *Francisella*, видов *Helicobacter*, видов *Proteus*, видов *Lactococcus*, видов *Lactobacillus*, видов *Pseudomonas*, видов *Corynebacterium*, видов *Streptomyces*, видов *Streptococcus*, видов *Enterococcus*, видов *Staphylococcus*, видов *Bacillus*, видов *Clostridium*, видов *Listeria* или видов *Campylobacter*. Обычно гликозилтрансфераза, которая собирает гексозное моносахаридное производное на Und-PP представляет собой *wecA*, возможно из *E. coli* (*wecA* может собирать GlcNAc на UndP из UDP-GlcNAc). Данный гексозный моносахарид может быть выбран из группы, состоящей из глюкозы, галактозы, рамнозы, арабинотола, фукозы и маннозы (например, галактозы).

Клетки-хозяева могут содержать нуклеиновые кислоты, которые кодируют одну или более чем одну гликозилтрансферазу, способную добавлять моносахарид на гексозное моносахаридное производное, собранное на Und-PP. Например, указанной одной или более чем одной гликозилтрансферазой, способной добавлять моносахарид к гексозному моносахаридному производному, может быть галактозилтрансфераза (*wfeD*) из *Shigella boyedii*; галактофуранозилтрансфераза (*wbeY*) из *E. coli* O28; или галактофуранозилтрансфераза (*wfdK*) из *E. coli* O167. Galf-трансферазы (галактофуранозилтрансферазы), такие как *wfdK* и *wbeY*, могут переносить Galf (галактофураноза) от UDP-Galf на –GlcNAc-P-P-ундекафенил. Предпочтительно указанная одна или более чем одна гликозилтрансфераза, способная добавлять моносахарид к гексозному моносахаридному производному, представляет собой галактофуранозилтрансферазу (*wbeY*) из *E. coli* O28 и галактофуранозилтрансферазу (*wfdK*) из *E. coli* O167.

Клетки-хозяева могут содержать нуклеиновые кислоты, которые кодируют гликозилтрансферазы, которые собирают повторяющееся звено донорного

полисахарида на гексозном моносахаридном производном. Гликозилтрансферазы, которые собирают повторяющееся звено донорного полисахарида на гексозном моносахаридном производном, могут включать гликозилтрансферазу, которая способна добавлять гексозный моносахарид, присутствующий на восстанавливающем конце первого повторяющегося звена донорного полисахарида, на гексозное моносахаридное производное. Типичные гликозилтрансферазы включают галактозилтрансферазы (*wciP*), например, *wciP* из *E. coli* O21.

Гликозилтрансферазы, которые собирают повторяющееся звено донорного полисахарида на гексозном моносахаридном производном, включают гликозилтрансферазу, которая способна добавлять моносахарид, который является смежным гексозному моносахариду, присутствующему на восстанавливающем конце первого повторяющегося звена донорного полисахарида, на гексозный моносахарид, присутствующий на восстанавливающем конце первого повторяющегося звена донорного полисахарида. Типичные гликозилтрансферазы включают глюкозилтрансферазу (*wciQ*), например, *wciQ* из *E. coli* O21.

Клетка-хозяин может содержать гликозилтрансферазы для синтеза повторяющихся звеньев полисахарида, выбранные из генного кластера CP5 или CP8 *Staphylococcus aureus*. CP5 и CP8 *S. aureus* имеют структуру, аналогичную структуре генов синтеза антигена O11 *P. aeruginosa*, таким образом, что данные гены можно объединять с генами синтеза моносахаридов *E. coli* для синтеза ундекапренилпирофосфат-связанного полимера CP5 или CP8, состоящего из повторяющихся трисахаридных звеньев.

Гликозилтрансферазы, достаточные для синтеза повторяющихся звеньев сахара CP5 или CP8, содержат *capH*, *capI*, *capJ* и/или *capK* из CP5 или CP8 *S. aureus*. Возможно, клетка-хозяин также содержит *capD*, *capE*, *capF*, *capG*, *capL*, *capM*, *capN*, *capO*, *capP* из CP5 или CP8 *S. aureus*. В качестве альтернативы, клетка-хозяин также содержит *wbjB*, *wbjC*, *wbjD*, *wbjE*, *wbjF*, *wbjL*, *wbpM*, *wzz* и/или *wzx* из O11 *P. aeruginosa* и *wecB*, *wecC* из O16 *E. coli*.

Гликозилтрансферазы, достаточные для синтеза повторяющихся звеньев сахара CP5, содержат *capH*, *capI*, *capJ* и/или *capK* из CP5 *S. aureus*. Возможно, клетка-хозяин также содержит *capD*, *capE*, *capF*, *capG*, *capL*, *capM*, *capN*, *capO*, *capP* из CP5 *S. aureus*. В качестве альтернативы, клетка-хозяин также содержит *wbjB*, *wbjC*, *wbjD*, *wbjE*, *wbjF*, *wbjL*, *wbpM*, *wzz* и/или *wzx* из O11 *P. aeruginosa* и *wecB*, *wecC* из O16

E. coli.

Клетка-хозяин может содержать гликозилтрансферазы, которые собирают повторяющееся звено донорного полисахарида на гексозном моносахаридном производном, включают гликозилтрансферазу, которая способна добавлять гексозный моносахарид, присутствующий на восстанавливаемом конце первого повторяющегося звена донорного полисахарида, на гексозное моносахаридное производное.

N-связанное гликозилирование белка – добавление углеводных молекул на остаток аспарагина в полипептидной цепи белка-мишени – осуществляется ферментативным комплексом олигосахарилтрансферазы (OST), ответственным на перенос предварительно собранного олигосахарида от липидного носителя (долихолфосфат) на остаток аспарагина растущего белка в пределах консервативной последовательности Asn-X-Ser/Thr (где X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина) в эндоплазматическом ретикулуме.

Также было показано, что бактерия – передающийся через пищу патоген *Campylobacter jejuni* – также может N-гликозилировать свои белки (Wacker *et al. Science*. 2002; 298(5599):1790-3) из-за того, что она содержит свой собственный аппарат гликозилирования. Аппарат, ответственный за данную реакцию, кодируется кластером, именуемым «pgl» (для гликозилирования белка).

Аппарат гликозилирования *C. jejuni* может быть перенесен в *E. coli* для обеспечения гликозилирования рекомбинантных белков, экспрессируемых клетками *E. coli*. Предыдущие исследования продемонстрировали как получать штаммы *E. coli*, которые могут осуществлять N-гликозилирование (см., например, Wacker *et al. Science*. 2002; 298 (5599):1790-3; Nita-Lazar *et al. Glycobiology*. 2005; 15(4):361-7; Feldman *et al. Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(8):3016-21; Kowarik *et al. EMBO J*. 2006; 25(9):1957-66; Wacker *et al. Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(18):7088-93; № публикаций международных патентных заявок WO2003/074687, WO2006/119987, WO 2009/104074, WO/2011/06261 и WO2011/138361). Мутанты PglB, имеющие оптимизированные свойства, описываются в WO2016/107818. Предпочтительным мутантом является PglB_{сuo} N311V-K482R-D483H-A669V.

Олигосахарилтрансферазы переносят связанные с липидом олигосахарида на остатки аспарагина растущих полипептидных цепей, которые содержат консенсусный мотив N-гликозилирования, например, Asn-X-Ser(Thr), где X может представлять собой любую аминокислоту, за исключением Pro; или Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z

независимо выбраны из любой природной аминокислоты, за исключением Pro (см. WO 2006/119987). См., например, WO 2003/074687 и WO 2006/119987.

Клетки-хозяева содержат нуклеиновую кислоту, которая кодирует олигосахарилтрансферазу. Нуклеиновая кислота, которая кодирует олигосахарилтрансферазу, может быть нативной для клетки-хозяина или может быть введена в клетку-хозяина с использованием генетических методов, как описано выше. Предпочтительно данная олигосахарилтрансфераза представляет собой олигосахарилтрансферазу из *Campylobacter*, в особенности из *Campylobacter jejuni* (т.е. *pglB*; см., например, Wacker et al. 2002, Science 298:1790-1793; см. также, например, ID гена NCBI: 3231775, № доступа UniProt O86154).

Следовательно, биоконъюгаты капсульных полисахаридов *S. aureus* могут быть продуцированы в прокариотической клетке-хозяине, содержащей (i) гликозилтрансферазу, происходящую из кластера капсульных полисахаридов *S. aureus*, где указанная гликозилтрансфераза интегрирована в геном указанной клетки-хозяина; и (ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую олигосахарилтрансферазу (например, *pglB* из *Campylobacter jejuni*), где указанная нуклеиновая кислота, кодирующая олигосахарилтрансферазу, переносится плазмидой и/или интегрируется в геном клетки-хозяина; и (iii) полипептид по изобретению, где указанный полипептид кодируется либо геном, переносимым плазмидой, либо интегрированным в геном клетки-хозяина. Ген *waaL* клетки-хозяина может быть функционально инактивированным или удаленным, например, замененным нуклеиновой кислотой, кодирующей олигосахарилтрансферазу, например, *pglB C. jejuni*.

Для получения поли- и олигосахаридов капсульных сахаридов в клетку-хозяина вводится полимераз (например, *wzy*) (т.е. полимераз является гетерологичной по отношению к клетке-хозяину). Для продукции CP5 и CP8 *S. aureus* полимеразой, введенной в клетки-хозяева, является ген *wzy* из генного кластера капсульных полисахаридов CP5 или CP8 *S. aureus* (*cap5J/cap8I*).

Наконец, в клетку-хозяина вводится флиппаза (*wzx* или гомолог) (т.е. флиппаза является гетерологичной по отношению к клетке-хозяину). Флиппазы транслоцируют повторяющиеся звенья дикого типа и/или соответствующие генетически модифицированные (гибридные) повторяющиеся звенья из цитоплазмы в периплазму клеток-хозяев (например, *E. coli*). Таким образом, клетка-хозяин может содержать нуклеиновую кислоту, которая кодирует флиппазу (*wzx*). Предпочтительно в клетку-

хозяина вводится флиппаза биосинтетического пути капсульного полисахарида *S. aureus*. Флиппазой, введенной в клетки-хозяева, может быть ген *capK* из генного кластера капсульных полисахаридов CP5 или CP8 *S. aureus*. Другие флиппазы, которые могут вводиться в клетки-хозяева, происходят, например, из *Campylobacter jejuni* (например, *pglK*).

Биоконъюгаты по изобретению могут быть очищены, например, хроматографией (например, ионообменной, катионообменной, анионообменной, аффинной и гель-фильтрационной колоночной хроматографией), центрифугированием, дифференциальной растворимостью или любой другой стандартной методикой очистки белков. См., например, Saraswat *et al.* 2013, Biomed. Res. Int. ID#312709 (p. 1-18); см. также способы, описанные в WO 2009/104074. Кроме того, биоконъюгаты могут быть слиты с последовательностями гетерологичных полипептидов, описанными здесь или известными иным образом, для облегчения очистки. Например, белок Hla может включать пептидную метку, такую как метка HRHR, для очистки посредством обмена катионов (например, SEQ ID NO: 12). Фактические условия, использованные для очистки конкретного биоконъюгата, будут частично зависеть от стратегии синтеза и от таких факторов, как нетто заряд, гидрофобность и/или гидрофильность биоконъюгата, и будут ясными для специалистов в данной области.

Другим аспектом настоящего изобретения является способ получения биоконъюгата, который содержит антиген ClfA или Hla, связанный с сахаридом, (или состоит из него) причем указанный способ включает (i) культивирование клеток-хозяев по изобретению при подходящих условиях для продуцирования белков (и, возможно, при подходящих условиях для продуцирования сахаридов) и (ii) выделение биоконъюгата, продуцированного указанной клеткой-хозяином.

Другим аспектом настоящего изобретения является биоконъюгат, полученный способом по изобретению, где указанный биоконъюгат содержит полисахарид *S. aureus*, связанный с антигеном ClfA или Hla.

Иммуногенные композиции и вакцины

Иммуногенная композиция по настоящему изобретению перед введением субъекту может быть приготовлена в фармацевтических композициях. Согласно одному аспекту в данном изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая иммуногенную композицию по изобретению и фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель.

Согласно настоящему изобретению также предложена вакцина, содержащая иммуногенную композицию по изобретению и фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель.

Также предложена адъювантная композиция для применения с данными иммуногенными композициями и вакцинами по изобретению, как здесь описано, которая содержит адъювант и фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель.

Фармацевтически приемлемые эксципиенты или носители могут быть выбраны специалистами в данной области. Например, фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель может включать буфер, такой как Tris (триметиламин), фосфатный (например, фосфат натрия), ацетатный, боратный (например, борат натрия), цитратный, глициновый, гистидиновый и сукцинатный (например, сукцинат натрия), подходящим образом, хлорид натрия, гистидин, фосфат натрия или сукцинат натрия. Фармацевтически приемлемый эксципиент может включать соль, например, хлорид натрия, хлорид калия или хлорид магния. Возможно, фармацевтически приемлемый эксципиент содержит по меньшей мере один компонент, который стабилизирует растворимость и/или стабильность. Примеры солюбилизаторов/стабилизаторов включают детергенты, например, лаурелсаркозин и/или полисорбат (например, TWEEN™ 80). Примеры стабилизаторов также включают полоксамер (например, полоксамер 124, полоксамер 188, полоксамер 237, полоксамер 338 и полоксамер 407). Фармацевтически приемлемый эксципиент может включать неионное поверхностно-активное вещество, например, сложные эфиры жирных кислот и полиоксиэтиленсорбитана, полисорбат-80 (TWEEN™ 80), полисорбат-60 (TWEEN™ 60), полисорбат-40 (TWEEN™ 40) и полисорбат-20 (TWEEN™ 20), или алкиловые простые эфиры полиоксиэтилена (подходящим образом – полисорбат-80). Альтернативные солюбилизаторы/стабилизаторы включают аргинин и стеклообразующие полиолы (такие как сахароза, трегалоза и тому подобное). Фармацевтически приемлемый эксципиент может представлять собой консервант, например, фенол, 2-феноксизтанол или тиомерсал. Другие фармацевтически приемлемые эксципиенты включают сахара (например, лактоза, сахароза) и белки (например, желатин и альбумин). Фармацевтически приемлемые носители включают воду, физиологические растворы, водную декстрозу и растворы глицерина. Многочисленные фармацевтически приемлемые эксципиенты и носители описываются, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, E. W. Martin, Mack Publishing Co.

Easton, PA, 5th Edition (975).

В одном воплощении данные композиции содержат буфер. pH жидкого препарата корректируют с учетом компонентов композиции и необходимой пригодность для введения субъекту. Подходящим образом, pH жидкой смеси составляет по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 5,5, по меньшей мере 5,8, по меньшей мере 6. pH жидкой смеси может составлять меньше, чем 9, меньше, чем 8, меньше, чем 7,5 или меньше, чем 7. В других воплощениях pH жидкой смеси составляет от 4 до 9, от 5 до 8, как например от 5,5 до 8.

Подходящий буфер может быть выбран из ацетатного, цитратного, гистидинового, малеатного, фосфатного, сукцинатного, тартратного и TRIS. В одном воплощении буфер представляет собой фосфатный буфер, такой как $\text{Na}/\text{Na}_2\text{PO}_4$, $\text{Na}/\text{K}_2\text{PO}_4$ или $\text{K}/\text{K}_2\text{PO}_4$.

Данный буфер может присутствовать в жидкой смеси в количестве по меньшей мере 6 мМ, по меньшей мере 10 мМ или по меньшей мере 40 мМ. Данный буфер может присутствовать в жидкой смеси в количестве меньше, чем 100 мМ, меньше, чем 60 мМ или меньше, чем 40 мМ.

В одном воплощении композиции по настоящему изобретению имеют фармацевтически приемлемую осмоляльность для того, чтобы избежать деформации или лизиса клеток. Фармацевтически приемлемая осмоляльность обычно будет означать то, что растворы будут иметь осмоляльность, которая является приблизительно изотоничной или слегка гипертоничной. Подходящим образом, композиции по настоящему изобретению при растворении будут иметь осмоляльность в интервале от 250 до 750 мОсм/кг, например, осмоляльность может находиться в интервале от 250 до 550 мОсм/кг, как например в интервале от 280 до 500 мОсм/кг.

Осмоляльность можно измерять согласно методикам, известным в данной области, как например посредством применения имеющегося в продаже осмометра, например, модели 2020 Advanced®, доступной от Advanced Instruments Inc. (США).

«Изотоничный агент» представляет собой соединение, которое является физиологически переносимым и придает препарату подходящую тоничность для того, чтобы предотвращать чистый поток воды через клеточные мембраны, которые находятся в контакте с препаратом. В некоторых воплощениях изотоничный агент, используемый для композиции, представляет собой соль (или смесь солей). В других воплощениях, однако, данная композиция содержит неионный изотоничный агент, и

концентрация хлорида натрия в данной композиции составляет меньше, чем 100 мМ, как например меньше, чем 80 мМ, например, меньше, чем 50 мМ, как например меньше 40 мМ, меньше, чем 30 мМ и особенно меньше, чем 20 мМ. Ионная сила в данной композиции может составлять меньше, чем 100 мМ, как например меньше, чем 80 мМ, например, меньше, чем 50 мМ, как например меньше, чем 40 мМ или меньше, чем 30 мМ.

В конкретном воплощении неионный изотоничный агент представляет собой полиол, такой как сорбит. Концентрация сорбита может составлять, например, от примерно 3% до примерно 15% (масс./об.), как например от примерно 4% до примерно 10% (масс./об.). Адьюванты, содержащие иммунологически активную фракцию сапонины и агонист TLR4, где изотоничный агент представляет собой соль или полиол, были описаны в WO2012/080369.

В одном воплощении композиции по изобретению дополнительно содержат одну или более чем одну соль, например, хлорид натрия, хлорид кальция, фосфат натрия, моносодия глутамат и соли алюминия (например, гидроксид алюминия, фосфат алюминия, Алюм (калия алюминия сульфат) или смесь таких солей алюминия). В других воплощениях композиции по изобретению не содержат соль.

Согласно данному изобретению также предложен способ получения иммуногенной композиции или вакцины по изобретению, включающий стадию смешивания антигенов по изобретению с фармацевтически приемлемым эксципиентом или носителем.

Иммуногенные композиции содержат иммунологически эффективное количество белка или конъюгата (например, биоконъюгата) по изобретению, а также любые другие компоненты. «Под иммунологически эффективным количеством» подразумевается то, что введение данного количества индивиду либо в виде одиночной дозы, либо как часть серии, является эффективным для лечения или предупреждения. Данное количество варьирует, в зависимости от здоровья и физического состояния подлежащего лечению индивида, возраста, требуемой степени защиты, композиции вакцины и других релевантных факторов. Ожидается то, что данное количество будет попадать в относительно широкий интервал, который может быть определен посредством традиционных испытаний.

Получение вакцины в общем описано в Vaccine Design (“The subunit and adjuvant approach” (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York).

Инкапсуляция в пределах липосом описывается Fullerton, патент США 4235877.

Иммуногенные композиции и вакцины по изобретению могут быть включены в контейнер, упаковку или дозатор, наряду с инструкциями для введения. Согласно настоящему изобретению предложен набор, содержащий (i) первый контейнер, содержащий иммуногенную композицию или вакцину по изобретению; и (ii) второй контейнер, содержащий адъювант, как здесь описано.

Адъюванты

В одном воплощении иммуногенные композиции по изобретению содержат или вводятся в комбинации с адъювантом. Адъювант для введения в комбинации с иммуногенной композицией по изобретению может вводиться до, сопутствующе с или после введения указанной иммуногенной композиции или вакцины. В одном воплощении указанный адъювант смешивается с иммуногенной композицией перед введением.

Адъюванты могут усиливать иммунный ответ несколькими механизмами, включающими, например, рекрутинг лимфоцитов, стимуляцию В- и/или Т-клеток и стимуляцию макрофагов. В одном воплощении адъювант выбирают так, чтобы он был предпочтительным индуктором ответа либо TH1, либо TH2 типа, предпочтительно ответа TH1 типа. Высокие уровни цитокинов Th1-типа имеют тенденцию к тому, чтобы благоприятствовать индукции клеточно-опосредованных иммунных ответов на данный антиген, тогда как высокие уровни цитокинов Th2-типа имеют тенденцию к тому, чтобы благоприятствовать индукции гуморальных иммунных ответов на данный антиген. Важно помнить то, что различие иммунного ответа Th1- и Th2-типа не является абсолютным. В реальности у индивида будет поддерживаться иммунный ответ, который описывается как преимущественно Th1 или преимущественно Th2. Однако часто удобно рассматривать семейства цитокинов в показателях того, как описано у клонов мышинных CD4-позитивных Т-клеток Mosmann и Coffman (Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*, 7, p145-173). Традиционно ответы Th1-типа ассоциированы с продукцией Т-лимфоцитами цитокинов IFN- γ (интерферон-гамма) и IL-2 (интерлейкин-2). Другие цитокины, часто непосредственно ассоциированные с индукцией иммунных ответов Th1-типа, не продуцируются Т-клетками, как например IL-12. В отличие от этого, ответы Th2-типа ассоциированы с секрецией IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Подходящие адъювантные системы,

которые стимулируют преимущественно Th1 ответ, включают: монофосфориллипид А или его производное, в частности, 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А (3D-MPL) (относительно его получения, см. GB 2220211 А); MPL, например, например, 3D-MPL и сапонин QS21 в липосоме, например, в липосоме, содержащей холестерин и DPOC; и комбинацию монофосфориллипида А, например, 3-де-О-ацилированного монофосфориллипида А, вместе либо с солью алюминия (например, фосфатом алюминия или гидроксидом алюминия), либо с эмульсией типа «масло в воде». В таких комбинациях антиген и 3D-MPL может содержаться в тех же самых структурах в виде частиц, обеспечивая более эффективную доставку антигенных и иммуностимулирующих сигналов. Исследования показали, что 3D-MPL способен дополнительно усиливать иммуногенность антигена, адсорбированного на алюме (Thoelen *et al.* Vaccine (1998) 16:708-14; EP 689454-B1).

В одном воплощении адъювант содержит как агонист TLR4, так и иммунологически активный сапонин. В одном воплощении агонист TLR4 представляет собой липополисахарид. Подходящим образом, сапонин содержит активную фракцию сапонины, полученного из коры *Quillaja saponaria* Molina, как например QS21. Подходящим образом, липополисахарид представляет собой производное липида А, такое как 3D-MPL. В конкретном воплощении липополисахарид представляет собой 3D-MPL, и иммунологически активный сапонин представляет собой QS21. В одном воплощении композиция указанного адъюванта содержит липополисахарид и иммунологически активный сапонин в липосомном препарате. Подходящим образом, в одном виде данного воплощения адъювант по существу состоит из 3D-MPL и QS21, возможно со стеринном, который предпочтительно представляет собой холестерин.

Размер липосом может варьировать от 30 нм до нескольких мкм, в зависимости от состава фосфолипидов и способа, использованного для их получения. В конкретных воплощениях настоящего изобретения размер липосом будет находиться в интервале от 50 нм до 500 нм, и в других воплощениях – от 50 нм до 200 нм. Оптимально липосомы должны быть стабильными и иметь диаметр порядка 100 нм для обеспечения стерилизации посредством фильтрации.

Другие агонисты TLR4, которые могут быть полезными в настоящем изобретении, включают адъювант в виде глюкопиранозиллипида (GLA), как например описано в WO2008/153541 или WO2009/143457, или в литературных статьях Coler RN *et al.* (2011) Development and Characterization of Synthetic Glucopyranosyl Lipid Adjuvant

System as a Vaccine Adjuvant. PLoS ONE 6(1): e16333. doi:10.1371/journal.pone.0016333 и Arias MA et al. (2012) Glucopyranosyl Lipid Adjuvant (GLA), a Synthetic TLR4 Agonist, Promotes Potent Systemic and Mucosal Responses to Intranasal Immunization with HIVgp140. PLoS ONE 7(7): e41144. doi:10.1371/journal.pone.0041144. WO2008/153541 или WO2009/143457 включены в настоящее описание посредством ссылки с целью определения агонистов TLR4, которые могут быть полезными в настоящем изобретении.

4'-Монофосфориллипид А (MPL), который можно получать кислотным гидролизом LPS, экстрагированного из неочищенного мутантного штамма грамотрицательных бактерий, сохраняет адьювантные свойства LPS при одновременной демонстрации токсичности, которая уменьшается более чем в 1000 раз (при измерении посредством летальной дозы в яйцах с эмбрионами курицы) (Johnson *et al.* 1987 *Rev. Infect. Dis.* 9 Suppl:S512-S516). LPS типично кипятят с обратным холодильником в растворах неорганических кислот умеренной силы (например, 0,1 М HCl) в течение периода приблизительно 30 минут. Данный процесс приводит к дефосфорилированию в положении 1 и к декарбогидрированию в положении 6' с получением MPL.

3-О-деацетилированный монофосфориллипид А (3D-MPL), который может быть получен мягким щелочным гидролизом MPL, имеет еще более пониженную токсичность, в то же время сохраняя адьювантность, см. US4912094 (Ribi Immunochemicals). Щелочной гидролиз типично проводится в органическом растворителе, таком как смесь хлороформа/метанола, посредством насыщения водного раствора слабого основания, такого как 0,5 М карбонат натрия, при pH 10,5. Дополнительная информация по получению 3D-MPL доступна, например, в US4912094 и WO02/078637 (Corixa Corporation).

Сапонины *Quillaja* представляют собой смесь гликозидов тритерпенов, экстрагированную из коры дерева *Quillaja saponaria*. Неочищенные сапонины широко применяли в качестве ветеринарных адьювантов. Quil-A представляет собой частично очищенный водный экстракт сапонинового вещества *Quillaja*. Quil A представляет собой сапониновый препарат, выделенный из южно-американского дерева *Quillaja saponaria Molina*, и он был впервые описан Dalsgaard *et al.* в 1974 ("Saponin adjuvants", *Archiv. für die gesamte Virusforschung*, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p243-254) как имеющий адьювантную активность. Очищенные фрагменты Quil A, которые

сохраняют адъювантную активность без токсичности, ассоциированной с Quil A (EP 0362278), например, QS7 и QS21 (также известные как QA7 и QA21), были выделены посредством ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография). QS-21 представляет собой природный сапонин, происходящий из коры *Quillaja saponaria* Molina, который индуцирует цитотоксические Т-клетки CD8⁺ (CTL), клетки Th1 и преобладающий ответ антитела IgG2a, и он является предпочтительным сапонином в контексте настоящего изобретения. QS21 представляет собой очищенную ВЭЖХ нетоксичную фракцию Quil A, и его способ получения раскрывается (в виде QA21) в патенте США № 5057540. Предпочтительно данный адъювант содержит QS21 в по существу чистой форме, таким образом, что QS21 является по меньшей мере на 90% чистым, например, по меньшей мере на 95% чистым или по меньшей мере на 98% чистым.

Адъюванты, содержащие комбинации липополисахарида и сапонинов *Quillaja*, были раскрыты раньше, например, в EP0671948. В этом патенте продемонстрирована сильная синергия при объединении липополисахарида (3D-MPL) с сапонином *Quillaja* (QS21). Хорошие адъювантные свойства могут достигаться с комбинациями липополисахарида и сапонины *Quillaja* в качестве иммуностимуляторов в адъювантной композиции, даже когда иммуностимуляторы присутствуют в человеческой дозе в малых количествах, как описано в WO2007/068907.

В конкретном воплощении QS21 предоставляется в его менее реактогенной композиции, где он гасится экзогенным стеринном, таким как например холестерин. Существуют несколько конкретных форм менее реактогенных композиций, в которых QS21 гасится экзогенным холестерином. В конкретном воплощении сапонин/стерин находится в виде липосомной структуры (WO 96/33739, Пример 1). В этом воплощении липосомы подходящим образом содержат нейтральный липид, например, фосфатидилхолин, который, подходящим образом, является некристаллическим при комнатной температуре, например, фосфатидилхолин яичного желтка, диолеилфосфатидилхолин (DOPC) или дилаурилфосфатидилхолин. Липосомы также могут содержать ограниченное количество заряженного липида, который увеличивает стабильность структуры липосома-сапонин для липосом, состоящих из насыщенных липидов. В этих случаях количество заряженного липида подходящим образом составляет 1-20% масс./масс., предпочтительно 5-10% масс./масс. липосомной композиции. Подходящие примеры таких заряженных липидов включают

фосфатидилглицерин и фосфатидилсерин. Подходящим образом, нейтральные липосомы будут содержать меньше, чем 5% масс./масс. заряженного липида, как например меньше, чем 3% масс./масс. или меньше, чем 1% масс./масс. Отношение стерина к фосфолипиду составляет 1-50% (моль/моль), подходящим образом 20-25%.

Подходящие стеринны включают β -ситостерин, стигмастерин, эргостерин, эргокальциферин и холестерин. В одном конкретном воплощении данная адъювантная композиция содержит в качестве стерина холестерин. Данные стеринны хорошо известны в данной области, например холестерин раскрыт в Merck Index, 11-е изд., стр. 341, как встречающийся в природе стерин, находящийся в животном жире.

Когда фракцией активного сапонины является QS21, отношение QS21:стерин типично будет иметь порядок от 1:100 до 1:1 (масс./масс.), подходящим образом, от 1:10 до 1:1 (масс./масс.), и предпочтительно от 1:5 до 1:1 (масс./масс.). Подходящим образом присутствует избыток стерина, причем отношение QS21:стерин составляет по меньшей мере 1:2 (масс./масс.). В одном воплощении отношение QS21:стерин составляет по меньшей мере 1:5 (масс./масс.). Стерин подходящим образом представляет собой холестерин.

3D-MPL GlaxoSmithKline Biologicals S.A. продает под названием MPL, и он повсюду в настоящем документе называется MPL или 3D-MPL. См., например, патенты США № 4436727; 4877611; 4866034 и 4912094. 3D-MPL, главным образом, стимулирует ответы Т-клеток CD4⁺ с фенотипом IFN- γ (Th1). 3D-MPL может быть продуцирован согласно способам, раскрытым в GB 2220211 A. Химически он представляет собой смесь 3-деацилированного монофосфориллипида А с 3, 4, 5 или 6 ацилированными цепями. Предпочтительно в композициях по настоящему изобретению используются маленькие частицы 3D-MPL. Маленькие частицы 3D-MPL имеют такой размер частиц, что они могут быть подвергнуты стерилизующей фильтрации через 0,22 мкм фильтр. Такие препараты описываются в WO 94/21292.

Подходящими адъювантными композициями являются композиции, в которых липосомы исходно готовят без MPL (как описано в WO 96/33739), и затем добавляют MPL, подходящим образом в виде маленьких частиц меньше 100 нм или частиц, которые поддаются стерилизующей фильтрации через 0,22 мкм мембрану. Этот MPL, следовательно, не содержится в пределах везикулярной мембраны (известный как MPL out). Композиции, где MPL содержится в пределах везикулярной мембраны (известные как MPL in), также образуют аспект настоящего изобретения. Данный антиген может

содержаться в пределах везикулярной мембраны или содержаться вне везикулярной мембраны.

Для максимального размера партии 12 г получение нерасфасованного жидкого объема MPL осуществляется в стерильных стеклянных контейнерах. Диспергирование MPL состоит из следующих стадий: суспендировать порошок MPL в воде для инъекции; разъединить любые большие агрегаты посредством нагревания (тепловая обработка; уменьшить размер частиц до 100 нм – 200 нм посредством микрофлюидизации; предварительно фильтровать композицию на предфильтрующей установке Sartoclean, 0,8/0,65 мкм; подвергнуть композицию стерилизующей фильтрации при комнатной температуре (установка Sartobran P, 0,22 мкм).

Порошок MPL лиофилизуется посредством микрофлюидизации, что приводит к стабильной коллоидной водной дисперсии (частицы MPL чувствительного к стерилизующей фильтрации размера). Лиофилизированный порошок MPL диспергируется в воде для инъекции для того, чтобы получать неочищенную суспензию в концентрации 10 мг/мл. Данная суспензия затем подвергается тепловой обработке при перемешивании. После охлаждения до комнатной температуры начинается процесс микрофлюидизации для того, чтобы уменьшать размер частиц. Микрофлюидизация проводится с использованием прибора Microfluidics M110EH, посредством непрерывной циркуляции дисперсии через камеру взаимодействия микрофлюидизации при определенном давлении в течение минимального количества пассажей (число циклов: $n_{\min}$). Продолжительность микрофлюидизации, представляющая число циклов, рассчитывается на основе измеренной скорости тока и объема дисперсии. На данном оборудовании при данном давлении образующаяся скорость потока может варьировать от одной камеры взаимодействия до другой и на протяжении всего жизненного цикла конкретной камеры взаимодействия. В настоящем примере использованной камерой взаимодействия является Microfluidics типа F20Y. Поскольку эффективность микрофлюидизации связана с парой давление – скорость потока, время обработки может варьировать от одной партии к другой. Время, требующееся для 1 цикла, рассчитывается на основе скорости потока. Скорость потока, подлежащая рассмотрению, представляет собой скорость потока, измеренную с водой для инъекции сразу перед введением MPL в установку. Один цикл определяется как время (в минутах), требующееся для прохождения всего объема MPL один раз через установку. Время, требующееся для получения n циклов, рассчитывается следующим

образом:

$$\frac{n \times \text{количество MPL для обработки (мл)} }{\text{скорость потока (мл/мин)}}$$

Число циклов, таким образом, адаптируется соответствующим образом. Минимальное количество циклов для проведения ($n_{\min}$) описывается для предпочтительного оборудования и используемых камер взаимодействия. Общее число циклов для проведения определяется результатом измерения размера частиц, проведенного после $n_{\min}$ циклов. Определяется предел размера частиц ($d_{\lim}$) на основе данных истории. Данное измерение осуществляется методикой фотонной корреляционной спектроскопии (PCS), и $d_{\lim}$ выражается как одновысший результат (Z_{average}). Под данным пределом микрофлюидизация может останавливаться после $n_{\min}$ циклов. Выше данного предела микрофлюидизация продолжается до получения удовлетворительного уменьшения размера, в течение максимум еще 50 циклов.

Если фильтрование не происходит немедленно после микрофлюидизации, диспергированный MPL хранят при от +2 до +8°C при ожидании переноса в фильтрационную область.

После микрофлюидизации данную дисперсию разводят водой для инъекции и подвергают стерилизующему фильтрованию через 0,22 мкм фильтр под ламинарным потоком. Конечная концентрация MPL составляет 1 мг/мл (0,80-1,20 мг/мл).

В процессе получения липосом, содержащих MPL, DOPC (диолеилфосфатидилхолин), холестерин и MPL растворяют в этаноле. Липидная пленка образуется посредством выпаривания растворителя под вакуумом. Добавляют фосфатно-солевой буферный раствор (9 mM Na_2HPO_4 , 41 mM KH_2PO_4 , 100 mM NaCl) с pH 6,1, и данную смесь подвергают предварительной гомогенизации, с последующей гомогенизацией под высоким давлением при 103,4 МПа (около 15-20 циклов). Это приводит к получению липосом, которые подвергают стерилизующей фильтрации через 0,22 мкм мембрану в асептической (класс 100) области. Стерильный продукт затем распределяют в стерильные стеклянные контейнеры и хранят в холодной комнате (от +2 до +8°C).

Этим способом полученные липосомы содержат MPL в мембране («MPL» в воплощении WO 96/33739).

Добавляют QS21 в водном растворе до желательной концентрации.

Адьювант AS01 содержит 3D-MPL и QS21 в форме, гашеной холестерином, и он был получен, как описано в WO 96/33739. В частности, адьювант AS01 был получен по

существу как в Примере 1.1 в WO 96/33739. Адъювант AS01_B содержит: липосомы, которые, в свою очередь, содержат диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), холестерин и 3D MPL [в количестве 1000 мкг DOPC, 250 мкг холестерина и 50 мкг 3D-MPL, причем каждое значение дается приблизительно на дозу вакцины], OS21 [50 мкг/дозу], буфер на основе фосфата и NaCl и воду до объема 0,5 мл.

Адъювант AS01_E содержит те же самые ингредиенты, что и AS01_B, но в меньшей концентрации в количестве 500 мкг DOPC, 125 мкг холестерина, 25 мкг 3D-MPL и 25 мкг QS21, буфер на основе фосфата и NaCl и воду до объема 0,5 мл.

В предпочтительном воплощении адъювантом, используемым в настоящем изобретении, является AS01_E.

Способ введения

В одном аспекте иммуногенная композиция или вакцина по изобретению вводится внутримышечным путем доставки. Внутримышечное введение может осуществляться в бедро или плечо. Инъекция типично осуществляется через иглу (например, подкожную иглу). Типичная внутримышечная доза составляет 0,5 мл, как описано ниже.

Дозировка

Количество конъюгированного антигена в каждой дозе иммуногенной композиции или вакцины выбирают как количество, которое индуцирует иммунопротекторный ответ без значительных вредных побочных эффектов в типичных вакцинах. Такое количество будет варьировать, в зависимости от того, какой конкретный иммуноген используется и как он представлен. Содержание каждого белкового антигена типично будет находиться в интервале 1-200 мкг, подходящим образом 1-100 мкг, подходящим образом 5-50 мкг. Содержание каждого сахаридного антигена типично будет находиться в интервале 0,1-50 мкг, подходящим образом 0,1-10 мкг, подходящим образом 1-5 мкг.

Доза, которая представляет собой объем, подходящий для применения человеком, обычно составляет от 0,25 до 1,5 мл, хотя для введения в кожу может использоваться меньший объем - от 0,05 мл до 0,2 мл. В одном воплощении человеческая доза составляет 0,5 мл. В другом воплощении человеческая доза выше, чем 0,5 мл, например, 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 или 1 мл. В другом воплощении человеческая доза составляет от 1 мл до 1,5 мл. В другом воплощении, в частности, когда иммуногенная композиция предназначена для детей, человеческая доза может быть

меньше, чем 0,5 мл, как например от 0,25 до 0,5 мл.

Когда иммуногенная композиция содержит адъювант, содержащий 3D-MPL и QS21, QS21 и 3D-MPL предпочтительно присутствуют в такой же конечной концентрации на человеческую дозу иммуногенной композиции. В одном воплощении человеческая доза иммуногенной композиции содержит 3D-MPL на уровне около 25 мкг, например, 20-30 мкг, подходящим образом, 21-29 мкг или 22-28 мкг, или от 23 до 27 мкг, или от 24 до 26 мкг, или 25 мкг. В одном воплощении человеческая доза иммуногенной композиции содержит QS21 на уровне около 25 мкг, например, 20-30 мкг, подходящим образом – 21-29 мкг или 22-28 мкг, или 23-27 мкг, или от 24 до 26 мкг, или 25 мкг. В предпочтительном воплощении человеческая доза иммуногенной композиции содержит конечный уровень 25 мкг 3D-MPL и 25 мкг QS21. В другом воплощении человеческая доза иммуногенной композиции содержит конечный уровень 50 мкг 3D-MPL и 50 мкг QS21.

Когда иммуногенная композиция предназначена для применения в комбинации с адъювантной композицией, содержащей 3D-MPL и QS21, QS21 и 3D-MPL предпочтительно присутствуют в такой же конечной концентрации на человеческую дозу адъювантной композиции. В одном воплощении человеческая доза адъювантной композиции содержит 3D-MPL на уровне примерно 25 мкг, например, 20-30 мкг, подходящим образом, 21-29 мкг или от 22 до 28 мкг или от 23 до 27 мкг, или от 24 до 26 мкг, или 25 мкг. В одном воплощении адъювантная композиция в объеме, который подходит для человеческой дозы адъювантной композиции содержит QS21 на уровне примерно 25 мкг, например, 20-30 мкг, подходящим образом, 21-29 мкг или от 22 до 28 мкг, или от 23 до 27 мкг, или от 24 до 26 мкг, или 25 мкг. В предпочтительном воплощении человеческая доза адъювантной композиции содержит конечный уровень 25 мкг 3D-MPL и 25 мкг QS21. В другом воплощении человеческая доза адъювантной композиции содержит конечный уровень 50 мкг 3D-MPL и 50 мкг QS21.

Когда адъювант находится в жидкой форме, подлежащей объединению с жидкой формой антигенной композиции, данная адъювантная композиция будет находиться в подходящем объеме человеческой дозы, который представляет собой приблизительно половину намеченного конечного объема человеческой дозы, например, объем 360 мкл намеченной человеческой дозы 0,7 мл или объем 250 мкл для намеченной человеческой дозы 0,5 мл. Данную адъювантную композицию разводят при объединении с антигенной композицией с получением конечной человеческой дозы вакцины.

Конечный объем такой дозы, естественно, будет варьировать, в зависимости от исходного объема адьювантной композиции и объема антигенной композиции, добавленной в данную адьювантную композицию. В альтернативном воплощении жидкий адьювант используется для растворения лиофилизированной антигенной композиции. В данном воплощении подходящий объем человеческой дозы адьювантной композиции приблизительно равен конечному объему человеческой дозы. Жидкую адьювантную композицию добавляют во флакон, содержащий лиофилизированную композицию антигена. Конечная человеческая доза может варьировать от 0,5 до 1,5 мл. В конкретном воплощении человеческая доза составляет 0,5 мл.

Профилактические и терапевтические применения

Согласно настоящему изобретению предложены способы лечения и/или предупреждения бактериальных инфекций субъекта, включающие введение данному субъекту иммуногенной композиции или вакцины по изобретению. В конкретном воплощении иммуногенная композиция по изобретению используется в предупреждении инфекции субъекта (например, человеческих субъектов) стафилококковой бактерией. *S. aureus* инфицирует разных млекопитающих (включая коров, собак, лошадей и свиней), но предпочтительным субъектом для применения по изобретению является человек.

В конкретном воплощении иммуногенная композиция по изобретению используется для лечения или предупреждения инфекции видами *Staphylococcus*, в частности, *S. aureus*. Например, иммуногенная композиция по изобретению может использоваться для предупреждения, против инфекции *S. aureus*, включая внутрибольничную инфекцию.

Также предложены способы индуцирования иммунного ответа у субъекта против стафилококковой бактерии, в частности, *S. aureus*, включающие введение данному субъекту иммуногенной композиции или вакцины по изобретению. В одном воплощении указанный субъект имеет бактериальную инфекцию во время введения. В другом воплощении указанный субъект не имеет бактериальной инфекции во время введения. Иммуногенную композицию или вакцину по изобретению можно использовать для индукции иммунного ответа против видов *Staphylococcus*, в частности, *S. aureus*.

Также предложены способы индуцирования продукции у субъекта

опсонифагоцитирующих антител против стафилококковой бактерии, в частности, *S. aureus*, включающие введение данному субъекту иммуногенной композиции или вакцины по изобретению. В одном воплощении указанный субъект имеет бактериальную инфекцию во время введения. В другом воплощении указанный субъект не имеет бактериальной инфекции во время введения.

Также предложены способы индуцирования продукции антител, способных нейтрализовать или снижать активность стафилококковых Hla, ClfA и/или SpA у субъекта, включающие введение данному субъекту иммуногенной композиции или вакцины по изобретению. Указанной активностью Hla может быть способность лизировать человеческие эритроциты (гемолиз). Указанной активностью ClfA может быть способность к связыванию с человеческим фибриногеном. Указанной активностью SpA может быть способность к связыванию с Fcγ иммуноглобулина (Ig) и с Fab частью рецепторов В-клеток V_H3-типа.

Также предложен способ иммунизации человеческого хозяина против стафилококковой инфекции, в частности, инфекции *S. aureus*, включающий введение данному хозяину иммуногенной композиции или вакцины по изобретению.

Также предложен способ индуцирования иммунного ответа на стафилококковую бактерию, в частности, *S. aureus*, у субъекта, включающий введение терапевтически или профилактически эффективного количества иммуногенной композиции или вакцины по изобретению.

Также предложена иммуногенная композиция или вакцина по изобретению для применения в способе лечения и/или предупреждения заболевания, например, для применения в способе лечения или предупреждения заболевания, вызванного стафилококковой инфекцией, в частности, *S. aureus*.

Также предложена иммуногенная композиция или вакцина по изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения или предупреждения заболевания, вызванного стафилококковой инфекцией, в частности, инфекцией *S. aureus*.

Также предложено применение иммуногенной композиции или вакцины по изобретению для изготовления лекарственного средства для применения в способе лечения и/или предупреждения заболевания, например, для применения в способе лечения или предупреждения заболевания, вызванного стафилококковой инфекцией, в частности, инфекцией *S. aureus*.

Также предложено фармацевтическое средство для лечения или

предупреждения стафилококковой инфекции, в частности, инфекции *S. aureus*, содержащее иммуногенную композицию или вакцину по изобретению.

Также предложена иммуногенная композиция или вакцина по изобретению для применения в способе индуцирования иммунного ответа у субъекта против стафилококковой бактерии, в частности, *S. aureus*.

Также предложена иммуногенная композиция или вакцина по изобретению для применения в способе индуцирования у субъекта продукции опсонофагоцитирующих антител против стафилококковой бактерии, в частности, *S. aureus*.

Также предложена иммуногенная композиция или вакцина по изобретению для применения в способе индуцирования продукции антител, способных нейтрализовать или снижать активность стафилококкового Hla, ClfA и/или SpA у субъекта, включающем введение данному субъекту иммуногенной композиции или вакцины по изобретению. Указанной активностью Hla может быть способность лизировать человеческие эритроциты (гемолиз). Указанной активностью ClfA может быть способность к связыванию с человеческим фибриногеном. Указанной активностью SpA может быть способность к связыванию с Fcγ иммуноглобулина (Ig) и с Fab частью рецепторов В-клеток V_H3-типа.

Все ссылки или патентные заявки, процитированные в пределах настоящего описания патента, включены сюда посредством ссылки.

Аспекты настоящего изобретения обобщаются в последующих пронумерованных пунктах:

1. Иммуногенная композиция, содержащая:
 - а. антиген ClfA;
 - б. антиген Hla;
 - в. антиген SpA; и
 - г. стафилококковый капсульный полисахарид.
2. Иммуногенная композиция по пункту 1, где капсульный полисахарид конъюгирован с белком-носителем.
3. Иммуногенная композиция по пункту 1 или пункту 2, где капсульный полисахарид представляет собой капсульный полисахарид серотипа 5 и/или типа 8 *S. aureus*.
4. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 1-3, где капсульный полисахарид конъюгирован с одним из антигенов (а)-(в) пункта 1.

5. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 1-4, которая содержит капсульный полисахарид серотипа 5 *S. aureus* и капсульный полисахарид типа 8.

6. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 1-5, которая содержит капсульный полисахарид серотипа 5 *S. aureus*, конъюгированный с антигеном Hla, и/или капсульный полисахарид типа 8, конъюгированный с антигеном ClfA.

7. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 1-6, где:

а. антиген ClfA представляет собой белок ClfA, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 2, или его иммуногенный фрагмент;

б. антиген Hla представляет собой белок Hla, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 3, или его иммуногенный фрагмент; и/или

в. антиген SpA представляет собой белок SpA, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 26, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 26, или его иммуногенный фрагмент.

8. Композиция по любому из пунктов 1-7, в которой антиген ClfA содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из замены в положении P116 на S и замены в положении Y118 на A в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 (или в эквивалентном положении в аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 2), возможно содержит любую последовательность из SEQ ID NO: 5-7 или 32.

9. Иммуногенная композиция по пункту 7 или пункту 8, в которой антиген ClfA содержит одну или более чем одну консенсусную последовательность PglB, выбранную из: D/E-X-N-Z-S/T (SEQ ID NO: 28) и K-D/E-X-N-Z-S/T-K (SEQ ID NO: 29), где X и Z независимо представляют собой любую аминокислоту, отличную от пролина.

10. Иммуногенная композиция по пункту 9, где указанная консенсусная последовательность была добавлена или ей была заменена одна или более чем одна аминокислота между аминокислотными остатками 313-342 SEQ ID NO: 2, возможно заменяющая аминокислоту в положении I337 или в эквивалентном положении в

пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 2.

11. Иммуногенная композиция по пункту 9 или пункту 10, где X представляет собой Q (глутамин), и Z представляет собой A (аланин) (например, K-D-Q-N-A-T-K, SEQ ID NO: 31).

12. Иммуногенная композиция по пункту 11, где антиген ClfA содержит или состоит из последовательности SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 32.

13. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 1-12, где антиген Hla содержит аминокислотную замену в положении H35 SEQ ID NO: 3 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3, где указанная аминокислотная замена возможно представляет собой замену H на L.

14. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 1-13, где антиген Hla содержит одну или более чем одну консенсусную последовательность PglB, выбранную из: D/E-X-N-Z-S/T (SEQ ID NO: 28) и K-D/E-X-N-Z-S/T-K (SEQ ID NO: 29), где X и Z независимо представляют собой любую аминокислоту, отличную от пролина.

15. Иммуногенная композиция по пункту 14, где указанная консенсусная последовательность была добавлена или ей была заменена одна или более чем одна аминокислота в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3 или в аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3.

16. Иммуногенная композиция по пункту 14, где указанной консенсусной последовательностью была заменена аминокислота в положении K131 в SEQ ID NO: 3 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3.

17. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 14-16, где X представляет собой Q (глутамин), и Z представляет собой R (аргинин) (например, K-D-Q-N-R-T-K (SEQ ID NO: 30)).

18. Иммуногенная композиция по пункту 17, где антиген Hla содержит или состоит из последовательности SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12.

19. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 1-18, где антиген SpA

содержит: (а) одну или более чем одну аминокислотную замену в связывающем V_{H3} субдомене домена E, D, A, B или C, которая нарушает или уменьшает связывание с V_{H3} , и (б) одну или более чем одну аминокислотную замену в связывающем Fc IgG субдомене домена E, D, A, B или C, которая нарушает или уменьшает связывание с Fc IgG.

20. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 1-19, где антиген SpA содержит: (1) домен E с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 34 и 35 SEQ ID NO: 14 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 14; домен D с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 39 и 40 SEQ ID NO: 15 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 15; домен A с аминокислотной заменой в положениях 36 и 37 SEQ ID NO: 16 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 16; домен B с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 36 и 37 SEQ ID NO: 17 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 17, и/или домен C с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 36 и 37 SEQ ID NO: 18 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 18; и/или (2) содержит домен E с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 7 и 8 SEQ ID NO: 14 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 14; домен D с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 12 и 13 SEQ ID NO: 15 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 15; домен A с аминокислотной заменой в положениях 9 и 10 SEQ ID NO: 16 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 16; домен B с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 9 и 10 SEQ

ID NO: 17 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 17; и/или домен C с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 9 и 10 SEQ ID NO: 18 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 18.

21. Иммуногенная композиция по пункту 20, где указанные аминокислотные замены представляют собой замену глутамина на лизин и/или замену аспарагиновой кислоты на аланин.

22. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 1-21, где антиген SpA содержит домен D с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 4 и 5 SEQ ID NO: 15 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 15.

23. Иммуногенная композиция по пункту 22, где указанная аминокислотная замена представляют собой замену глутамина на лизин и/или замену глутамина на аргинин, например, замену QQ на KR.

24. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 1-23, где указанный антиген SpA содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19-23, 26 или 27, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 19-23, 26 или 27.

25. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 1-24, где данная иммуногенная композиция содержит (1) антиген ClfA, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 32; (2) антиген Hla, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12; (3) антиген SpA, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; (4) капсульный полисахарид серотипа 5 *S. aureus* и (5) капсульный полисахарид серотипа 8 *S. aureus*.

26. Иммуногенная композиция по пункту 25, где антиген ClfA конъюгирован с капсульным полисахаридом серотипа 8 *S. aureus*, и антиген Hla конъюгирован с капсульным полисахаридом серотипа 5 *S. aureus*.

27. Иммуногенная композиция по пункту 26, где указанные конъюгаты ClfA-CP8 и Hla-CP5 представляют собой биоконъюгаты.

28. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 1-27, которая содержит

адъювант.

29. Иммуногенная композиция по пункту 28, где адъювант содержит сапонин и липополисахарид.

30. Иммуногенная композиция по пункту 29, где адъювант содержит сапонин, липополисахарид в липосомном образовании.

31. Иммуногенная композиция по пункту 29 или пункту 30, дополнительно содержащая стерин.

32. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 29-31, где сапонин представляет собой иммунологически активную фракцию сапонины, полученную из коры *Quillaja saponaria* Molina.

33. Иммуногенная композиция по пункту 32, где сапонин представляет собой QS21.

34. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 29-33, где липополисахарид представляет собой производное липида А.

35. Иммуногенная композиция по пункту 34, где липополисахарид представляет собой 3D-MPL.

36. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 31-35, где стерин представляет собой холестерин.

37. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 29-36, содержащая QS21 на уровне 25 мкг на человеческую дозу.

38. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 29-37, содержащая 3D-MPL на уровне 25 мкг на человеческую дозу.

39. Вакцина, содержащая иммуногенную композицию по любому из пунктов 1-27 и фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель.

40. Вакцина, содержащая иммуногенную композицию по любому из пунктов 28-38 и фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель.

41. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 1-27 или вакцина по пункту 39 для применения в способе предупреждения или лечения стафилококковой инфекции, где указанную композицию вводят в комбинации с адъювантом.

42. Иммуногенная композиция или вакцина для применения по пункту 41, где указанную иммуногенную композицию смешивают с адъювантом перед введением субъекту.

43. Иммуногенная композиция или вакцина для применения по пункту 41 или

пункту 42, где адъювант является таким, как определено в любом из пунктов 29-36.

44. Иммуногенная композиция или вакцина для применения по пункту 43, где адъювант содержит 3D-MPL на уровне 25 мкг на человеческую дозу и QS21 на уровне 25 мкг на человеческую дозу.

45. Набор, содержащий (1) первый контейнер, содержащий иммуногенную композицию по любому из пунктов 1-27 или вакцину по пункту 39; и (2) второй контейнер, содержащий адъювант.

46. Набор по пункту 45, где адъювант является таким, как определено в любом из пунктов 29-36.

47. Набор по пункту 46, где адъювант содержит 3D-MPL на уровне 25 мкг на человеческую дозу и QS21 на уровне 25 мкг на человеческую дозу.

48. Способ предупреждения или лечения стафилококковой инфекции, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, иммуногенной композиции по любому из пунктов 1-27 или вакцины по пункту 39.

49. Способ по пункту 48, дополнительно включающий введение указанному субъекту адъюванта.

50. Способ по пункту 49, где указанный адъювант вводят сопутствующее с иммуногенной композицией.

51. Способ по пункту 49 или пункту 50, в котором адъювант является таким, как определено в любом из пунктов 29-36.

52. Способ предупреждения или лечения стафилококковой инфекции, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, иммуногенной композиции по любому из пунктов 28-38 или вакцины по пункту 40.

53. Способ получения иммуногенной композиции или вакцины по любому из пунктов, включающий стадии смешивания антигенов и, возможно, адъюванта с фармацевтически приемлемым эксципиентом.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: состав вакцины и композиция

Компоненты вакцины

Получали биоконъюгаты CP5, содержащего от 6 до 20 повторяющихся звеньев, связанного с $H_{a_{mut}}$, содержащим один сайт гликозилирования, мутации H35L/H48C/G122C и С-концевую метку HRHR (SEQ ID NO: 12, экспрессируемую с использованием сигнальной последовательности FlgL), с использованием ферментации

с подпиткой клеток *E. coli*, трансформированных плазмидами, кодирующими капсульный полисахарид CP5 *S. aureus*, белок-носитель Hla_{N35L-H48C-G122C} *S. aureus*, несущий сайт гликозилирования в положении 131, С-концевую гистидин-аргинин-гистидин-аргининовую метку и олигосахарилтрансферазу PglB_{cuo} N311V-K482R-D483H-A669V *Campylobacter jejuni*.

Получали биоконъюгаты CP8, от 5 до 16 повторяющихся звеньев, связанного с ClfA_{mut}, содержащим домены N2/N3 ClfA с одним сайтом гликозилирования и мутациями P116S/Y118A (SEQ ID NO: 7), посредством ферментации с подпиткой клеток *E. coli*, экспрессирующих PglB_{cuo} N311V-K482R-D483H-A669V и CP8 *S. aureus* (W3110 waaL::pglB_{cuo} N311V-K482R-D483H-A669V; O16::O11_ wbjB-wbpM; ΔrmlB-wecG; wecA-wzzE::CP8_p2636(CCW)_Cat) и трансформированных плазмидой, кодирующей ClfA_{mut}.

Биоконъюгаты в разных композициях анализировали на стабильность. Стабильность трех разных композиций для каждой партии анализировали при -80°C (долговременная), +4°C (промежуточная) и +25°C вплоть до 3 месяцев путем применения части аналитической панели, описанной в приведенной выше таблице, для оценки содержания, чистоты, агрегации, деградации по отношению к стабильности белка и полисахарида.

Биоконъюгаты CP5-Hla и CP8-ClfA были стабильными при 4°C и -80°C в течение по меньшей мере 3 месяцев и вплоть до 3 месяцев при 25°C.

Получали вариант SpA (SpA_{KR-KKAA}, указанный здесь как SpA_{mut} и содержащий последовательность SEQ ID NO: 27, описанную в WO2015/144653), содержащий часть, связывающую IgG (связывающие IgG домены EDABC), несущую аминокислотные замены в четырех ключевых остатках в каждом из пяти IgBD (глутамин и аспарат, замененные на лизин и аланин соответственно), которые сильно ослаблены в связывании с IgG и IgM, а также два дополнительных остатка связывания иммуноглобулина, соответствующих Q70 и Q71 части, связывающей IgG (Q96 и Q97 полноразмерного белка), которые мутировали до лизина в положении 70 и до аргинина в положении 71, соответственно (K70 и R71). Было показано то, что SpA_{mut} не имеет выявляемой аффинности по отношению к IgG и IgM посредством экспериментов с использованием поверхностного плазмонного резонанса, что делает данную молекулу безопаснее для применения в вакцине. SpA_{mut} экспрессировался в рекомбинантной форме посредством бактериальной ферментации с подпиткой с использованием имеющегося в продаже штамма *Escherichia coli* BL21 (DE3).

Исследования по ускоренному старению проводили с использованием SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) и SE-UPLC (гель-фильтрационная сверхэффективная жидкостная хроматография) для анализа белка после хранения в течение 3, 10 и 30 суток при 4°C, при RT (комнатная температура) и при 37°C в четырех подходящих буферах для композиций.

SpA_{mut} был стабильным при 4°C в течение вплоть до 3 месяцев, стабильным при 25°C в течение вплоть до 10 суток и стабильным при 37°C в течение вплоть до 4 суток.

Композиция вакцины

Композиции для исследований иммунизации мышей получали без адъюванта и с адъювантом - AS01_E (3D-MPL плюс QS21 в липосомной композиции, как описано выше) и Алум/TLR7 (агонист TLR7, адсорбированный на AlOH, как описано в WO2011/027222, Пример 20, в WO2012/031140 и в Bagnoli et al, PNAS, 2015, 112: 3680-3685). Три компонента (CP5-H1a, CP8-ClfA, SpA_{mut}) приготавливали в том же самом флаконе в концентрации 200 мкг/мл для каждого компонента (двухкратно концентрированные, именуемые здесь 2× по отношению к конечной высокой дозе) на основе содержания белка. Для получения конечных разных композиций во флаконе 2× с тремя смешанными компонентами осуществляли растворение с использованием буфера для композиции (10 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 6,5) или адъювантов (концентрированных в два раза относительно конечной дозы адъюванта) посредством смешивания на стороне дна до иммунизации. Высокая дозировка белка достигалась посредством разведения одного объема во флаконе 2× равным объемом AS01_B (двухкратно концентрированный по сравнению с AS01_E) или Алум/TLR7 (двухкратно концентрированный, Алум/TLR7 при 20 мкг/дозу) или, в качестве альтернативы, буфером для композиции для неадъювантной группы для того, чтобы иметь требуемую конечную концентрацию белка 100 мкг/мл (эквивалентную 10 мкг/100 мкл). Среднюю и низкую дозировку белка вместо того получали посредством стадии предварительного разведения флакона 2×, соответственно, один к десяти и один к двадцати буфером для композиции, перед конечным разведением эквивалентным объемом AS01_B (2×) или Алум/TLR7 (2×) для достижения конечной концентрации 10 мкг/мл (эквивалентно 1 мкг/100 мкл) и 1 мкг/мл (эквивалентно 0,1 мкг/100 мкл). Буфер для композиции использовали в качестве разбавителя для контрольной группы. Исследования совместимости проводили для того, чтобы оценить кратковременную стабильность

композиции (вплоть до 24 часов в условиях хранения при 2-8°C) и для флакона со смесью 2× и после процесса разведения с использованием адъювантов или плацебо. Расширенную аналитическую панель применяли для характеристики композиций посредством оценки следующих параметров:

1. физико-химические (визуальная проверка, pH и осмоляльность)
2. идентичность антигена (вестерн-блоттинг для каждого одиночного компонента – как белка, так и сахара)
3. общее содержание белка (мкBCA)
4. стерильность (микробное загрязнение посредством выращивания на чашке)
5. размер частиц AS01 (DLS)
6. выход Алюм/TLR7 (ВЭЖХ-ОФ) (высокоэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой).

Не наблюдали никаких значительных несовместимостей для комбинаций антигенов/адъюванта или плацебо, рассматриваемых для оценивания в доклинических исследованиях.

Пример 2: иммуногенность у мышей и подвергавшихся предварительному воздействию кроликов на вакцину с добавлением адъюванта AS01_E или Алюм/TLR7

Композицию вакцины использовали для иммунизации разных видов животных:

1) Наивные мыши для исследования индукции *in vivo* ответа как IgG, так и Т-клеток, специфичного в отношении компонентов вакцины. В данных исследованиях вакцину анализировали либо без добавления адъювантов, либо с адъювантами – с AS01_E или Алюм/TLR7 в разных дозах иммунизации.

2) Кролики, подвергавшиеся предварительному воздействию *S. aureus*, для оценки ответа на вакцину в модели, в которой присутствуют предсуществующие уровни специфичного в отношении компонентов вакцины IgG. В данном исследовании вакцину тестировали в разных дозах либо с адъювантом - AS01_E, либо без адъюванта. Адъювант Алюм/TLR7 не мог использоваться в данной модели из-за отсутствия агонистического рецептора на клетках кролика.

Специфичный иммунный ответ оценивали следующим образом:

а) измерение антигенспецифичного IgG посредством технологии Luminex как в мышьюной, так и в кроличьей иммунной сыворотке в разные моменты времени после вакцинации;

б) оценка присутствия Т-клеток CD4⁺, специфичных в отношении антигенов

вакцины, в селезенках иммунизированных мышей;

в) измерение способности антител, присутствующих в мышинной или кроличьей сыворотке, нейтрализовать биологические активности двух белковых компонентов: антигенов H1a и Clf дикого типа.

Обзор данных исследований представлен в Таблице 1.

Таблица 1: обзор вакцины в доклинических исследованиях *in vivo* у мышей и кроликов

Вид, Пол/Возраст	Цели	Антиген	Число живот- ных	Схема	Доза белка (мкг)	Доза полисахаридов (мкг)*	Адъювант *	Объем инъекции/путь
Мыши BALB/c самки/5- недельные	Количественное измерение IgG, сравнение адъювантов и анализ сыворотки в анализах <i>in vitro</i>	1-вакцина	30	2 инъекции с интерва- лом 4 недели	10	2	нет	100 мкл/в.м. (внутримышечно)
		2-вакцина	30		1	0,2	нет	100 мкл/в.м.
		3-вакцина	30		0,1	0,02	нет	100 мкл/в.м.
		4-вакцина	30		10	2	Альб/TLR 7	100 мкл/в.м.
		5-вакцина	30		1	0,2	Альб/TLR 7	100 мкл/в.м.
		6-вакцина	30		0,1	0,02	Альб/TLR 7	100 мкл/в.м.
		7-вакцина	30		10	2	AS01 _H	100 мкл/в.м.
		8-вакцина	30		1	0,2	AS01 _F	100 мкл/в.м.
		9-вакцина	30		0,1	0,02	AS01 _E	100 мкл/в.м.
		10-буфер	15		-	-	нет	100 мкл/в.м.
		11-буфер	15		-	-	Альб/TLR 7	100 мкл/в.м.
		12-буфер	15		-	-	AS01 _H	100 мкл/в.м.

Вид, Пол/Возраст	Цели	Антиген	Число живот- ных	Схема	Доза белка (мкг)	Доза полисахаридов (мкг)*	Адъювант #	Объем инъекции/путь
Кролик (новозеландский) /самец/12-14- недельный	Количественное измерение IgG, сравнение адъювантов и анализ сыворотки в анализах <i>in vitro</i>	1-буфер	12	2 инъекции с интерва- лом 4 недели	буфер	-	нет	500 мкл/в.м.
		2-вакцина	12		1 мкг	0,2	нет	500 мкл/в.м.
		3-вакцина	12		10 мкг	2	нет	500 мкл/в.м.
		4-вакцина	12		50 мкг	10	нет	500 мкл/в.м.
		5-вакцина	12		1 мкг	0,2	AS01 _E	500 мкл/в.м.
		6-вакцина	12		10 мкг	2	AS01 _B	500 мкл/в.м.
		7-вакцина	12		50 мкг	10	AS01 _E	500 мкл/в.м.

Мыши BALB/c/самки/ 5-недельные	Анализ ответа Т- клеток	1-вакцина	15	2 инъекции с 10 мкг интервалом 4 недели	2	нет	100 мкл/в.м.
		2-вакцина	15	10 мкг	2	Алюм/TLR7	100 мкл/в.м.
		3-вакцина	15	10 мкг	2	AS01 _E	100 мкл/в.м.
		4-вакцина	15	1 мкг	0,2	нет	100 мкл/в.м.
		5-вакцина	15	1 мкг	0,2	Алюм/TLR7	100 мкл/в.м.
		6-вакцина	15	1 мкг	0,2	AS01 _E	100 мкл/в.м.
		7-буфер	6	-	-	нет	100 мкл/в.м.
		8-буфер	6	-	-	Алюм/TLR7	100 мкл/в.м.
		9-буфер	6	-	-	AS01 _E	100 мкл/в.м.

* Содержание полисахарида в биоконъюгатах – примерно 1/5-ая по сравнению с белком.

Использованная доза адъюванта Алюм/TLR7 составляет 10 мкг агониста TLR7, адсорбированного на гидроксиде алюминия.

Использованный адъювант AS01_E составляет 1/20 человеческой дозы у мышей (2,5 мкг MPL и 2,5 мкг QS-21 *Quillaja saponaria* Molina, фракция 21) и 1/2 человеческой дозы у кроликов (12,5 мкг MPL и 12,5 мкг QS-21).

Иммунизация мышей

Пятинедельным самкам мышей давали две дозы по 100 мкл либо буфера, либо анализируемых композиций (50 мкл в квадрицепс каждой задней лапы) с интервалом 28 суток посредством в.м. пути. Образцы крови отбирали перед 1-ой инъекцией (сутки 0), через 1 неделю, 2 и 4 недели после первой инъекции (1wp1, 2wp1, 4wp1), и через 1, 2, 4, 8, 12 и 16 недель после второй инъекции (1wp2, 2wp2, 4wp2, 8wp2, 12wp2, 16wp2). Данный эксперимент повторяли 3 раза для того, чтобы оценить экспериментальную вариабельность. Статистический анализ проводили на объединенном образце для каждой группы. Обзор данного исследования с общим использованным числом мышей в трех экспериментах показан в Таблице 2.

Таблица 2: схема исследования для определения титра IgG у иммунизированных мышей

Группа	Общее число мышей	Антиген	Доза белка (мкг)	Доза полисахарида (мкг)	Адъювант [#]	Объем инъекции/путь
1	30	Вакцина	10	2	нет	100 мкл/в.м.
2	30	Вакцина	1	0,2	нет	100 мкл/в.м.
3	30	Вакцина	0,1	0,02	нет	100 мкл/в.м.
4	30	Вакцина	10	2	Алюм/TLR7	100 мкл/в.м.
5	30	Вакцина	1	0,2	Алюм/TLR7	100 мкл/в.м.
6	30	Вакцина	0,1	0,02	Алюм/TLR7	100 мкл/в.м.
7	30	Вакцина	10	2	AS01 _E	100 мкл/в.м.
8	30	Вакцина	1	0,2	AS01 _E	100 мкл/в.м.
9	30	Вакцина	0,1	0,02	AS01 _E	100 мкл/в.м.
10	15	Буфер	-	-	нет	100 мкл/в.м.
11	15	Буфер	-	-	Алюм/TLR7	100 мкл/в.м.
12	15	Буфер	-	-	AS01 _E	100 мкл/в.м.

Оценка специфичного для вакцины IgG

Серологический анализ для оценки специфичного для вакцины IgG у мышей и кроликов был основан на мультиплексном анализе посредством технологии Luminex. Данную технологию использовали для измерения антител в человеческой сыворотке от субъектов, иммунизированных вакциной против *Staphylococcus aureus* (Raedler et al, Clin Vaccine Immuno 2009, 16: 739-49).

В данном анализе одновременно анализируются пять антигенов (5-плексный) с использованием магнитных шариков, покрытых тремя рекомбинантными белками SA (SPA_{mut}, ClfA_{mut}, Hla_{mut}) и двумя капсульными полисахаридами разных серотипов (CP5 и

CP8). Белковые антигены ковалентно конъюгированы со свободными карбоксильными группами микросфер с использованием усиленной N-гидроксисульфосукцинимидом опосредованной карбодиимидом (EDC) химии конъюгирования. CP5 и CP8 биотинилируют с использованием биотин-гидразида (BH) и EDC, очищают и затем конъюгируют со стрептавидиновыми шариками.

Пентавалентную стандартную сыворотку получали посредством объединения гипериммунной сыворотки, отобранной в D12 (сутки 12) после 2-ой иммунизации от 5 мышей, иммунизированных $\text{Hla}_{\text{H35R}} + \text{ClfA}_{\text{mut}} + \text{CP5-TT} + \text{CP8-TT} + \text{SpA}_{\text{mut}} - 10 \text{ мкг/Алюм/TLR7}$. Пентавалентному стандарту приписывали произвольный титр 100 RLU (относительная единица люминисценции)/мл.

Данный анализ проводили согласно следующим критериям:

Между пятью антигенами не наблюдали перекрестной реактивности посредством сравнения сигналов, полученных моноплексной относительно мультиплексной постановки.

Специфичность данного анализа подтверждали мультиплексными анализами с предварительной адсорбцией.

Воспроизводимость анализа внутри и между анализами (%CV (ковариация) меньше 10% и 20% соответственно).

Оценка линейности в линейном интервале 5PL (пятиплексный) MFI (мультиплексный флуоресцентный иммуноанализ) кривой, полученной с использованием стандартной и опытной сыворотки: значения R^2 больше 0,9.

Нижние границы выявления (LLOD, см. таблицу ниже) для каждого антигена выявляли как средняя RLU от черных образцов.

Нижние границы количественного измерения (LLOQ, см. таблицу ниже): наименьшие титры, которые могли быть определены с приемлемой точностью (CV меньше 20% в экспериментах с модельными смесями) с использованием минимального требуемого разведения (MDR) 1:1000.

		Hla	CP8	CIFA	SPA	CP5
		RLU/мл (MDR 1:100)				
LOD	=	0,03	0,01	0,04	0,05	0,02
среднее + 3SD						
LLOQ		0,7	0,18	3,09	0,96	0,77
(RLU/мл) на						
основе преим-						
мунной						

Для анализа образцов независимо готовили вплоть до пяти возрастающих разведений и загружали на 96-луночные планшеты с адекватным количеством связанных микросфер. Анализировали две повторности каждого разведения. Антигенспецифичные антитела выявляли посредством вторичного антитела против мышинового IgG, меченного фикоэритрином, и MFI измеряли с использованием ридера Luminex 200.

Данный анализ проводили с использованием трех экспериментов для каждой группы в разные моменты времени. Для того чтобы оценивать биологическую вариабельность среди экспериментов для каждого антигена и дозы, применяли 2-факторный смешанный ANOVA (дисперсионный анализ) («группа» и «эксперимент» в качестве фиксированных и «индивидуальные мыши» в качестве случайных эффектов). Не наблюдали значимого взаимодействия группа-эксперимент, за исключением ClfA_{mut} и Hla_{mut} в дозе 0,1 мкг со значением p, равным 0,001.

Общие результаты по исследованиям на мышах (Фиг. 1, данные не показаны для дозы 0,1 мкг) показали то, что:

Все компоненты вакцины были иммуногенными у мышей. Контрольные группы (10, 11 и 12) не демонстрировали выявляемых антител против любого из пяти антигенов. Аналогичным образом, выявляемые IgG не измерялись в преиммунной сыворотке, за исключением антигена Hla_{mut}, для которого 14% оцененных титров были немного выше LLOQ.

Ответы для вакцины без адъювантов всегда были хуже относительно ответов на вакцину с адъювантами.

Значимый эффект дозы наблюдали во всех группах с адъювантом и без адъюванта (применяли 1-факторный ANOVA, и делали корректировки для множественных сравнений с использованием «истинного значимого различия» Тьюки»). В частности:

Без адъюванта: 0,1 мкг меньше 1 мкг меньше 10 мкг для всех антигенов после 2-ой

иммунизации (значение p меньше 0,01 апостериорный критерий Тьюки).

AS01_E: 0,1 мкг меньше 1 мкг меньше 10 мкг для ClfA_{mut}, HLA_{mut} и SpA_{mut} в любые моменты времени (значение p меньше 0,05 апостериорный критерий Тьюки); 0,02 мкг меньше 0,2 мкг меньше или равно 2 мкг (доза на основе полисахарида) для CP8 (значение p меньше 0,05 апостериорный критерий Тьюки). Для CP5 0,02 мкг равно 0,2 мкг больше 2 мкг после 2-ой иммунизации (значение p меньше 0,0001 апостериорный критерий Тьюки).

Алюм/TLR7: 0,1 мкг меньше 1 мкг больше или равно 10 мкг для ClfA_{mut} и SpA_{mut} в любые моменты времени (значение p меньше 0,05 апостериорный критерий Тьюки). Тогда как для CP5 0,02 мкг равно 0,2 мкг больше 2 мкг (на основе полисахарида) после 2-ой иммунизации (значение p меньше 0,05 апостериорный критерий Тьюки), для CP8 0,02 мкг меньше 0,2 мкг больше 2 мкг в любые моменты времени (значение p меньше 0,05 апостериорный критерий Тьюки), наконец 0,1 мкг меньше 1 мкг меньше или равно 10 мкг для HLA_{mut}.

Для получения наивысших титров IgG (значение p меньше 0,01 апостериорный критерий Тьюки) требовалось две иммунизации.

Отбор кроликов, подвергавшихся предварительному воздействию, и схема исследования

Всего 350 кроликов подвергали скринингу ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ) для измерения в сыворотке предварительно существующих антител против трех белковых антигенов и двух полисахаридов, присутствующих в вакцине. Анализ ELISA показал то, что поглощение $A_{450 \text{ нм}}$, равное 0,2, было пределом выявления для измерения ответа IgG при разведениях 1/100, и что все кролики были позитивными к по меньшей мере одному антигену.

Для того чтобы собрать группы кроликов согласно схеме исследования, показанной в Таблице 3, осуществляли отбор 84 кроликов.

Таблица 3: схема исследования на кроликах

Группа	Число кроликов	Антиген	Доза белка (мкг)	Доза полисахаридов (мкг)	Адьювант [#]	Объем инъекции/путь
1	12	буфер	-	-	нет	500 мкл/в.м.
2	12	Вакцина	1 мкг	0,2	нет	500 мкл/в.м.
3	12	Вакцина	10 мкг	2	нет	500 мкл/в.м.
4	12	Вакцина	50 мкг	10	нет	500 мкл/в.м.
5	12	Вакцина	1 мкг	0,2	AS01 _E	500 мкл/в.м.
6	12	Вакцина	10 мкг	2	AS01 _E	500 мкл/в.м.
7	12	Вакцина	50 мкг	10	AS01 _E	500 мкл/в.м.

[#] Адьювант AS01_E состоит из 12,5 мкг MPL, активатора TLR4 и 12,5 мкг QS-21

(*Quillaja saponaria* Molina, фракция 21), который увеличивает презентацию антигена APC (антигенпрезентирующие клетки).

350 кроликов делили на 5 подгрупп или страт на основе числа антигенов с результатом ELISA больше 0,2 $A_{450\text{nm}}$ (т.е. ELISA больше 0,2 для 5, 4, 3, 2 или меньше или равно 1 антигена). Были отобраны все кролики в каждой из двух страт «позитивных в отношении 5 антигенов» или «позитивных в отношении 4 антигенов» (общий n равен 35) для включения в данное исследование и случайным образом распределены в 7 экспериментальных групп (общий n равен 5 для каждой группы). Других требующихся кроликов отбирали из «позитивных в отношении 3 антигенов» страты (n равно 102), в которой применялись дополнительные критерии оценки. В страте «позитивных в отношении 3 антигенов» только кроликов, позитивных в отношении ClfA (n равно 64) считали подходящими для исследования, и среди них только кроликов с результатом ELISA для обоих антигенов Hla и SpA в пределах межквартильного интервала считали подходящими для данного исследования (n равно 51). Сорок девять из 51 кролика отбирали случайным образом и распределяли в одну из 7 групп исследования (всего n равен 7 для каждой группы).

Иммунизация кроликов

Тот же самый подход перемешивания на стороне дна, описанный выше, использовали для получения композиций вакцины, подлежащих анализу у кроликов, подвергавшихся предварительному воздействию, с использованием подходящей концентрации и стадии разведения согласно конечной дозе антигенов и объему инъекции.

Кроликам, подвергавшимся предварительному воздействию (12-14-недельные самцы), давали две дозы либо только композиции буфера (контрольные группы), либо одной из шести анализируемых композиций вакцин с интервалом 28 суток, в сутки 1 и сутки 29, посредством в.м. пути. Образцы крови отбирали перед 1-ой инъекцией (сутки 0), в 1 неделю, 2 и 4 недели после первой инъекции (1wp1, 2wp1, 4wp1) и 2, и 5 недель после второй инъекции (2wp5, 5wp2).

Оценка специфичного для вакцины IgG

Анализом, использованным для определения специфичного для вакцины IgG у кроликов, был 5-плексный Luminex, описанный выше. Анализ кроликов был разработан в 96-луночном формате.

Пентавалентную стандартную сыворотку получали посредством объединения гипериммунных одновалентных кроличьих поликлональных сывороток против всех 5 антигенов. Пентавалентному стандарту приписывали произвольный титр 50000 RLU/мл

для всех антигенов.

Данный анализ поставили согласно критериям, описанным выше. Была определена воспроизводимость между анализами (%CV меньше 15%). Оценка линейности давала значения R^2 больше 0,9. LOQ и LOQ приводятся ниже.

	CLFA	CP 5	CP 8	HLA	SpA _{mut}
	RLU/мл (MDR 1:100)				
LOD (среднее + 3SD)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
LLOQ (поправка на разведение)	14	6	57	9	60

Для анализа образцов автоматически получали 8 серийных 3-кратных разведений (начиная от 1:100), и загружали их на один 96-луночный планшет с адекватным количеством связанных микросфер. Антигенспецифичные антитела выявляли посредством антитела против Fab2 кроличьего IgG. Меченное фикоэритрином вторичное антитело и MFI измеряли с использованием ридера Luminex Flexmap 3D. Титры IgG каждого образца/антигена определяли посредством оценки медианы всех валидных индивидуальных титров, полученных из кривой 5PL.

Среднее геометрическое титров (GMT) для антител против ClfA_{mut}, Hla_{mut}, CP5, CP8 и SpA_{mut} на 4 недели после 1-ой вакцинации и на 2 недели после 2-ой вакцинации показало статистически значимое увеличение с момента до вакцинации во всех семи группах (Фиг. 3). Титры антитела на 2 недели после 2-ой вакцинации были выше, чем после 1-ой вакцинации. На 2 недели после 2-ой вакцинации все вакцинированные группы показали статистически значимо более высокий ответ антител по сравнению с группой буферного контроля для всех антигенов, за исключением Hla_{mut}, для которого титры антител были аналогичными группе буферного контроля в любой момент времени. После 2-ой вакцинации GMT между группами с адъювантом и без адъюванта не демонстрировали значимого различия.

Пример 3: анализ функциональных антител

Сыворотки, полученные от иммунизированных мышей и кроликов, анализировали на присутствие функциональных антител, способных нейтрализовать активности Hla и ClfA дикого типа *in vitro*.

Ингибирование активности Hla - мыши

Способность специфичных для вакцины антител ингибировать индуцированный H1a гемолиз оценивали в анализе нейтрализации гемолиза на основе эритроцитов (RBC) *in vitro*, проведенном посредством модификации описанного ранее способа (Bagnoli et al, PNAS 2015, 112: 3680-3685). Анализ нейтрализации альфа-гемолизина проводили с использованием трех пулов из 10 сывороток, каждого из трех разных повторных экспериментов для каждой группы иммунизации. Определяли титры нейтрализации, рассчитывая эффективное разведение (ED_{50}), определенное как разведение сыворотки, которое нейтрализует токсичность H1a на 50%.

Для каждой группы в каждый момент времени оценивали ED_{50} посредством оценки параметра точки перегиба четырехпараметрической логистической (4PL) кривой посредством нелинейной регрессии кривых нейтрализации.

Полученные результаты показаны на Фиг. 4А и показывают то, что:

Функциональные антитела не были выявлены в отсутствие адъюванта и в группах с 0,1 мкг адъюванта (данные не показаны).

Нейтрализация H1a наблюдалась после двух иммунизаций с использованием обоих адъювантов с дозами 1 или 10 мкг.

Композиция с 10 мкг индуцировала статистически значимо более высокие титры нейтрализации по сравнению с композицией с 1 мкг (p меньше или равно 0,05, критерий Уилкоксона).

Ингибирование активности ClfA - мыши

Разработали анализ ингибирования связывания ClfA для оценки того, индуцировала ли вакцина функциональные антитела, способные ингибировать активность ClfA. Данный анализ представляет собой основанное на ELISA измерение способности антител ингибировать связывание ClfA с фибриногеном. Если антитела эффективно связываются с ClfA, взаимодействие с фибриногеном ингибируется. Сывороточные титры определяются как обратное значение разведения сыворотки, дающего 50%-ное снижение связывания фибриногена (ED_{50}). Четырехпараметрическая логистическая (4PL) нелинейная регрессионная модель используется для аппроксимационного анализа кривых ингибирования, и ED_{50} оценивали посредством оценки точки перегиба 4PL.

Анализ связывания ClfA применяли к сыворотке, индуцированной композицией вакцины у наивных мышей.

Анализировали сыворотки, отобранные в следующие моменты времени после иммунизации: 4 недели после первой иммунизации (4wp1); и в 1-2-4-8-12-16 недель после второй иммунизации (1wp2, 2wp2, ...).

Полученные результаты показаны на Фиг. 5А.

Сыворотки от каждой группы объединяли (10 мышей в каждой), и измеряли титры нейтрализации (ED_{50}) для каждого объединения в разные моменты времени. Данный анализ проводили в трех независимых экспериментах по иммунизации мышей для каждой группы в разные моменты времени. Результаты показаны на Фиг. 5А, где каждая точка представляет значение медианы трех независимых экспериментов; верхний и нижний концы планки погрешностей представляют максимальное и минимальное значение соответственно.

Полученные результаты показали то, что:

При дозировке 0,1 мкг и в отсутствие адъювантов нейтрализация ClfA не измерялась (данные не показаны).

Нейтрализацию ClfA наблюдали с использованием обоих адъювантов в дозировке 1 или 10 мкг.

Композиция с дозировкой 10 мкг (относящейся к содержанию ClfA) индуцировал статистически значимо более высокие титры нейтрализации по сравнению с композицией с 1 мкг (значение p критерия Уилкоксона меньше или равно 0,05).

При дозировке 10 мкг AS01_E превосходил Алюм/TLR7 в моменты времени 1w и 2wp2 (значение p критерия Уилкоксона меньше или равно 0,05).

Сыворотки, полученные от иммунизированных кроликов, анализировали на присутствие функциональных антител, способных нейтрализовать активности Hla и ClfA дикого типа *in vitro*, используя анализы, описанные ранее для мышьи сыворотки.

Ингибирование активности Hla - кролики

Кроликов обрабатывали, как описано в Таблице 3. У всех животных отбирали кровь перед 1-ой инъекцией (сутки 0), в 1 неделю, 2 и 4 недели после первой инъекции (1wp1, 2wp1, 4wp1), и 2 и 5 недель после второй инъекции (2wp2, 5wp2). Анализы нейтрализации проводили на одном образце сыворотки в разные моменты времени, описанные выше.

Средние геометрические титров в каждый момент времени были обобщены описательно, включая 95%-ные доверительные интервалы (CI). GMT и 95%-ные CI рассчитывали посредством обратных преобразований доверительных интервалов, рассчитанных для средних log-преобразованных титров на основе t -распределения Стьюдента (Фиг. 4Б). Пунктирная линия представляет минимальное требуемое разведение, установленное для измерения каждой кроличьей сыворотки.

Титры относительно преиммунной:

Среднее геометрическое кратности увеличения с момента до вакцинации в каждый момент времени после вакцинации рассчитывали на основе log-преобразованных титров. Для анализа различий между log-преобразованными титрами до и после иммунизации использовали парный t-критерий Стьюдента.

В 2wp1 все группы с содержанием белка, большим или равным 10 мкг, индуцировали более высокие титры по сравнению с преиммунной сывороткой (все значения p меньше 0,017).

В 2wp2: все иммунизированные группы индуцировали более высокие титры по сравнению с преиммунной сывороткой (все значения p меньше 0,005).

Титры относительно группы с буфером:

Попарные сравнения между иммунизированными группами и группой с буфером в каждый момент времени проводили с использованием t-критерия Уэлча Стьюдента.

В 2wp1 только дозировка 50 мкг с адъювантом индуцирует более высокий титр по сравнению с группой буфера (все значения p меньше 0,003).

В 2wp2 все иммунизированные группы, за исключением дозировки 1 мкг без адъюванта, индуцируют более высокий титр по сравнению с буфером (все значения p меньше 0,013).

После иммунизации 1 относительно после иммунизации 2

Значимые различия (значение p t-критерия Уэлча Стьюдента меньше 0,025) наблюдали между 2wp1 и 2wp2 в группах 50 мкг, 10 мкг плюс AS01_E, 50 мкг плюс AS01_E.

Ингибирование активности ClfA - кролики

Анализ ингибирования связывания ClfA применяли к сывороткам, индуцированным композицией вакцины, у кроликов, подвергавшихся предварительному воздействию. Титры определяли посредством оценки параметра точки перегиба четырехпараметрической логистической (4PL) кривой посредством нелинейной регрессии кривых ингибирования.

Анализировали сыворотки, отобранные в следующие моменты времени после иммунизации: до иммунизации, 4 недели после первой иммунизации (4wp1), 2 недели после второй иммунизации (2wp2).

Отбирали сыворотку из каждой группы (12 кроликов в каждой), и измеряли титры нейтрализации (ED_{50}) для каждого индивидуального кролика в разные моменты времени.

Средние геометрические титров в каждый момент времени описательно обобщали, включая 95%-ные доверительные интервалы (CI). GMT и 95%-ные CI рассчитывали посредством обратных преобразований доверительных пределов, рассчитанных для

среднего log-преобразованных титров на основе t-распределения Стьюдента (Фиг. 5Б).

Результаты по нейтрализации, полученные с сыворотками кроликов, продемонстрированы на Фиг. 5Б и показывают то, что:

Отсутствует функциональная активность антител против ClfA в преиммунной сыворотке, сыворотках 4wp1 и группы буфера.

Для индукции активности, нейтрализующей ClfA, требуются две дозы.

Доза 10 мкг с адьювантом работает так же, как и доза 50 мкг без адьюванта или с адьювантом.

Общие титры нейтрализации значительно ниже, чем титры нейтрализации, измеренные в мышинной сыворотке.

Пример 4: ответ Т-клеток CD4 против белков вакцины у вакцинированных мышей

Потенциальная роль патогенспецифичных Т-клеток CD4⁺ в запуске иммунного ответа хозяина против SA хорошо описана. Следовательно, способность вакцины с адьювантом Алюм/TLR7 либо AS01E индуцировать ответ Т-клеток также анализировали у мышей.

В частности, целями данного исследования было следующее:

Посмотреть, могла ли иммунизация мышей индуцировать ответ Т-клеток против белков вакцины (величина).

Исследовать Th1, Th2 или Th17 поляризацию ответа (качество).

Оценить, улучшает ли включение адьюванта в композицию вакцины величину и/или влияет ли на качество ответа Т-клеток.

Сравнить адьюванты AS01 и Алюм/TLR7 по величине и качеству ответа Т-клеток.

С этой целью пятинедельным самкам мышей BALB/c давали две иммунизации (50 мкл в квадрицепс каждой задней лапы) в сутки 1 и 29 посредством в.м. пути. Две дозы композиции – вакцины-10 и вакцины-1 – состоящей из 10 мкг и 1 мкг (на основе белка) каждого компонента давали либо одни, либо с адьювантом Алюм/TLR7 или AS01E. Контрольным группам инъецировали один PBS (фосфатно-солевой буферный раствор), Алюм/TLR7 или AS01E. Данный эксперимент повторяли 3 раза для того, чтобы оценить экспериментальную изменчивость. Обзор данного исследования с общим числом мышей, использованных в 3 экспериментах, показан в Таблице 4.

Таблица 4: схема исследования для определения ответа Т-клеток у иммунизированных мышей

Группа	Общее число мышей	Антиген	Доза белка (мкг)	Доза полисахаридов (мкг)	Адьювант [#]	Объем/путь инъекции
1	15	Вакцина	10	2	нет	100 мкл/в.м.
2	15	Вакцина	10	2	Алюм/TLR7	100 мкл/в.м.
3	15	Вакцина	10	2	AS01 _E	100 мкл/в.м.
4	15	Вакцина	1	0,2	нет	100 мкл/в.м.
5	15	Вакцина	1	0,2	Алюм/TLR7	100 мкл/в.м.
6	15	Вакцина	1	0,2	AS01 _E	100 мкл/в.м.
7	6	Вакцина	-	-	нет	100 мкл/в.м.
8	6	Вакцина	-	-	Алюм/TLR7	100 мкл/в.м.
9	6	Вакцина	-	-	AS01 _E	100 мкл/в.м.

Индукцию вакциносpezifичного ответа Т-клеток CD4 оценивали посредством внутриклеточного окрашивания на цитокины (ICS) спленоцитов, выделенных из одной мыши через 12 суток после второй иммунизации (d12p2) и затем обработанных *in vitro* mAb против CD28 и против CD49d (2 мкг/мл каждого), одним или вместе с каждым белком вакцины (H1a_{mut} и ClfA_{mut}, 10 мкг/мл; SpA_{mut}, 1 мкг/мл) при 37°C в течение 16 ч. Брефельдин А, 5 мкг/мл, добавляли на последние 4 ч инкубации. Клетки затем окрашивали Live/Dead NearIr (Invitrogen), фиксировали и пермеабилizировали с использованием Cytofix/Cytoperm (BD), промывали в буфере Perm/Wash (BD), инкубировали с антителом против CD16/блока CD32 Fc (BD) в течение 20 мин при RT и окрашивали следующими mAb против:

CD3-BV605, CD4-BV510, CD8-PE-CF594, CD44-V450, IFN γ -BV785, IL-2-PE Cy5, TNF-AF488, IL-17A-PE Cy7, IL-4-PerCP eFluor710 и IL-13-PerCP eFluor710 в течение 20 мин при RT, дважды промывали в буфере Perm/Wash и суспендировали в PBS.

Образцы получали на проточном цитометре LSRII (BD Biosciences), и ответы Т-клеток CD4 анализировали с использованием программы FlowJo (TreeStar).

Т-клетки CD4⁺CD44^{high}, продуцирующие IL-2, TNF, IL-4/IL-13, IFN- γ или IL-17A, идентифицировали согласно стратегии ворот.

Величину ответа Т-клеток рассчитывали, измеряя частоты (%) Т-клеток CD4⁺CD44^{high}, продуцирующих по меньшей мере один из цитокинов, проанализированных в ответ на стимуляцию *in vitro* белками вакцины (Т-клетки CD4⁺CD44^{high} больше или равно 1 цитокину⁺).

Качество ответа Т-клеток CD4 (поляризация Th1, Th2 или Th17) оценивали, измеряя частоты (%) Т-клеток CD4⁺CD44^{high}, продуцирующих: IFN- γ , но не IL-4/IL-13 (больше или равно IFN- γ ⁺, Th1), IL-4/IL-13, но не IFN- γ (больше или равно IL-4/IL-13⁺, Th2) или по меньшей мере IL-17A (больше или равно IL-17A⁺, Th17).

Применяли булевский воротный анализ, и ответ клеток, обработанных средой, вычитали из ответа стимулированных клеток.

Для анализа результатов на log₁₀ процентных долей CD4⁺CD44^{high} аппроксимировали двухфакторный ANOVA, включающий группу (9 групп), эксперимент (3 эксперимента) и взаимодействие группа*эксперимент в качестве фиксированных эффектов, и используя модель гетерогенной дисперсии (между группами не предполагались идентичные дисперсии). Данную модель использовали для оценки средних геометрических группы и их 95%-ных CI, а также отношений средних геометрических и их 95%-ных CI.

Отношения средних геометрических, превышающие 2-кратную разницу, считали значимо отличными (р меньше 0,05), если их 95%-ные CI не включали 1.

Полученные результаты показаны на Фиг. 2, на которой указаны статистически значимые различия. Они могут быть обобщены следующим образом:

Включение адъюванта в композицию вакцины требовалось для получения значимо более высоких частот специфичных для вакцины Т-клеток по сравнению с контрольными группами.

AS01 превосходил Алюм/TLR7 с каждым белковым антигеном.

Только вакцина с адъювантом AS01 индуцировала Т-клетки CD4⁺, продуцирующие IFN- γ (указывая на поляризацию Th1), специфичные в отношении каждого антигена, тогда как вакцина с адъювантом Алюм/TLR7 индуцировала только SpA_{mut}-специфичные Th1 со значимо меньшими частотами.

Очень низкие частоты Th2 и Th17 измеряли только с вакциной с адъювантом AS01.

Не наблюдали больших различий в величине и качестве ответа Т-клеток после иммунизации либо 1, либо 10 мкг вакцины без адъюванта.

Пример 5: защита в животной модели: модель инфекции кожи

Эксперименты проводили в мышинной модели инфекции *S. aureus* для оценки эффективности вакцины 5Ag/AS01E (содержащей SpA_{mut}, биоконъюгат ClfA_{mut}-CP8 и биоконъюгат Hla_{mut} – CP5 с адъювантом AS01E) в защите против инфекции *S. aureus in vivo*. В данных экспериментах также сравнивали вакцину 5Ag/AS01E с вакциной 4Ag/AS01E, не имеющей SpA, и эффект адъюванта AS01E в вакцине 5Ag сравнивали с

вакциной 5Ag с адъювантом в виде гидроксида алюминия ($\text{Al}(\text{OH})_3$). Использованными мышинными моделями были модель инфекции кожи и модель абсцесса почки.

Схема исследования и протокол

Использовали 5-недельных самок мышей CD1.

Для каждой модели последовательно проводили три эксперимента. Всего провели 6 экспериментов: 3 идентичных исследования в модели абсцесса (Sa-5Ag-7, Sa-5Ag-8, Sa-5Ag-9) и 3 в кожной модели (Sa-5Ag-10, Sa-5Ag-11, Sa-5Ag-12). В кожной модели каждая группа состояла из 10 мышей, таким образом, в каждой модели всего анализировали 30 мышей на группу.

Мыши получали две инъекции одного из разных композиций вакцин или PBS с интервалом один месяц (в сутки 0 и сутки 30) внутримышечно (в.м., 30 мкл в каждую лапу).

Через 3 недели после последней инъекции (сутки 51) мышей инфицировали подходящей сублетальной дозой бактерий USA300, используя подкожный (п.к., кожная модель) путь инфекции. Инокулировали 50 мкл SA USA 300 (теоретически 3×10^7 КОЕ (колониеобразующая единица)/мышь).

В данной кожной модели релевантную область поражения измеряли через 5 суток после инфекции перед сбором через 7 суток после инфекции, гомогенизацией и определением значений КОЕ.

Таблица 5. Схема исследования кожной модели со штаммом *S. aureus* USA 3000

Группа (число мышей)	Иммунизация			Инфекция		Показатель площади кожи (сутки после инфекции)	
	Антиген и доза (мкг/Ag/ мышь)	Адъювант	Путь и объем	Путь и объем	Доза (КОЕ)	Изме- рение	Отбор
1 (1-10)	PBS	Нет	в.м. 60 мкл	п.к. 50 мкл	3×10^7	5	7
2 (11-20)	Sa-5Ag (10 мкг*)	AS01 _E	в.м. 60 мкл	п.к. 50 мкл	3×10^7	5	7
3 (21-30)	Sa-5Ag (10 мкг*)	$\text{Al}(\text{OH})_3$	в.м. 60 мкл	п.к. 50 мкл	3×10^7	5	7
4 (31-40)	Sa-4Ag (10 мкг*)	AS01 _E	в.м. 60 мкл	п.к. 50 мкл	3×10^7	5	7

В.м.: внутримышечная; п.к.: подкожная; AS01_E содержит 2,5 мкг/дозу MPL и 2,5

мкг/дозу QS21; $\text{Al}(\text{OH})_3$: гидроксид алюминия. *На основе белка.

Таблица 6: расписание обработок кожной модели

Сутки	Процедуры
-1	Отбор образца крови до вакцинации
0	1-ая вакцинация
30	2-ая вакцинация
50	Отбор образца крови после 2-ой вакцинации
51	Подкожная инфекция (USA300)
56	Количественное измерение области поражения
58	Умерщвление мышей, отбор области поражения кожи и определение КОЕ

Материалы и методы

Получение бактериальной аликвоты для хранения при -80°C

20 мл свежего триптического соевого бульона (TSB) (предварительно нагретый при 37°C в течение ночи или по меньшей мере в течение 1 ч перед применением) смешивали с 0,3 мл оттаявших бактерий (старый маточный раствор) в 50 мл одноразовой пробирке. Исходная $\text{ОП}_{600\text{нм}}$ (оптическая плотность при длине волны 600 нм) составляла 0,03, и бактерии выращивали до $\text{ОП}_{600\text{нм}}$, равной 0,55. 2 мл данной бактериальной суспензии аликвотировали в криососуды и хранили при -80°C .

Условия роста

Маточный раствор бактерий (*S. aureus* USA300) из морозильника на -80°C , полученный, как описано выше, оттаивали в водной бане при 37°C в течение 10 мин. 20 мл свежего триптического соевого бульона (TSB) (предварительно нагретый при 37°C в течение ночи или по меньшей мере в течение 1 ч перед применением) смешивали с 0,3 мл оттаявших бактерий. Исходная $\text{ОП}_{600\text{нм}}$ составляла 0,03, и бактерии выращивали в 50 мл одноразовой пробирке. Бактерии инкубировали примерно в течение 2,0 часов при 37°C , со встряхиванием при 150 об./мин до достижения конечной $\text{ОП}_{600\text{нм}}$ 0,6, затем центрифугировали при 4500 об./мин, 10 мин, 4°C . Супернатант удаляли, и осадок ресуспендировали в равном объеме PBS и вновь центрифугировали при 4500 об./мин, 10 минут, 4°C . Супернатант вновь удаляли, и бактериальный осадок ресуспендировали в 2 мл PBS (около 5×10^9 КОЕ/мл). В данный момент делали конечное разведение для достижения бактериальной концентрации 3×10^7 КОЕ/мышь в 50 мкл. 100 мкл конечной бактериальной суспензии разводили, и разведения 10^{-5} и 10^{-6} переносили на чашки с триптическим соевым агаром (TSA) для подсчета КОЕ.

Модель *in vivo* подкожной инфекции *S. aureus*

За сутки до инфекции анестезированных мышей (золазепам плюс тилетамина / ксилазин) выбривали в положении на спине с использованием электрической бритвы и депиляционного крема. Данный депиляционный крем аккуратно удаляли посредством воды при 37°C. Бактерии, полученные, как описано выше, инокулировали подкожно (50 мкл/животное) у мышей, анестезированных золазепамом плюс тилетамина / ксилазином. Животных наблюдали каждые сутки с использованием специально предназначенной для этого таблицы бальной оценки для клинических симптомов заболевания. Фотографии поражений для определения размера делали в сутки 5 после инфекции цифровой камерой. В семь суток после инфекции мышей умерщвляли, и кожу с поражением удаляли с использованием кругового скальпеля (8 мм); для больших поражений использовали ножницы для обеспечения извлечения всего поражения. Удаленную кожу гомогенизировали для получения счета КОЕ. Получали десятикратные разведения вплоть до 10^{-8} , и 10 мкл пятна (в двойной повторности) переносили на чашки с TSA.

Показатели модели

- Площадь поражения кожи в 5 суток: выраженная в мм^2 , измеренная программой ImageJ.
- Клинический балл, регистрируемый каждые сутки после инфекции.
- Счет КОЕ (выраженный как КОЕ/образец) в сутки 7 после инфекции.

Результаты

Вакцина 5Ag+AS01_E была эффективной в предупреждении поражений кожи и уменьшении счета КОЕ.

Через 5 суток после инфекции кожи ни одна из мышей, вакцинированных 5Ag+AS01_E, не демонстрировала поражения кожи. 17% мышей (5/30), вакцинированных 5Ag+Al(OH)₃, демонстрировали поражение кожи, тогда как 60% (18/30) и 100% (30/30) мышей, вакцинированных 4Ag+AS01_E и PBS, соответственно, демонстрировали поражение кожи. Результаты показаны в Таблицах 7-9.

GM (среднее геометрическое) КОЕ в 7 суток после инфекции у композиции вакцины SA без антигена SpA (Sa-4Ag+AS01_E) было почти в 3 раза больше (2,84 раза), чем у композиции вакцины Sa с SpA (Sa-5Ag+AS01_E), и данное различие было статистически значимым (95%-ный CI отношения GM КОЕ групп вакцин между двумя группами вакцин не включал значение 1) (Таблицы 7 и 8).

Имелось различие уровня жизнеспособных бактерий в коже между композицией вакцины Sa-5Ag с адьювантом AS01_E или с Al(OH)₃, но данное различие не было

статистически значимым. GM KOE было в 1,6 раза выше в композиции вакцины Sa-5Ag с $\text{Al}(\text{OH})_3$ в качестве адъюванта [Sa-5Ag+ $\text{Al}(\text{OH})_3$], чем в композиции вакцины Sa-5Ag с AS01_E (Sa-5Ag+AS01_E) в качестве адъюванта, и 95%-ный CI отношения GM KOE групп вакцин включал значение 1 (Таблицы 7 и 8).

В группе одного PBS уровень жизнеспособных бактерий в коже в 7 суток после инфекции был слегка выше, чем уровень, наблюдаемый в любом из оценивавшихся композиций вакцин. GM KOE в группе PBS было в 40,32-114,48 раз выше, чем GM KOE, наблюдавшееся в композициях вакцин. (Таблицы 7 и 8).

Разведочные попарные сравнения медианы двух групп, выполненные с использованием двухвыборочного медианного критерия, показали значимое различие между композициями вакцин с SpA и без SpA (p меньше 0,0001) и между композициями вакцин Sa-5Ag с AS01_E и $\text{Al}(\text{OH})_3$ (p равен 0,0206).

Таблица 7. Кожная модель – среднее геометрическое KOE и 95%-ный CI в 4 суток после инфекции штаммом USA 300 *S. aureus*

Метка группы	Группа	N	Среднее геометрическое KOE	95%-ный CI – нижняя граница	95%-ный CI – верхняя граница
PBS	1	30	144660225	85736457	244080306
Sa-5Ag+AS01 _E	2	30	1263656	748937	2132125
Sa-5Ag+ $\text{Al}(\text{OH})_3$	3	30	2037202	1207398	3437302
Sa-4Ag+AS01 _E	4	30	3587442	2126186	6052970

Таблица 8. Кожная модель – GM KOE отношения групп вакцин и 95%-ный CI в 4 суток после инфекции штаммом USA 300 *S. aureus*

Сравнение	Отношение средних геометрических	95%-ный CI – нижняя граница	95%-ный CI – верхняя граница	Статистически значимый*
Гр. 1 PBS / Гр. 2 Sa-5Ag+AS01 _E	114,48	54,63	239,89	v
Гр. 1 PBS / Гр. 3 Sa-5Ag+ $\text{Al}(\text{OH})_3$	71,01	33,89	148,80	v
Гр. 1 PBS / Гр. 4 Sa-4Ag+AS01 _E	40,32	19,24	84,50	v
Гр. 4 Sa-4Ag+AS01 _E / Гр. 2 Sa-5Ag+AS01 _E	2,84	1,35	5,95	v
Гр. 3 Sa-5Ag+ $\text{Al}(\text{OH})_3$ / Гр. 2 Sa-5Ag+AS01 _E	1,61	0,77	3,38	-

* Когда 95%-ный CI отношения GM не включает значение 1 (т.е. равные GM), тогда данное различие является статистически значимым. В частности, если нижняя граница 95%-ного CI отношения GM между двумя группами больше 1, тогда первый компонент считается статистически значимо большим, чем второй компонент сравнения. Наоборот, если верхняя граница 95%-ного CI отношения GM между двумя группами меньше 1, тогда первый компонент считается статистически значимо меньшим, чем второй компонент сравнения. Символ v означает статистически значимое сравнение.

Таблица 9. Кожная модель – среднее, медиана, минимум, максимум площади поражения по группе*

Группа	N	Средняя площадь поражения	Медиана площади поражения	Минималь- ная площадь поражения	Макси- мальная площадь поражения
Гр. 1 PBS	30	19,07	14,00	2,30	66,00
Гр. 2 Sa- 5Ag+AS01	30	0,10	0,10	0,10	0,10
Гр. 3 Sa- 5Ag+AlOH	30	0,39	0,10	0,10	2,30
Гр. 4 Sa- 4Ag+AS01	30	1,08	0,80	0,10	3,70

* В целях анализа отсутствие области поражения было принято за 0,1.

КОЕ также могли быть измерены у мышей, которые не демонстрировали какого-либо поражения кожи, так как бактерии также присутствуют в подкожных абсцессах. В двух композициях вакцины, где поднабор мышей не демонстрировал поражения, а остальные мыши в группе демонстрировали поражение (т.е. группы 5Ag+Al(OH)₃ и 4Ag+AS01_E), среднее и медиана счета КОЕ в коже были ниже у мышей без области поражения, чем у мышей с поражением. Для каждой группы вакцины в **Таблице 10** показана описательная статистика (среднее, медиана, минимум, максимум) счета КОЕ, в зависимости от присутствия или отсутствия области поражения.

Таблица 10. Кожная модель – среднее, медиана, минимум и максимум счета КОЕ

Группа	Присутствие поражения	N	Средний счет КОЕ	Медиана счета КОЕ	Минимальный счет КОЕ	Максимальный счет КОЕ
Гр. 1 PBS	Есть поражение	30	578366667	107500000	5500000	7000000000
Гр. 2 Sa-5Ag+AS01	Нет поражения	30	2764000	1675000	85000	10500000
Гр. 3 Sa-5Ag+AlOH	Нет поражения	25	2776600	2150000	80000	11500000
Гр. 3 Sa-5Ag+AlOH	Есть поражение	5	9500000	10500000	4000000	14500000
Гр. 4 Sa-4Ag+AS01	Нет поражения	12	2584583	2025000	365000	8500000
Гр. 4 Sa-4Ag+AS01	Есть поражение	18	17522222	6950000	750000	19500000

Пример 6: защита в животных моделях: модель абсцесса почки

Эксперименты проводили на мышинной модели абсцесса почки в качестве модели системной инфекции для оценки эффективности вакцины 5Ag/AS01E в защите против инфекции *S. aureus in vivo*, как описано в Примере 5 выше.

Протокол и схема исследования

Использовали 5-недельных самок мышей CD1.

Для каждой модели последовательно проводили три эксперимента. Всего провели 6 экспериментов: 3 идентичных исследования в модели абсцесса (Sa-5Ag-7, Sa-5Ag-8, Sa-5Ag-9). Каждая группа состояла из 12 мышей, таким образом, в каждой модели всего анализировали 36 мышей.

Мыши получали две инъекции одного из разных композиций вакцин или PBS с интервалом один месяц (в сутки 0 и сутки 30) внутримышечно (в.м., 30 мкл в каждую лапу).

В 3 недели после последней инъекции (сутки 51) мышей инфицировали

подходящей сублетальной дозой бактерий USA300, используя внутривенный (в.в., модель абсцесса почки) путь инфекции.

Инокулировали 100 мкл штамма USA 300 SA (теоретически 1×10^7 КОЕ/мышь).

Инфицированных мышей умерщвляли в 4 суток после инфекции, почки отбирали, гомогенизировали и подсчитывали число КОЕ.

Таблица 11. Схема исследования модели абсцесса со штаммом USA 300 *S. aureus*

Группа (число мышей)	Иммунизация			Путь и объем инфекции		Отбор почки (сутки после инфекции)
	Доза антигена (мкг/Ag/мышь)	Адьювант	Путь и объем	Путь и объем	Доза инфекции (КОЕ)**	
1 (1-12)	PBS	Нет	в.м. 60 мкл	в.м. 100 мкл	1×10^7	4
2 (13-24)	Sa-5Ag (10 мкг*)	AS01 _E	в.м. 60 мкл	в.м. 100 мкл	1×10^7	4
3 (25-36)	Sa-5Ag (10 мкг*)	Al(OH) ₃	в.м. 60 мкл	в.м. 100 мкл	1×10^7	4
4 (37-48)	Sa-4Ag (10 мкг*)	AS01 _E	в.м. 60 мкл	в.м. 100 мкл	1×10^7	4

В.м.: внутримышечная; п.к.: подкожная; AS01_E содержит 2,5 мкг/дозу MPL и 2,5 мкг/дозу QS21; Al(OH)₃: гидроксид алюминия.

*На основе белка.

Таблица 12: расписание обработок модели абсцесса

Сутки	Процедуры
-1	Отбор образца крови до вакцинации
0	1-ая вакцинация
30	2-ая вакцинация
50	Отбор образца крови после 2-ой вакцинации
51	Внутривенная инфекция (1×10^7)
55	Мышей умерщвляли через 4 суток после инфекции с отбором почек и подсчетом КОЕ

Материалы и методы

Получение бактериальной аликвоты для хранения при -80°C

20 мл свежего триптического соевого бульона (TSB) (предварительно нагретый при

37°C в течение ночи или по меньшей мере в течение 1 ч перед применением) смешивали с 0,3 мл оттаявших бактерий (старый маточный раствор) в 50 мл одноразовой пробирке. Исходная ОП_{600нм} составляла 0,03, и бактерии выращивали до ОП_{600нм}, равной 0,55. 2 мл данной бактериальной суспензии аликвотировали в криососуды и хранили при -80°C.

Условия роста

Маточный раствор бактерий (*S. aureus* USA300) из морозильника на -80°C, полученный, как описано выше, оттаивали в водной бане при 37°C в течение 10 мин. 20 мл свежего триптического соевого бульона (TSB) (предварительно нагретый при 37°C в течение ночи или по меньшей мере в течение 1 ч перед применением) смешивали с 0,3 мл оттаявших бактерий. Исходная ОП_{600нм} составляла 0,03, и бактерии выращивали в 50 мл одноразовой пробирке. Бактерии инкубировали примерно в течение 2,0 часов при 37°C, со встряхиванием при 150 об./мин до достижения конечной ОП_{600нм} 0,6. Бактерии центрифугировали при 4500 об./мин, 10 мин, 4°C. Супернатант удаляли, и осадок ресуспендировали в равном объеме PBS и вновь центрифугировали при 4500 об./мин, 10 минут, 4°C. Супернатант вновь удаляли, и бактериальный осадок ресуспендировали в 2 мл PBS (около 5×10^9 КОЕ/мл). В данный момент делали конечное разведение для достижения бактериальной концентрации 1×10^7 КОЕ/мышь в 100 мкл. 100 мкл конечной бактериальной суспензии разводили, и разведения 10^{-5} и 10^{-6} переносили на чашки с триптическим соевым агаром (TSA) для подсчета КОЕ.

Модель *in vivo* подкожной инфекции *S. aureus*

Мышей согревали с использованием инфракрасной лампы для того, чтобы наполнить хвостовые вены. Бактерии, полученные, как описано выше, внутривенно инокулировали (100 мкг/животное) в хвостовую вену. Животных наблюдали каждые сутки с использованием специально предназначенной для этого таблицы балльной оценки для клинических симптомов заболевания. Через четверо суток после инфекции мышей умерщвляли, и извлекали почки. Удаленные почки гомогенизировали для получения счета КОЕ (2 мл PBS). Получали десятикратные разведения вплоть до 10^{-8} , и 10 мкл пятна (в двойной повторности) переносили на чашки с TSA.

Показатели модели

- Клинический балл, регистрируемый каждые сутки после инфекции.
- Счет КОЕ (выраженный как КОЕ/образец) в сутки 4 после инфекции.

Результаты

Вакцина 5Ag+AS01_E была высокоэффективной в уменьшении бактериальной

инфекции по сравнению с контролем. Уровень жизнеспособных бактерий в почке, отобранной в 4 суток после инфекции, при измерении посредством среднего геометрического (GM) КОЕ в композиции вакцины без антигена SpA (Sa-4Ag+AS01_E) был в 6,6 раза выше, чем в композиции вакцины SA с SpA (Sa-5Ag+AS01_E), и данное различие было статистически значимым. GM КОЕ было почти в 2 раза выше (1,78 раза) в композиции вакцины SA-5Ag с Al(OH)₃ в качестве адъюванта [Sa-5Ag+Al(OH)₃], чем в композиции вакцины Sa-5Ag с AS01_E в качестве адъюванта (Sa-5Ag+AS01_E), но данное различие не было статистически значимым. В группе с одним PBS уровень жизнеспособных бактерий в почке в 4 суток после инфекции был по меньшей мере в 4 раза выше, чем уровень, наблюдаемый в любой композиции вакцины GSK Sa, оцениваемой в данных исследованиях. Данные результаты показаны в Таблице 13.

Таблица 13: модель абсцесса почки – среднее геометрическое CFU и 95%-ный CI в 4 суток после инфекции штаммом USA 300 *S. aureus*

Метка группы	Группа	Число	Среднее геометрическое КОЕ*	95%-ный CI – нижняя граница	95%-ный CI – верхняя граница
PBS	1	36	93010566	60102858	143936005
Sa-5Ag+AS01 _E	2	36	3257105	1563051	6787196
Sa-5Ag+Al(OH) ₃	3	36	5811332	3119367	10826419
Sa-4Ag+AS01 _E	4	36	21491537	12673064	36446289

* GM КОЕ представляют собой неоткорректированные GM.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1 – ClfAN1N2N3 дикого типа

ASENSVTQSDSASNESKSNDSVVSAAPKTDDTNVSDTKTSSNTNNGETSV AQNPAQQE
TTQSSSTNATTEETPVTGEATTTTNTQANTPATTQSSNTNAEELVNQTSNETTFNDTNTV
SSVNSPQNSTNAENVSTTQDTSTEATPSNNESAPQSTDASNKD VVNQAVNTSAPRMRAF
SLAAVAADAPAAGTDITNQLTNVTVGIDSGTTVYPHQAGYVKLNYGFSVPNSAVKGD
FKITVPKELNLNGVTSTAKVPPIMAGDQVLANGVIDSDGNVIYTFD YVNTKDDVKATL
TMPAYIDPENVKKTGNVTLATGIGSTTANKTVLVDY EKYGKFYNLSIKGTIDQIDKTNN
TYRQTIYVNP SGDNVIAPVLTGNLKPNTDSNALIDQQNTSIKVYKVDNAADLSESYFVNP
ENFEDVTNSVNITFPNPNQYKVEFNTPDDQITTPYIVVNGHIDPNSKGDLALRSTLYGY
NSNIIWRSMWDNEVAFNNGSGSGDGIDKPVVPEQPDEPGEIEPIPED

SEQ ID NO: 2 - ClfAN2N3 дикого типа

VAADAPAAGTDITNQLTNVTVGIDSGTTVYPHQAGYVKLNYGFSVPNSAVKGD
FKITVPKELNLNGVTSTAKVPPIMAGDQVLANGVIDSDGNVIYTFD YVNTKDDVKATL
TMP

AYIDPENVKKTGNVTLATGIGSTTANKTVLVDYEKYGKFYNLSIKGTIDQIDKTNTYR
QTIYVNPSPGDNVIAPVLTGNLKPNTDSNALIDQQNTSIKVYKVDNAADLSESYFVNPENF
EDVTNSVNITFPNPNQYKVEFNTPDDQITTPYIVVNGHIDPNSKGDALRSTLYGYNSN
IIWRSMSWDNEVAFNNGSGSGDGIDKPVVPEQPDEPGEIEPIPED

SEQ ID NO: 3 – зрелый Hla дикого типа

ADSDINIKTGTTDGSNTTVKTGDLVTYDKENGMMHKKVFYSFIDDKNHNKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEE
GANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSI
GHTLKYVQPDFKTILESPDCKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNF
LDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGNTKDKWIDRSSER
YKIDWEKEEMTN

SEQ ID NO: 4 – SpA дикого типа. Подчеркнуты остатки QQ и DD, которые могут быть мутированы для уменьшения связывания с Fcγ и VH₃, соответственно

MKKKNIYSIRKLGVGIASVTLGTLLISGGVTPAANAAQHDEAQQNAFYQVLNMPNLNA
DQRNGFIQSLKDDPSQSANVLGEAQKLNDSPAPKADAQQNNFNKDQQSAFYEILNMPN
LNEAQRNGFIQSLKDDPSQSSTNVLGEAKKLNESQAPKADNNFNKEQQNAFYEILNMPNL
NEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLSEAKKLNESQAPKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLN
EEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDAPKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLTE
EQRNGFIQSLKDDPSVSKEILAEAKKLNDAPKEEDNNKPGKEDNNKPGKEDNNKPG
KEDNNKPGKEDNNKPGKEDGNKPGKEDNKKPGKEDGNKPGKEDNKKPGKEDGNKPG
KEDGNKPGKEDGNVHVVKPGDVTNDIAKANGTTADKIAADNKLADKNMIKPGQELV
VDKKQPANHADANKAQAALPETGEENPFIGTTVFGLSLALGAALLAGRREL

SEQ ID NO: 5 – ClfA N2N3 P116S/Y118A

VAADAPAAGTDITNQLTNVTVGIDSGTTVYPHQAGYVKLNYGFSVPNSAVKGDTFKIT
VPKELNLNGVTSTAKVPPIMAGDQVLANGVIDSDGNVIYTFTDYVNTKDDVKATLTMS
AAIDPENVKKTGNVTLATGIGSTTANKTVLVDYEKYGKFYNLSIKGTIDQIDKTNTYR
QTIYVNPSPGDNVIAPVLTGNLKPNTDSNALIDQQNTSIKVYKVDNAADLSESYFVNPENF
EDVTNSVNITFPNPNQYKVEFNTPDDQITTPYIVVNGHIDPNSKGDALRSTLYGYNSN
IIWRSMSWDNEVAFNNGSGSGDGIDKPVVPEQPDEPGEIEPIPED

SEQ ID NO: 6 – ClfA N2N3 P116S/Y118A с консенсусной последовательностью PglB (KDQNATK, подчеркнута), заменяющей остаток I337

VAADAPAAGTDITNQLTNVTVGIDSGTTVYPHQAGYVKLNYGFSVPNSAVKGDTFKIT
VPKELNLNGVTSTAKVPPIMAGDQVLANGVIDSDGNVIYTFTDYVNTKDDVKATLTMS
AAIDPENVKKTGNVTLATGIGSTTANKTVLVDYEKYGKFYNLSIKGTIDQIDKTNTYR
QTIYVNPSPGDNVIAPVLTGNLKPNTDSNALIDQQNTSIKVYKVDNAADLSESYFVNPENF
EDVTNSVNITFPNPNQYKVEFNTPDDQITTPYIVVNGHIDPNSKGDALRSTLYGYNSN
IIWRSMSWDNEVAFNNGSGSGDGIDKPVVPEQPDEPGEIEPKDQNATKPED

SEQ ID NO: 7 – ClfA N2N3 P116S/Y118A с консенсусной последовательностью PglB (KDQNATK, подчеркнута), заменяющей остаток I337 и N-концевой S

SVAADAPAAGTDITNQLTNVTVGIDSGTTVYPHQAGYVKLNYGFSVPNSAVKGDTFKIT
VPKELNLNGVTSTAKVPPIMAGDQVLANGVIDSDGNVIYTFTDYVNTKDDVKATLTMS
AAIDPENVKKTGNVTLATGIGSTTANKTVLVDYEKYGKFYNLSIKGTIDQIDKTNTYR

QTIYVNPSGDNVIAPVLTGNLKPNTDSNALIDQQNTSIKVYKVDNAADLSESYFVNPFEN
EDVTNSVNITFPNPNQYKVEFNTPDQITTPYIVVNGHIDPNSKGDALRSTLYGYNSN
IIWRMSWDNEVAFNNGSGSGDGIDKPVVPEQPDEPGEIEPKDQNATKPED

SEQ ID NO: 8 – зрелый Hla H35L

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMLKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKG
TIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPNRSIDTKEYMSTLTY
GFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQ
NWGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITM
DRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEM
TN

SEQ ID NO: 9 - зрелый Hla H35L с консенсусной последовательностью PglB (KDQNRTK),
заменяющей остаток K131

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMLKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKG
TIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPNRSIDTKEYMSTLTY
GFNGNVTGDDTGKDQNRTKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIF
NNMVNQNWGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDF
ATVITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDW
EKEEMTN

SEQ ID NO: 10 – зрелый Hla H35L/H48C/G122C

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMLKKVFYSFIDDKNCNKKLLVIRTKG
TIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPNRSIDTKEYMSTLTY
GFNCNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQ
NWGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITM
DRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEM
TN

SEQ ID NO: 11 - зрелый Hla H35L/H48C/G122C с консенсусной последовательностью
PglB (KDQNRTK), заменяющей остаток K131

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMLKKVFYSFIDDKNCNKKLLVIRTKG
TIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPNRSIDTKEYMSTLTY
GFNCNVTGDDTGKDQNRTKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIF
NNMVNQNWGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDF
ATVITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDW
EKEEMTN

SEQ ID NO: 12 - Hla H35L/H48C/G122C с N-концевым S, C-концевой GSHRHR и
KDQNRTK, заменяющей остаток K131

SADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMLKKVFYSFIDDKNCNKKLLVIRTK
GTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPNRSIDTKEYMSTLT
YGFNCNVTGDDTGKDQNRTKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVI
FNNMVNQNWGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPD
FATVITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKID

WEKEEMTNGSHRHR

SEQ ID NO: 13 – Связываемая IgG часть SpA (домены E, D, A, B, C). Подчеркнуты остатки QQ и DD, которые могут быть мутированы для уменьшения связывания с Fcγ и VH₃, соответственно

AQHDEAQQNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKDDPSQSANVLGEAQKLNDSQAPKA
DAQQNNFNKDQQSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQA
PKADNNFNKEQQNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLSEAKKLNESQAP
KADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK
ADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKDDPSVSKEILAEAKKLNDAQAPK

SEQ ID NO: 14 – домен E SpA. Подчеркнуты остатки QQ и DD, которые могут быть мутированы для уменьшения связывания с Fcγ и VH₃, соответственно

AQHDEAQQNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKDDPSQSANVLGEAQKLNDSQAPK

SEQ ID NO: 15 – домен D SpA. Подчеркнуты остатки QQ и DD, которые могут быть мутированы для уменьшения связывания с Fcγ и VH₃, соответственно

ADAQQNNFNKDQQSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQ
APK

SEQ ID NO: 16 – домен A SpA. Подчеркнуты остатки QQ и DD, которые могут быть мутированы для уменьшения связывания с Fcγ и VH₃, соответственно

ADNNFNKEQQNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLSEAKKLNESQAPK

SEQ ID NO: 17 – домен B SpA. Подчеркнуты остатки QQ и DD, которые могут быть мутированы для уменьшения связывания с Fcγ и VH₃, соответственно

ADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK

SEQ ID NO: 18 - домен C SpA. Подчеркнуты остатки QQ и DD, которые могут быть мутированы для уменьшения связывания с Fcγ и VH₃, соответственно

ADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKDDPSVSKEILAEAKKLNDAQAPK

SEQ ID NO: 19 – домен E SpA с заменами QQ-KK в положениях 7 и 8, и заменами DD-AA в положениях 34 и 35

AQHDEAKKNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKAAPSQSANVLGEAQKLNDSQAPK

SEQ ID NO: 20 - домен D SpA с заменами QQ-KK в положениях 12 и 13, и заменами DD-AA в положениях 39 и 40

ADAQQNNFNKDKKSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKAAPSQSTNVLGEAKKLNESQ
APK

SEQ ID NO: 21 - домен A SpA с заменами QQ-KK в положениях 9 и 108, и заменами DD-

AA в положениях 36 и 37

ADNNFNKEKKNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKAAPSQSANLLSEAKKLNESQAPK

SEQ ID NO: 22 - домен B SpA с заменами QQ-KK в положениях 9 и 10, и заменами DD-AA в положениях 36 и 37

ADNKFNKEKKNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKAAPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK

SEQ ID NO: 23 - домен C SpA с заменами QQ-KK в положениях 9 и 10, и заменами DD-AA в положениях 36 и 37

ADNKFNKEKKNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKAAPSVSKEILAEAKKLNDAQAPK

SEQ ID NO: 24 - домен D SpA с заменами QQ-KR в положениях 4 и 5, заменами QQ-KK в положениях 12 и 13, и заменами DD-AA в положениях 39 и 40

ADAKRNNFNKDKKSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKAAPSQSTNVLGEAKKLNESQAPK

SEQ ID NO: 25 - домен D SpA с заменами QQ-KR в положениях 4 и 5

ADAKRNNFNKDQQSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQAPK

SEQ ID NO: 26 – часть SpA, связываемая IgG (домены EDABC), с заменами SEQ ID NO: 19-23 (SpA_{ККАА})

AQHDEAKKNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKAAPSQSANVLGEAQKLNDSQAPKADAQQN
NFNKDKKSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKAAPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKADNNFNKEK
KNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKAAPSQSANLLSEAKKLNESQAPKADNKFNKEKKNAFYEI
LHLPNLNEEQRNGFIQSLKAAPSQSANLLAEAKKLNDAQAPKADNKFNKEKKNAFYEILHLPNL
TEEQRNGFIQSLKAAPSVSKEILAEAKKLNDAQAPK

SEQ ID NO: 27 - часть SpA, связываемая IgG (домены EDABC), с заменами SEQ ID NO: 19 и 21-24 (SpA_{ККАА-KR})

AQHDEAKKNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKAAPSQSANVLGEAQKLNDSQAPKADAKRN
NFNKDKKSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKAAPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKADNNFNKEK
KNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKAAPSQSANLLSEAKKLNESQAPKADNKFNKEKKNAFYEI
LHLPNLNEEQRNGFIQSLKAAPSQSANLLAEAKKLNDAQAPKADNKFNKEKKNAFYEILHLPNL
TEEQRNGFIQSLKAAPSVSKEILAEAKKLNDAQAPK

SEQ ID NO: 28 – консенсусная последовательность PglB

D/E-X-N-Z-S/T

SEQ ID NO: 29 - консенсусная последовательность PglB

K-D/E-X-N-Z-S/T-K

SEQ ID NO: 30 - консенсусная последовательность PglB

K-D-Q-N-R-T-K

SEQ ID NO: 1 – консенсусная последовательность PglB

K-D-Q-N-A-T-K

SEQ ID NO: 32 - ClfAN2N3P116S/Y118A с (подчеркнутой) в I337, N-концевым S, C-концевой GS

SVAADAPAAAGTDITNQLTNVTVGIDSGTTVYPHQAGYVKLNYGFSVPNSAVKGDTFKIT
VPKELNLNGVTSTAKVPPIMAGDQVLANGVIDSDGNVIYTFTDYVNTKDDVKATLTMS
AAIDPENVKKTGNVTLATGIGSTTANKTVLVDYEKYGKFYNLSIKGTIDQIDKTNNTYR
QTIYVNPSPGDNVIAPVLTGNLKPNTDSNALIDQQNTSIKVYKVDNAADLSESYFVNPENF
EDVTNSVNITFPNPNQYKVEFNTPDDQITTPYIVVNGHIDPNSKGDALRSTLYGYNSN
IIWRSMSWDNEVAFNNGSGSGDGIDKPVVPEQPDEPGEIEPKDQNATKPEDGS

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенная композиция, содержащая:

а. антиген ClfA;

б. антиген Hla;

в. антиген SpA; и

г. стафилококковый капсульный полисахарид.

2. Иммуногенная композиция по п. 1, где капсульный полисахарид конъюгирован с белком-носителем.

3. Иммуногенная композиция по п. 1 или п. 2, где капсульный полисахарид представляет собой капсульный полисахарид серотипа 5 и/или типа 8 *S. aureus*.

4. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-3, где капсульный полисахарид конъюгирован с одним из антигенов (а)-(в) по п. 1.

5. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-4, содержащая капсульный полисахарид серотипа 5 и капсульный полисахарид типа 8 *S. aureus*.

6. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-5, содержащая капсульный полисахарид серотипа 5 *S. aureus*, конъюгированный с антигеном Hla, и/или капсульный полисахарид типа 8, конъюгированный с антигеном ClfA.

7. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-6, где

а. антиген ClfA представляет собой белок ClfA, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 2, или его иммуногенный фрагмент;

б. антиген Hla представляет собой белок Hla, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 3, или его иммуногенный фрагмент; и/или

в. антиген SpA представляет собой белок SpA, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 26, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 26, или его иммуногенный фрагмент.

8. Композиция по любому из пп. 1-7, где антиген ClfA содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из замены в P116 на S и замены в Y118

на А в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 (или в эквивалентном положении в аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 2), возможно содержит любую последовательность из SEQ ID NO: 5-7 или 32.

9. Иммуногенная композиция по п. 7 или п. 8, где антиген ClfA содержит одну или более чем одну консенсусную последовательность PglB, выбранную из: D/E-X-N-Z-S/T (SEQ ID NO: 28) и K-D/E-X-N-Z-S/T-K (SEQ ID NO: 29), где X и Z независимо представляют собой любую аминокислоту, отличную от пролина.

10. Иммуногенная композиция по п. 9, где указанная консенсусная последовательность была добавлена или ей была заменена одна или более чем одна аминокислота между аминокислотными остатками 313-342 SEQ ID NO: 2, возможно заменяющая аминокислоту в положении I337 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 2.

11. Иммуногенная композиция по п. 9 или п. 10, где X представляет собой Q (глутамин), и Z представляет собой A (аланин) (например, K-D-Q-N-A-T-K, SEQ ID NO: 31).

12. Иммуногенная композиция по п. 11, г антиген ClfA содержит или состоит из последовательности SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 32.

13. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-12, где антиген Hla содержит аминокислотную замену в положении H35 SEQ ID NO: 3 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3, где указанная аминокислотная замена возможно представляет собой замену H на L.

14. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-13, где антиген Hla содержит одну или более чем одну консенсусную последовательность PglB, выбранную из: D/E-X-N-Z-S/T (SEQ ID NO: 28) и K-D/E-X-N-Z-S/T-K (SEQ ID NO: 29), где X и Z независимо представляют собой любую аминокислоту, отличную от пролина.

15. Иммуногенная композиция по п. 14, где указанная консенсусная последовательность была добавлена или ей была заменена одна или более чем одна аминокислота в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3 или в аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3.

16. Иммуногенная композиция по п. 14, где указанной консенсусной последовательностью была заменена аминокислота в положении K131 в SEQ ID NO: 3 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3.

17. Иммуногенная композиция по любому из пп. 14-16, где X представляет собой Q (глутамин), и Z представляет собой R (аргинин) (например, K-D-Q-N-R-T-K (SEQ ID NO 30)).

18. Иммуногенная композиция по п. 17, где антиген H1a содержит или состоит из последовательности SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12.

19. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-18, где антиген SpA содержит (а) одну или более чем одну аминокислотную замену в связывающем V_H3 субдомене домена E, D, A, B или C, которая нарушает или уменьшает связывание с V_H3, и (б) одну или более чем одну аминокислотную замену в связывающем Fc IgG субдомене домена E, D, A, B или C, которая нарушает или уменьшает связывание с Fc IgG.

20. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-19, где антиген SpA содержит (1) домен E с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 34 и 35 в SEQ ID NO: 14 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 14; домен D с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 39 и 40 в SEQ ID NO: 15 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 15; домен A с аминокислотной заменой в положениях 36 и 37 в SEQ ID NO: 16 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 16; домен B с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 36 и 37 в SEQ ID NO: 17 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 17, и/или домен C с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 36 и 37 в SEQ ID NO: 18 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 18; и/или (2) содержит домен E с аминокислотной

заменой в положениях аминокислот 7 и 8 в SEQ ID NO: 14 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 14; домен D с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 12 и 13 в SEQ ID NO: 15 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 15; домен A с аминокислотной заменой в положениях 9 и 10 в SEQ ID NO: 16 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 16; домен B с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 9 и 10 в SEQ ID NO: 17 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 17, и/или домен C с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 9 и 10 в SEQ ID NO: 18 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 18.

21. Иммуногенная композиция по п. 20, где указанные аминокислотные замены представляют собой замену глутамина на лизин и/или замену аспарагиновой кислоты на аланин.

22. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-21, где антиген SpA содержит домен D с аминокислотной заменой в положениях аминокислот 4 и 5 в SEQ ID NO: 15 или в эквивалентном положении в пределах аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 15.

23. Иммуногенная композиция по п. 22, где указанная аминокислотная замена представляет собой замену глутамина на лизин и/или глутамина на аргинин, например, замену QQ на KR.

24. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-23, где указанный антиген SpA содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19-23, 26 или 27, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 19-23, 26 или 27.

25. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-24, содержащая (1) антиген ClfA, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO:

32; (2) антиген Hla, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12; (3) антиген SpA, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; (3) капсульный полисахарид серотипа 5 *S. aureus* и (3) капсульный полисахарид серотипа 8 *S. aureus*.

26. Иммуногенная композиция по п. 25, где антиген ClfA конъюгирован с капсульным полисахаридом серотипа 8 *S. aureus*, и антиген Hla конъюгирован с капсульным полисахаридом серотипа 5 *S. aureus*.

27. Иммуногенная композиция по п. 26, где указанные конъюгаты ClfA-CP8 и Hla-CP5 представляют собой биоконъюгаты.

28. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-27, которая содержит адъювант.

29. Иммуногенная композиция по п. 28, где адъювант содержит сапонин и липополисахарид.

30. Иммуногенная композиция по п. 29, где адъювант содержит сапонин, липополисахарид в липосомном образовании.

31. Иммуногенная композиция по п. 29 или п. 30, дополнительно содержащая стерин.

32. Иммуногенная композиция по любому из пп. 29-31, где сапонин представляет собой иммунологически активную фракцию сапонины, происходящую из коры *Quillaja saponaria* Molina.

33. Иммуногенная композиция по п. 32, где сапонин представляет собой QS21.

34. Иммуногенная композиция по любому из пп. 29-33, где липополисахарид представляет собой производное липида A.

35. Иммуногенная композиция по п. 34, где липополисахарид представляет собой 3D-MPL.

36. Иммуногенная композиция по любому из пп. 31-35, где стерин представляет собой холестерин.

37. Иммуногенная композиция по любому из пп. 29-36, где данная иммуногенная композиция содержит QS21 на уровне 25 мкг на человеческую дозу.

38. Иммуногенная композиция по любому из пп. 29-37, где данная иммуногенная композиция содержит 3D-MPL на уровне 25 мкг на человеческую дозу.

39. Вакцина, содержащая иммуногенную композицию по любому из пп. 1-27 и фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель.

40. Вакцина, содержащая иммуногенную композицию по любому из пп. 28-38 и фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель.

41. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-27 или вакцина по п. 39 для применения в способе предупреждения или лечения стафилококковой инфекции, где указанную композицию вводят в комбинации с адъювантом.

42. Иммуногенная композиция или вакцина для применения по п. 41, где данную иммуногенную композицию смешивают с адъювантом перед введением субъекту.

43. Иммуногенная композиция или вакцина для применения по п. 41 или п. 42, где адъювант является таким, как определено в любом из пп. 29-36.

44. Иммуногенная композиция или вакцина для применения по п. 43, где адъювант содержит 3D-MPL на уровне 25 мкг на человеческую дозу и QS21 на уровне 25 мкг на человеческую дозу.

45. Набор, содержащий (1) первый контейнер, содержащий иммуногенную композицию по любому из пп. 1-27 или вакцину по п. 39; и (2) второй контейнер, содержащий адъювант.

46. Набор по п. 45, где адъювант является таким, как определено в любом из пп. 29-36.

47. Набор по п. 46, где адъювант содержит 3D-MPL на уровне 25 мкг на человеческую дозу и QS21 на уровне 25 мкг на человеческую дозу.

48. Способ предупреждения или лечения стафилококковой инфекции, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, иммуногенной композиции по любому из пп. 1-27 или вакцины по п. 39.

49. Способ по п. 48, дополнительно включающий введение указанному субъекту адъюванта.

50. Способ по п. 49, где указанный адъювант вводят сопутствующе с иммуногенной композицией.

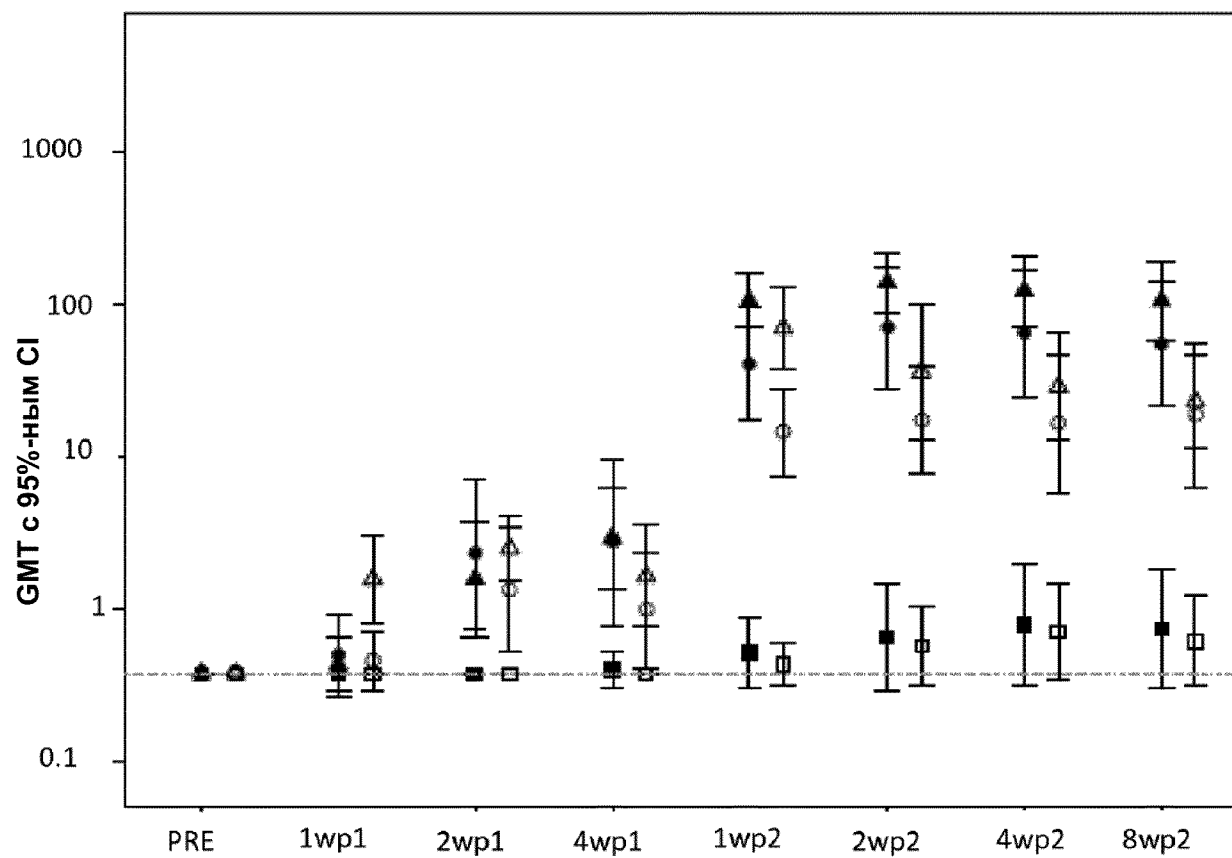
51. Способ по п. 49 или п. 50, где адъювант является таким, как определено в любом из пп. 29-36.

52. Способ предупреждения или лечения стафилококковой инфекции, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, иммуногенной композиции по любому из пп. 28-38 или вакцины по п. 40.

53. Способ получения иммуногенной композиции или вакцины по любому из пп. 1-40, включающий стадии смешивания антигенов и, возможно, адъюванта с фармацевтически приемлемым эксципиентом.

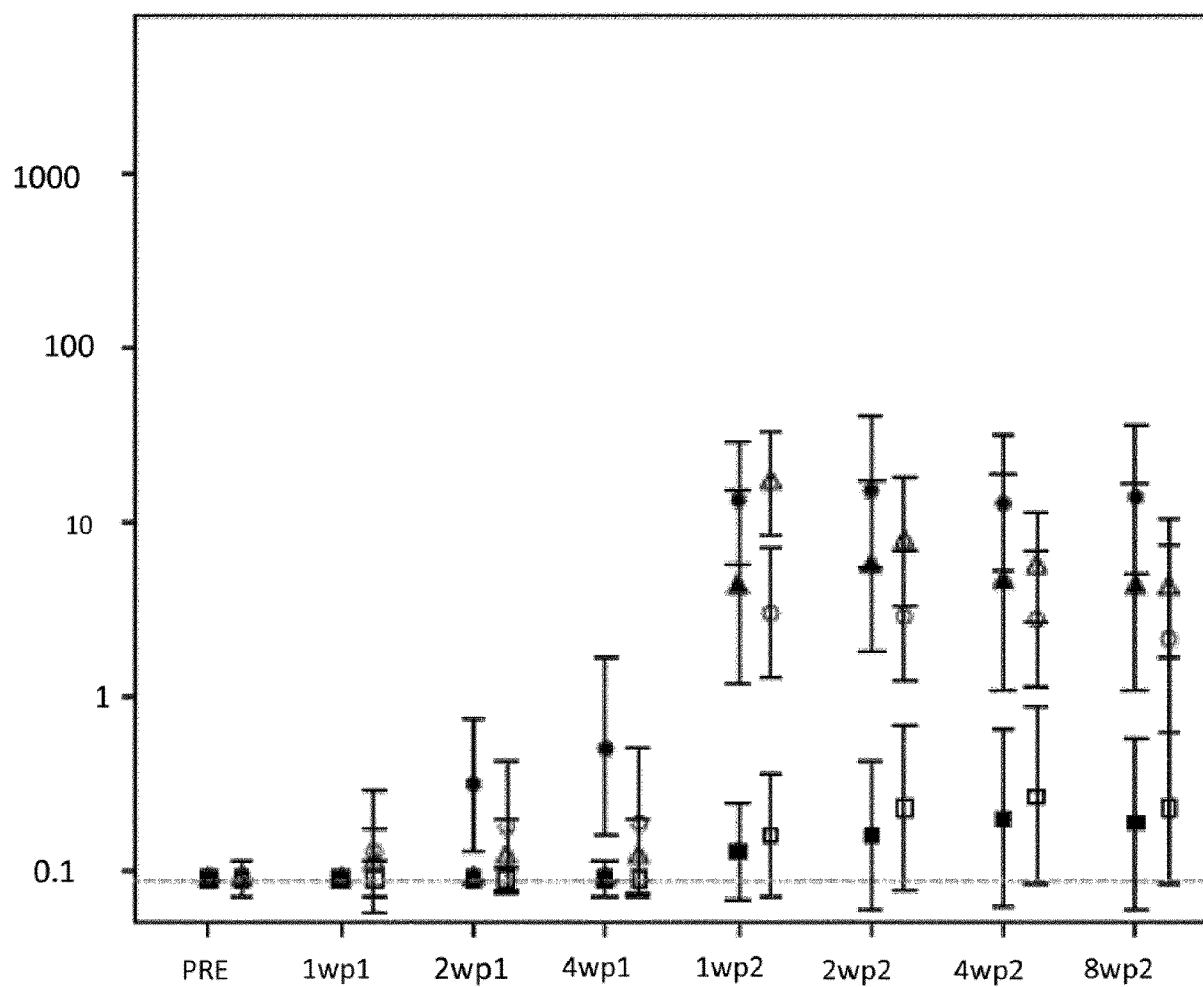
Фиг. 1А

CP5



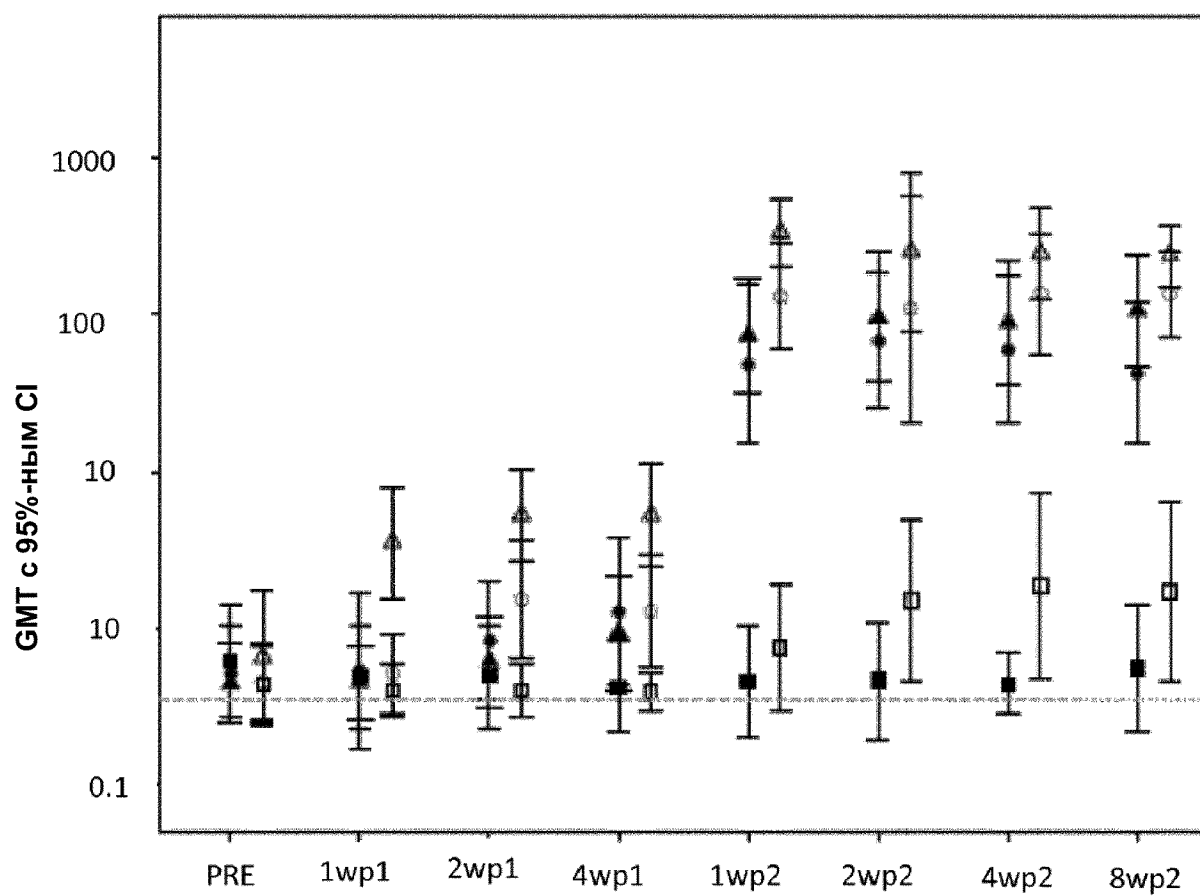
Фиг. 1Б

CP8



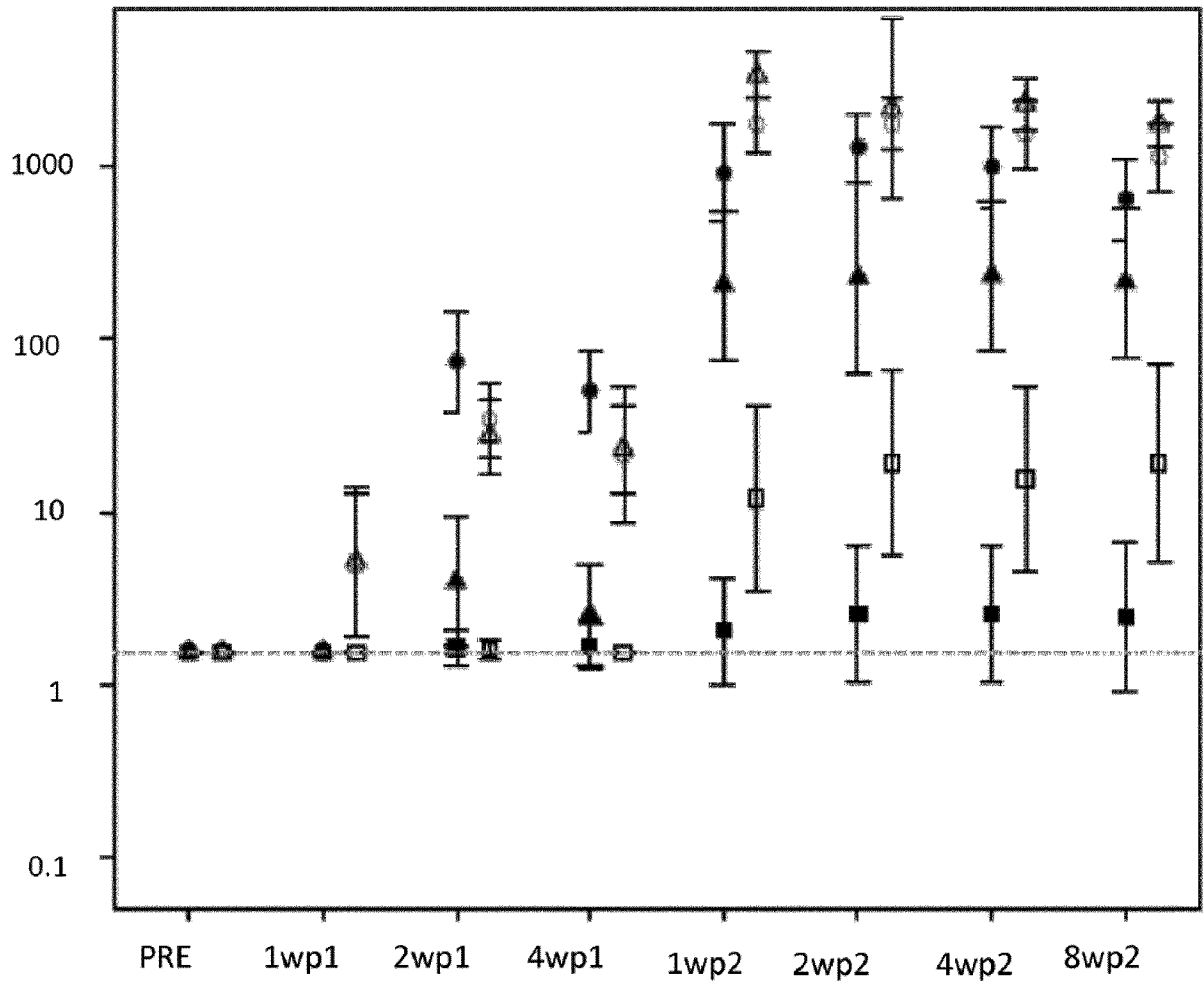
Фиг. 1В

HLA

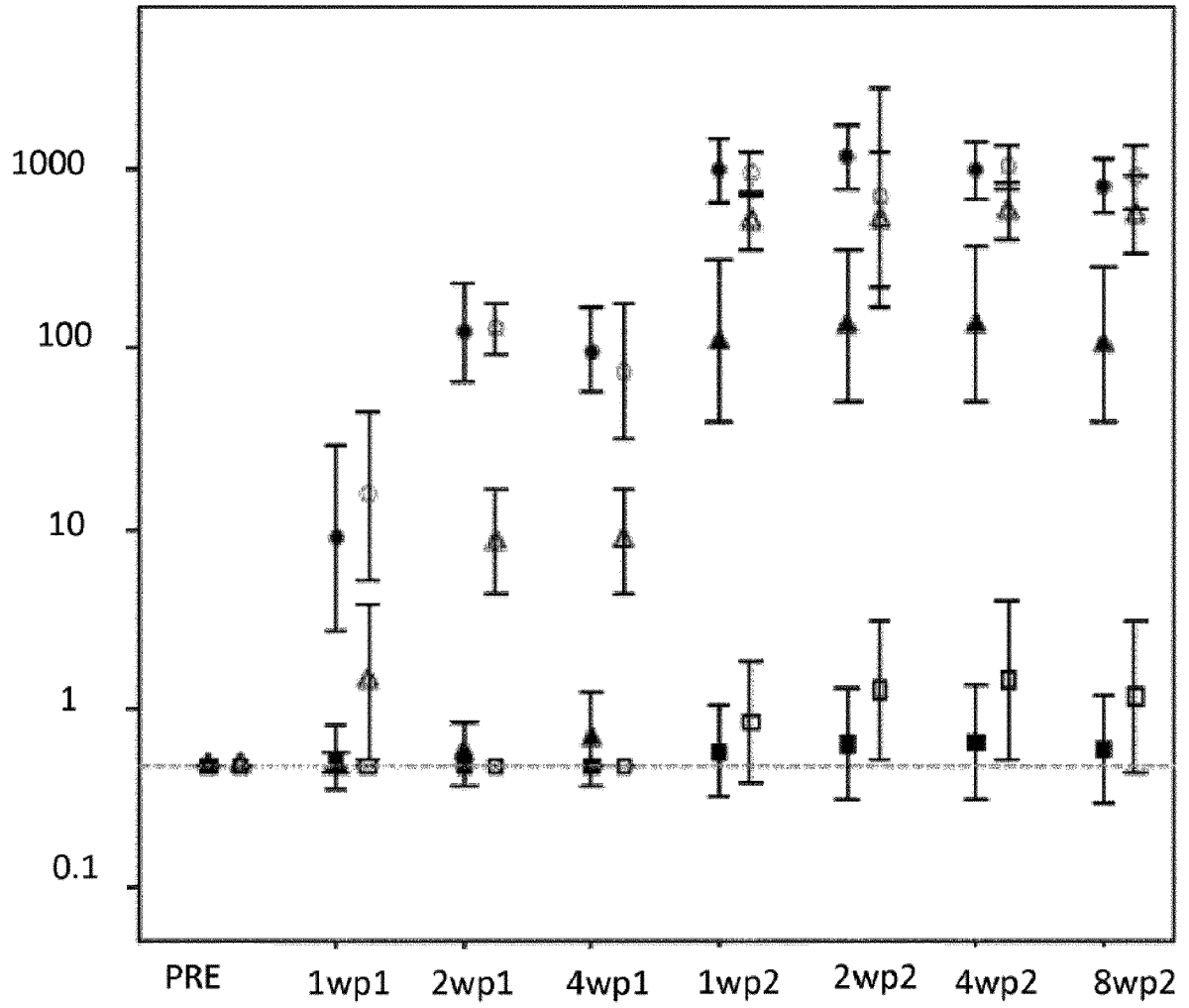


Фиг. 1Г

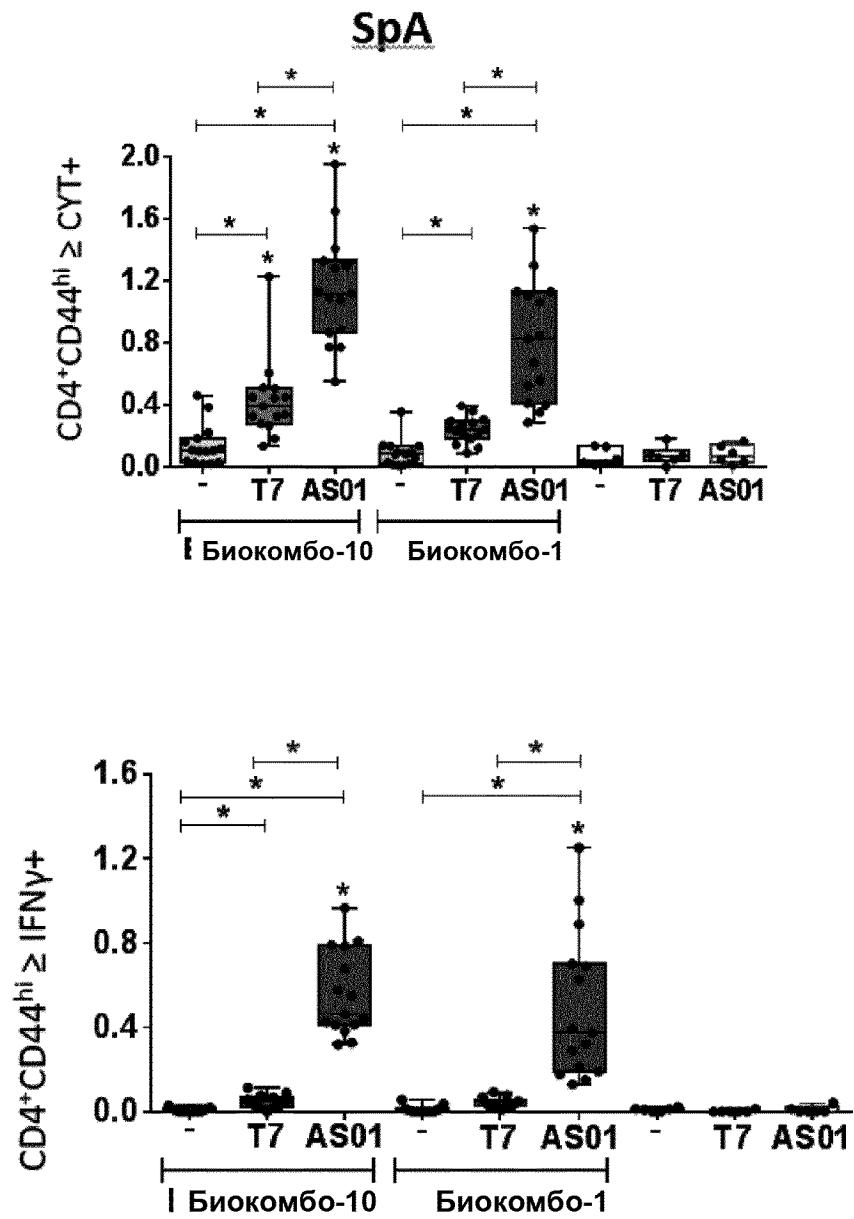
ClfA



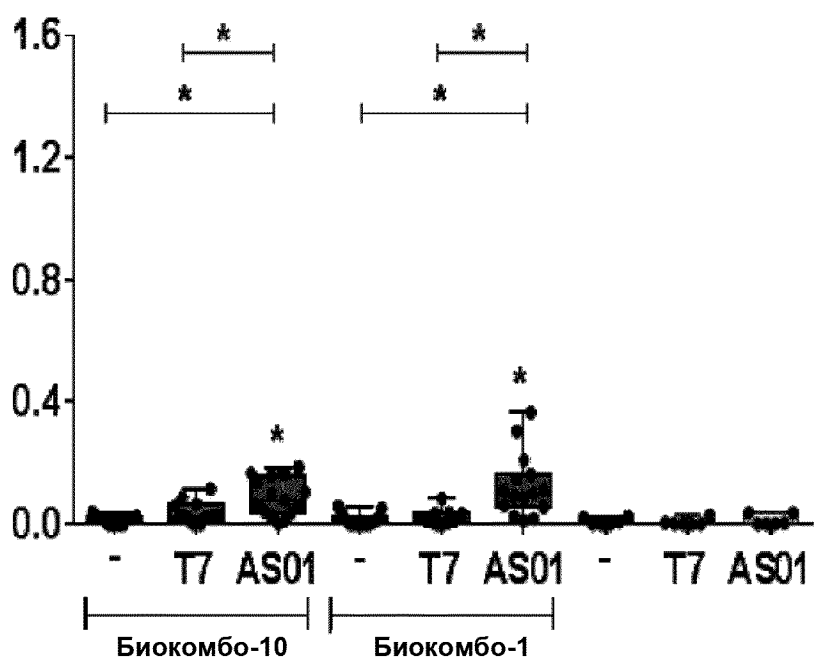
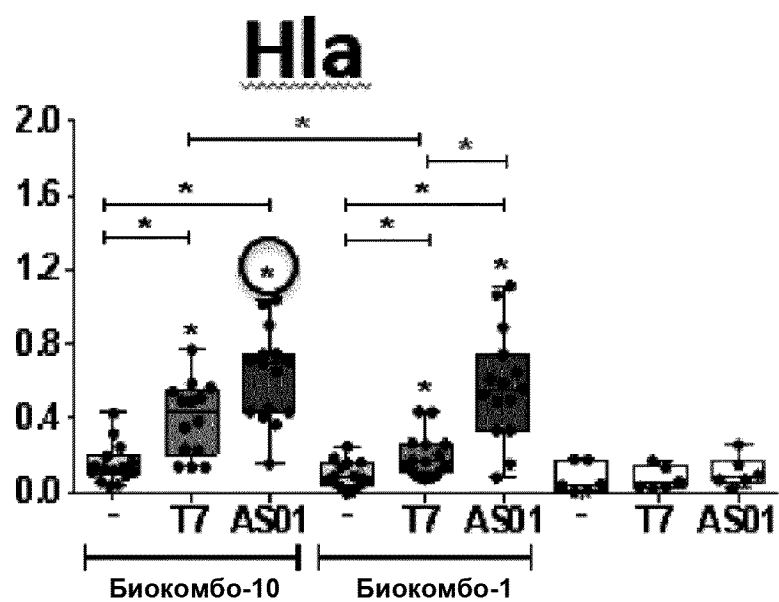
Фиг. 1Д

SPA

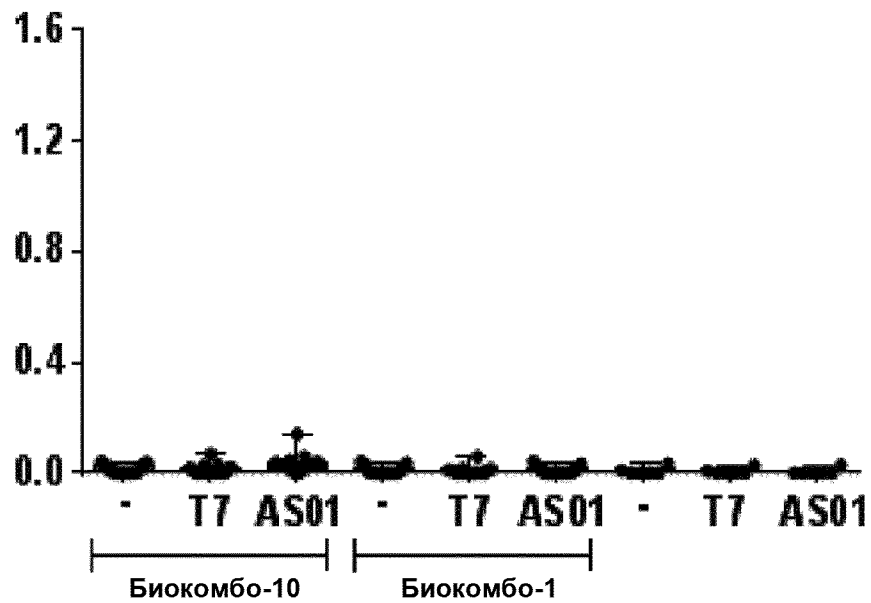
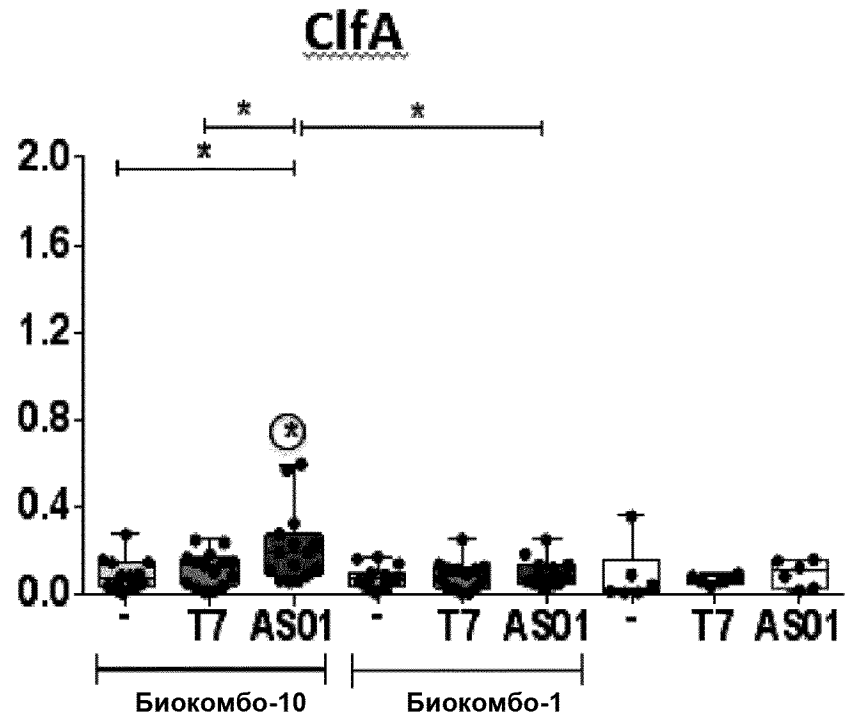
Фиг. 2А



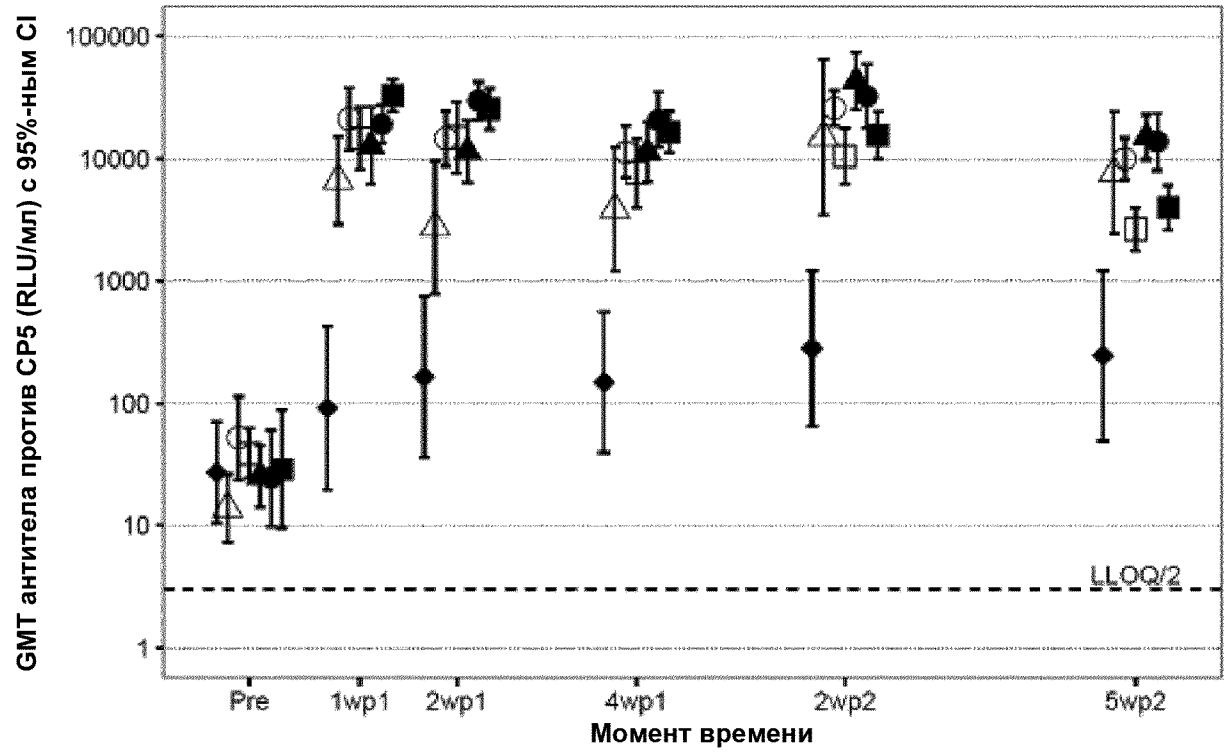
Фиг. 2Б



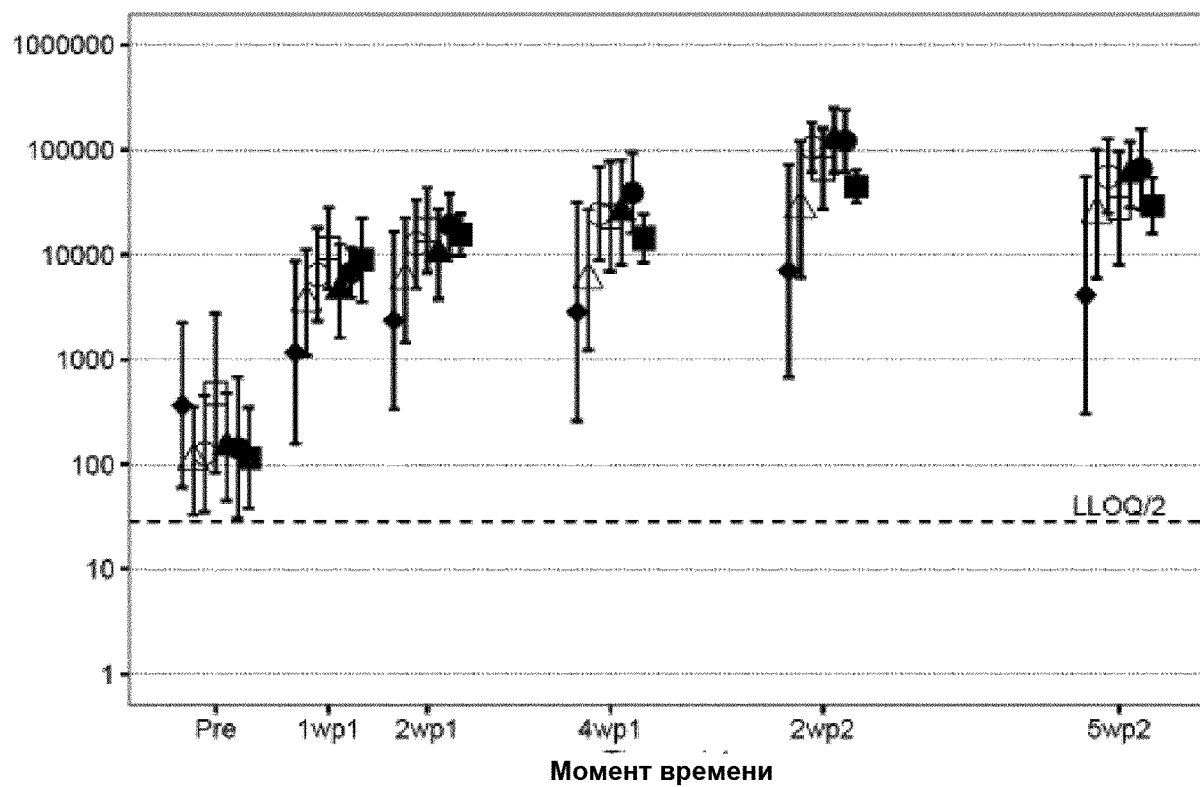
Фиг. 2В



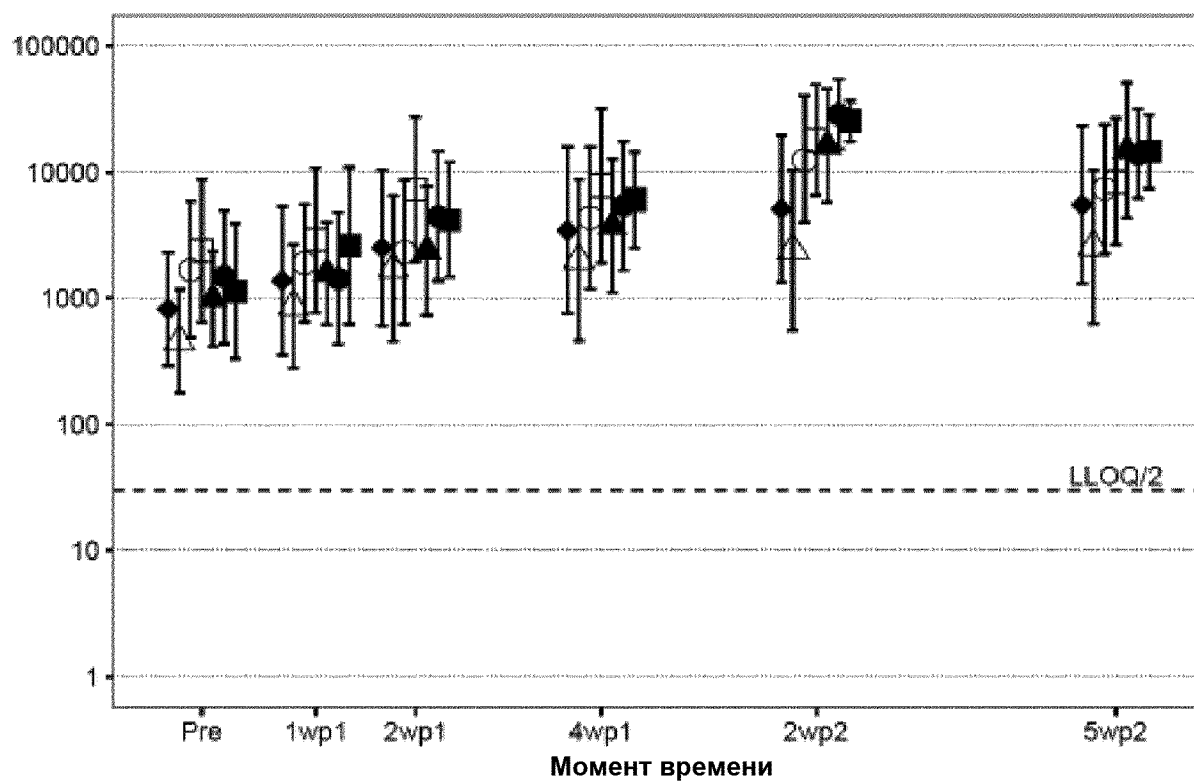
Фиг. 3А



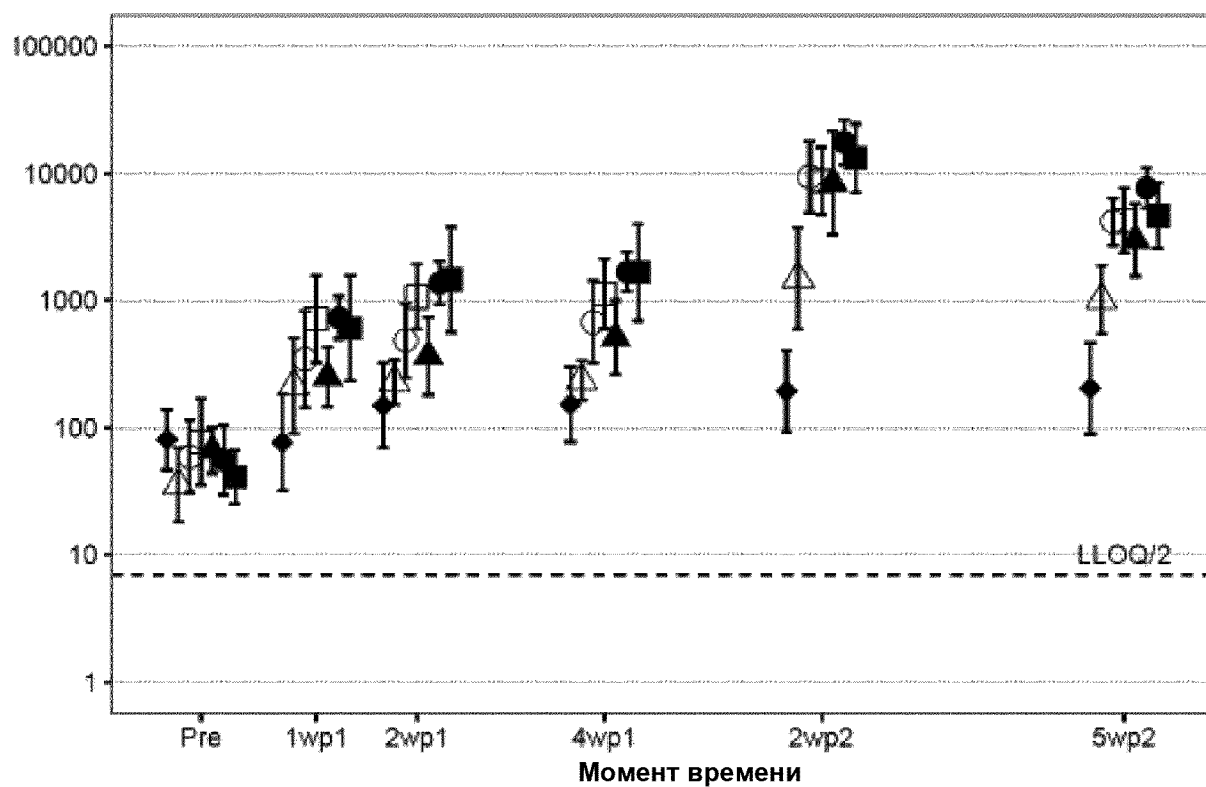
Фиг. 3Б



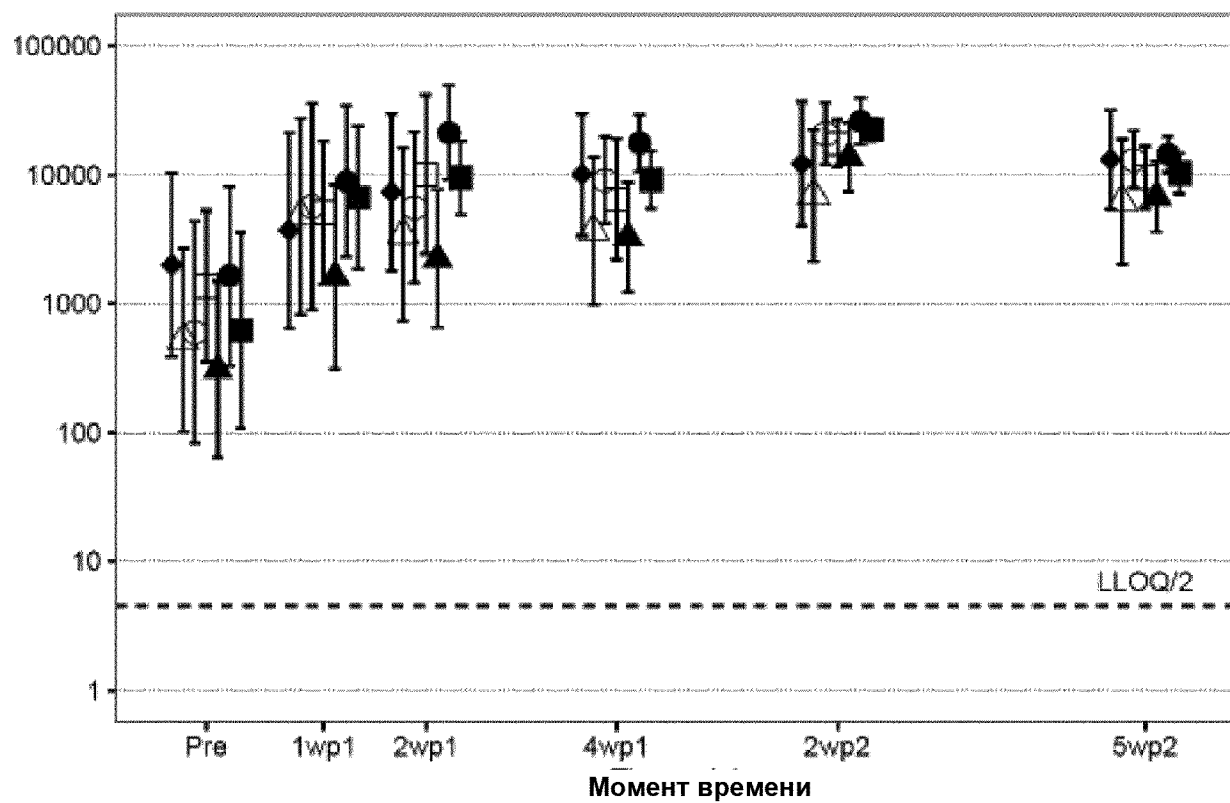
Фиг. 3В



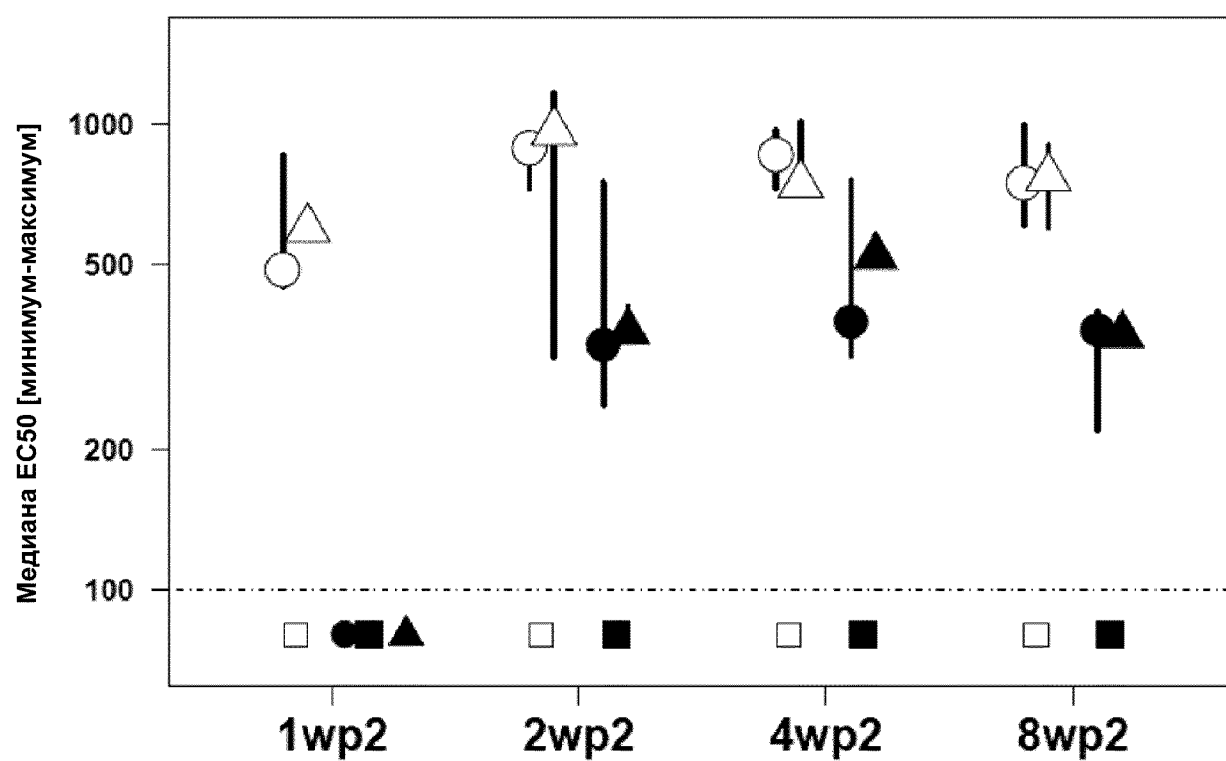
Фиг. 3Г



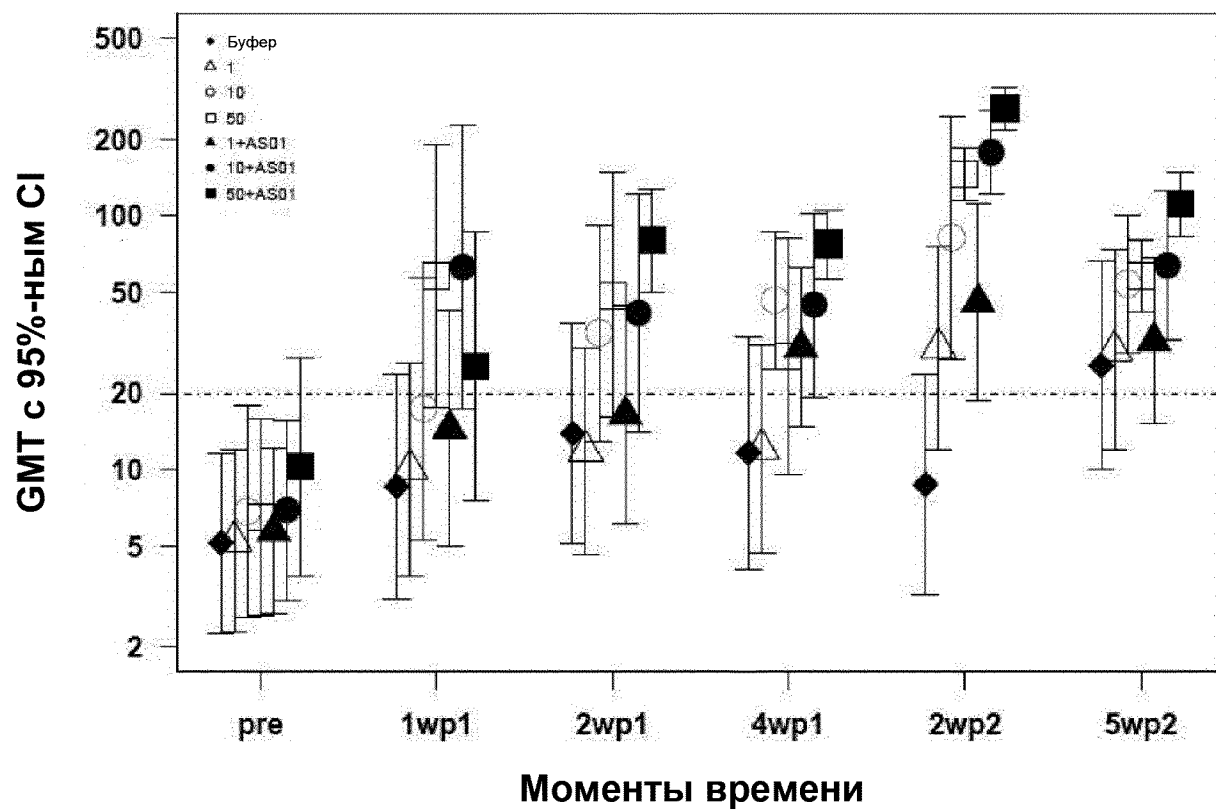
Фиг. 3Д



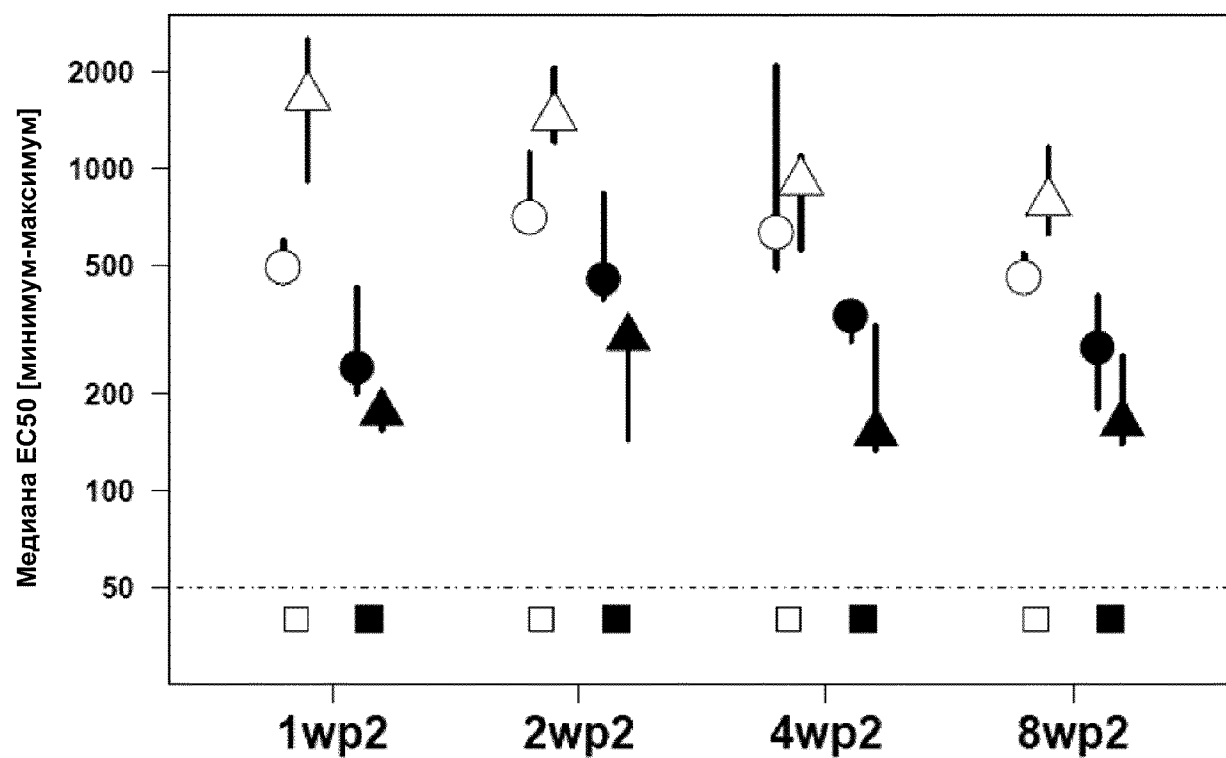
Фиг. 4А



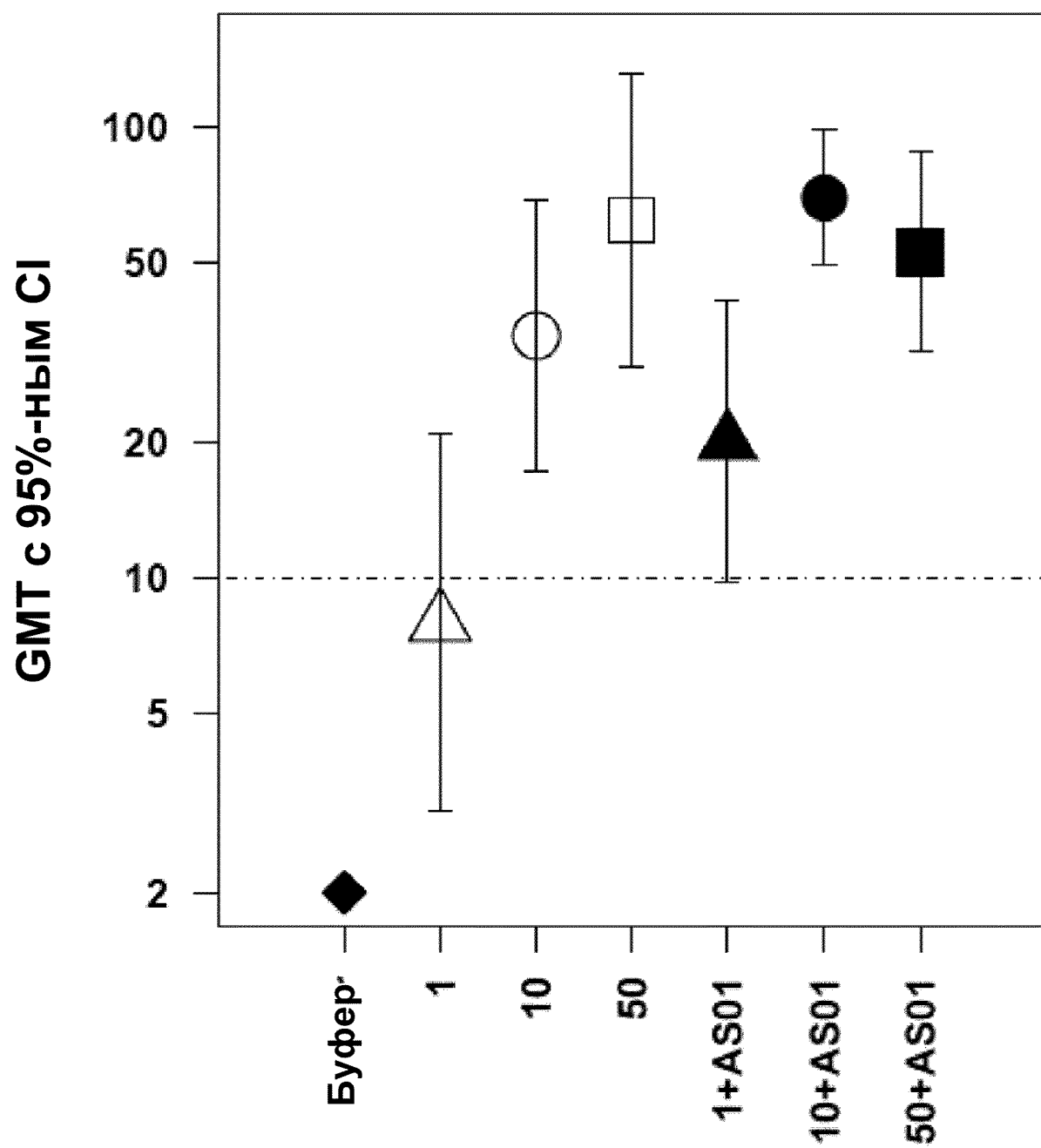
Фиг. 4Б



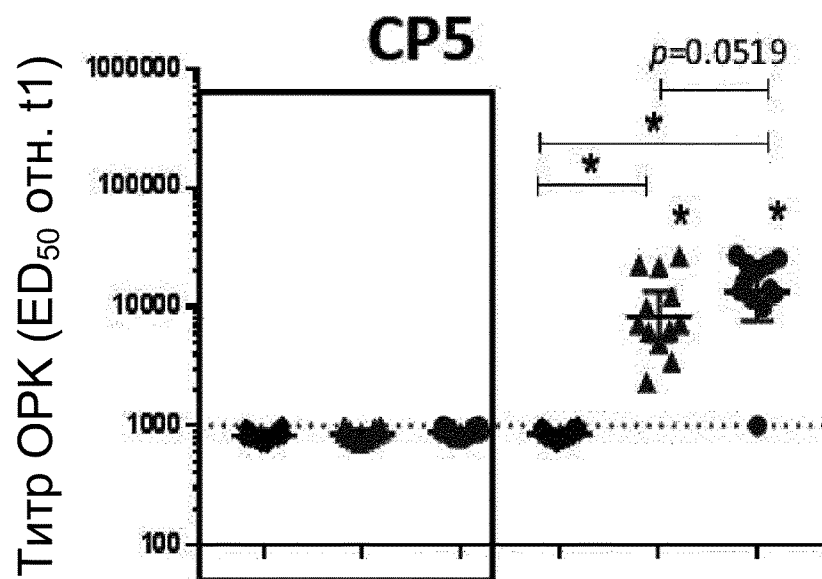
Фиг. 5А



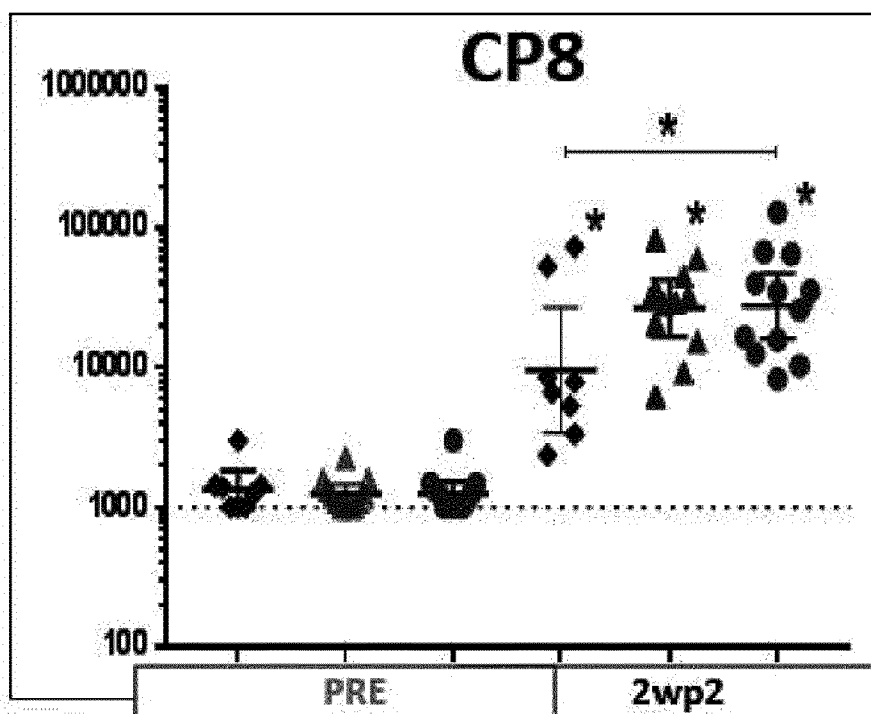
Фиг. 5Б



Фиг. 6А

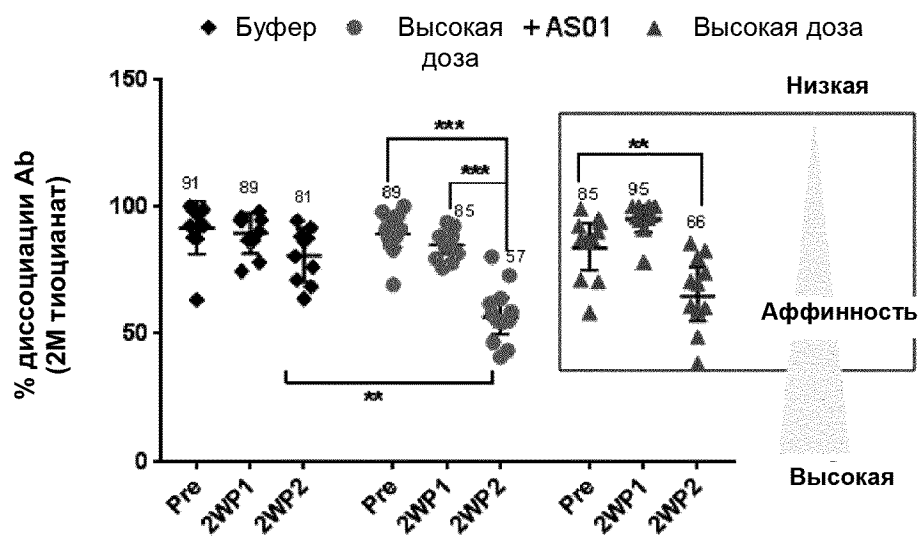


Фиг. 6Б

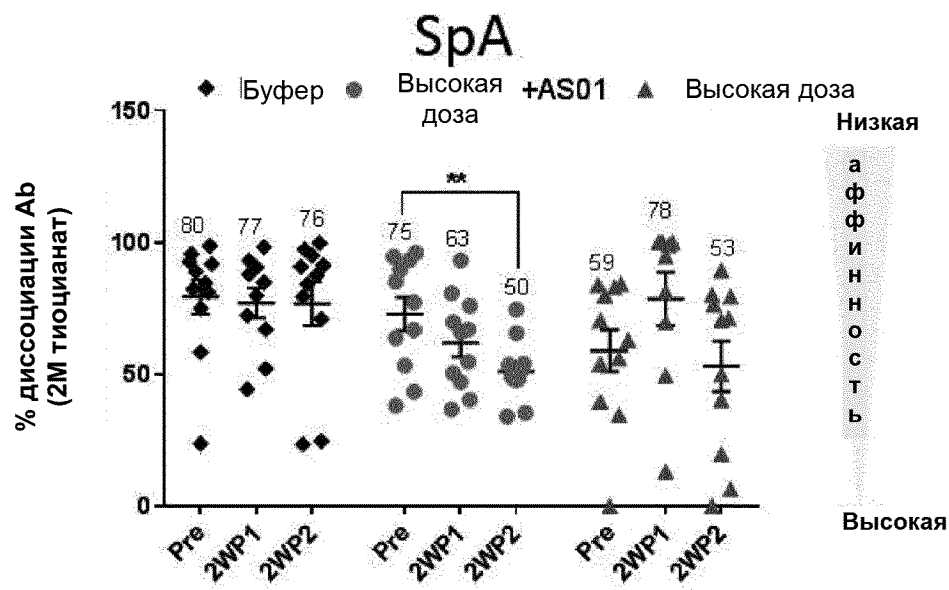


Фиг. 7

Hla

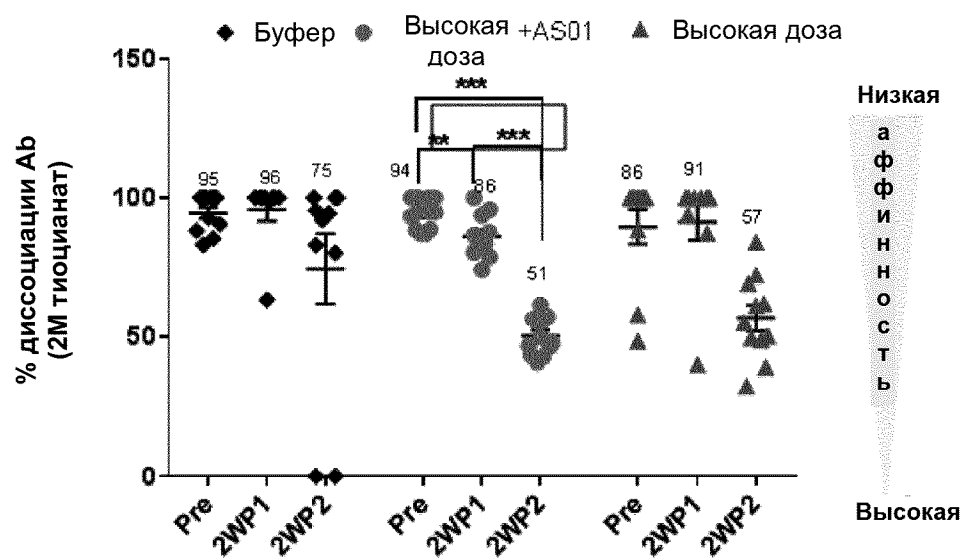


Фиг. 8



Фиг. 9

CIfA



Фиг. 10

